

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**MECANISMOS DE GENERACION DEL BETAGLICANO
SOLUBLE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

PRESENTA

M. en C. NORA GABRIELA VELASCO LOYDEN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. FERNANDO LOPEZ CASILLAS

El presente trabajo se realizó con el financiamiento a proyectos auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, el Howard Hughes Medical Institute y una beca de "traveling fellowship" del Journal of Cell Science del 2002.

MEXICO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

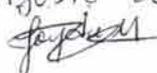
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

A Juan y Camila

A mi mamá Humbelina

Nora Gabriela
Velasco Loyden
9 Agosto 2004


Quiero agradecer en especial al Dr. Fernando López Casillas por su asesoría en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a los miembros de mi comité tutorial Dr. Adolfo García Sainz y Dr. Jorge Vázquez Ramos por su apoyo y sus valiosos consejos que mejoraron este trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Joaquín Arribas del Hospital Vall d'Hebron en Barcelona, España por su asesoría y apoyo en los aspectos teóricos y prácticos a lo largo de todo mi doctorado y durante mi estancia en su laboratorio. Gracias también a los miembros de su laboratorio que me hicieron la vida muy agradable esos días, en especial a Tesi.

Agradezco a todos los miembros pasados y presentes del laboratorio 202-0 del IFC que estuvieron conmigo y compartimos tantos días de trabajo : Valentín, Male, Pepe, Vero, José Luis, Dulce, Yoshiaki, Gerardo, Paty, Adverqueidi y José. Gracias en especial a Paty y Valentín por su apoyo en varios experimentos y a Pepe por su ayuda en el inicio de mi doctorado.

Doy las gracias a los doctores Ruy Pérez Monfort, Jesús Chimal, Marina Macias y Jorge Vázquez por sus sugerencias que ayudaron a mejorar la versión final de esta tesis.

INDICE	i
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	4
I. EL "TGF-β"	5
1. Funciones biológicas del TGF- β	4
2. Receptores para el TGF- β	6
3. Vía de señalamiento del TGF- β	7
4. Proteínas Smad	8
5. Receptores III o coreceptores del TGF- β	10
5.1 Endoglina	10
5.2 Betaglicano membranal	11
II. BETAGLICANO SOLUBLE	14
III. CORTE PROTEOLÍTICO DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES O "ECTODOMAIN SHEDDING"	15
1. Proteasas involucradas en el corte del ectodominio de proteínas transmembranales	16
2. Familia de metaloproteasas-disintegrina ADAM y "shedding"	16
3. Familia de metaloproteasas de la matriz o MMP y "shedding"	18
4. Remoción del prodominio de las metaloproteasas	20
5. Los inhibidores tisulares de las metaloproteasas o TIMPs	21
6. Inhibidores sintéticos	22
7. Corte activable	22
8. Corte constitutivo	24
9. Posibles mecanismos de activación de las proteasas	25
10. El modelo de la maquinaria común de "shedding"	25
11. Función biológica de proteínas membranales solubles	26
11.1 Receptores membranales	27

11.2 Factores de crecimiento membranales	28
11.3 Proteínas de adhesión	29
11.4 Proteoglicanos	29
11.5 Precursor del β -amiloide o β APP.....	30
ANTECEDENTES	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
Reactivos	34
Anticuerpos	34
Cultivos celulares	35
Construcciones y cDNAs	35
Transfecciones	36
Marcado metabólico	37
Inmunoprecipitación	38
Western blot	38
Iodinación del TGF- β	39
Marcado por afinidad	39
Northern Blot	40
Ensayos de competencia	40
RESULTADOS	42
I. EL CORTE DEL BETAGLICANO ES UN PROCESO REGULADO	42
1. El corte de la región extracelular del betaglicano es estimulado por el pervanadato.....	42
2. El corte constitutivo del betaglicano es distinto al corte inducido con pervanadato en las células L6E9	44
3. Diferentes líneas celulares producen betaglicano soluble de distinto tamaño	44
4. El pervanadato también estimula el corte del betaglicano con glicosaminoglicanos	45

5. El pervanadato estimula el corte del betaglicano en las células que lo expresan endogenamente	46
6. El corte del betaglicano inducido con pervanadato no es mediado por TACE	46
II. CARACTERIZACION DE LA PROTEASA QUE GENERA AL BGs-90	47
1. El corte del betaglicano estimulado con pervanadato que genera al BGs-90 es realizado por una metaloproteasa	47
2. La actividad proteolítica que genera el fragmento BGs-90 es una metaloproteasa sensible a TIMP-2	48
3. La sobreexpresión de MT1- y MT3-MMP induce la producción de BGs-90 en diferentes líneas celulares	48
4. La MT1-MMP es responsable del corte del BGs-90 en las células L6E9 y CHO	49
III. EFECTO DE MT2-MMP SOBRE EL "SHEDDING" DEL BETAGLICANO	50
1. La MT2-MMP disminuye el "shedding" del betaglicano	50
2. La MT2-MMP disminuye el contenido celular del betaglicano membranal y de la MT1-MMP.....	51
IV. CARACTERIZACIÓN DEL FRAGMENTO de BGs-90	52
1. El fragmento de BGs-90 une al TGF- β 2	52
2. El fragmento de BGs-90 une TGF- β 1 y TGF- β 2 con afinidades relativas similares al betaglicano membranal	53
V. CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL CORTE DEL BETAGLICANO EN LAS CELULAS COS-7.....	53
1. La actividad proteolítica que genera el betaglicano soluble en células COS-7 es una metaloproteasa que no es sensible a TIMP-1 ni a TIMP-2	53
2. La sobreexpresión de distintas ADAM induce la producción de un nuevo betaglicano soluble en las células COS-7.....	54
DISCUSIÓN	56
El corte del betaglicano es un proceso regulado	56

Diferentes líneas celulares liberan al medio betaglicano soluble de distinto tamaño	56
El BGs-90 es producido por la MT1-MMP	57
La MT2-MMP disminuye los niveles de betaglicano y de MT1-MMP	59
El BGs-90 une TGF- β 2 con una afinidad relativa similar al betaglicano membranal y al betaglicano soluble recombinante.....	59
BGs-120 es producido por una metaloproteasa distinta a la que genera a BGs-90	60
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
BIBLIOGRAFÍA	65

ABREVIATURAS

- ADAM**, "A Disintegrin And Metalloprotease domain"
ADAMTS, "A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs"
 β APP, precursor del β -amiloide
BB-94, batimastat
BG, betaglicano silvestre con cadenas de glicosaminoglicanos
BGpm, betaglicano como proteína medular
BGs-120, betaglicano soluble de 120 KDa
BGs-90, betaglicano soluble de 90 kDa
BMPs, "bone morfogenic proteins"
BMS-275291, inhibidor de metaloproteasas derivado de sulfhidrilo
BSA, "bovine serum albumin"
cDNA, DNA complementario
Células L6E9/Myc-gag⁻, células L6E9 transfectadas establemente con la construcción Myc-gag⁻
Células L6E9/pcDNA3, células transfectadas con el vector pcDNA3 vacío que se usaron como control
Células M1 o M2, línea celular CHO mutagenizada químicamente incapaz de liberar TGF- α soluble y otras proteínas al medio extracelular.
Co-Smads, "common Smads"
DMEM, medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO, dimetilsulfóxido
DSS, disuccinimidilsuberato
EGF, "epidermal growth factor"
EGFR, "epidermal growth factor receptor"
FGF, "Fibroblast growth factor"
Gag⁻, construcciones de betaglicano que no tiene cadenas de glicosaminoglicanos
GAGs, glicosaminoglicanos
GAPDH, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
GST, glutatión-S-transferasa
HA, hemaglutinina
HABG, cDNA del betaglicano de rata con glicosaminoglicanos con el epitope HA en el amino terminal
HABGFLAG, cDNA de betaglicano de rata con glicosaminoglicanos y con el epitope de HA en el amino terminal y el epitope FLAG en el carboxilo terminal
HA-gag⁻ FLAG, cDNA de betaglicano de rata sin glicosaminoglicanos y con el epitope de HA en el amino terminal y el epitope FLAG en el carboxilo terminal
HA-gag⁻, cDNA de betaglicano de rata sin glicosaminoglicanos y con el epitope de HA en el amino terminal
IFN- γ , Interferón- γ
IgGs, inmunoglobulinas
IL-1, interleucina
I-Smads, "inhibitory Smads"
LAP, "latency associated peptide"
MMP, "matrix metalloproteinase"

mRNA, RNA mensajero
MT-MMP, "Membrane-Type Matrix Metalloproteinases"
Myc-gag γ , cDNA de betaglicano de rata sin glicosaminoglicanos y con el epitope de myc en el amino terminal
PBS, "phosphate-buffered saline"
PBS-T, PBS-Tween 20 al 0.1%
pcDNA3, vector de expresión en células eucariontes
PKC, "protein kinase C"
PMA, forbol 12-miristato 13-acetato
proHB-EGF, "heparin-binding EGF-like growth factor"
PV, pervanadato
R-Smads, "Receptor-regulated Smads"
SDS, dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE, geles de poliacrilamida desnaturalizantes
SLC, "small latent complex"
TACE, "tumor necrosis factor- α converting enzyme" o ADAM 17
TAPI-2, Inhibidor de metaloproteasas, N-{DL-[2-9(hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methypentanoyl}-L-3-terbutyl-L-alanine, 2-aminoethylamide.
TGF- α , "transforming growth factor- α "
TGF- β , "transforming growth factor- β "
TIMP, inhibidor tisular de metaloproteasas de "Tissue Inhibitor of Metalloprotease Protein"
TNF- α , "tumor necrosis factor α "
TRANCE, "TNF-related activation induced cytokine"

RESUMEN

El betaglicano es un receptor membranal que une al factor de crecimiento transformante-beta. El betaglicano puede ser liberado al medio celular en forma soluble por un corte proteolítico de su porción extracelular por un proceso conocido en inglés como "ectodomain shedding". El mecanismo por el cual se genera el betaglicano soluble es poco conocido, sin embargo, dado que la forma membranal y la forma soluble del betaglicano tienen efectos contrarios regulando la actividad del TGF- β , consideramos que es de gran importancia caracterizar mejor este proceso. En este trabajo se presenta evidencia que muestra que el corte del betaglicano es un proceso regulado y que el pervanadato, un inhibidor general de fosfatasas de tirosina, induce la liberación del betaglicano. El pervanadato induce la liberación de dos fragmentos solubles de betaglicano, uno de 120 kDa (BGs-120), fragmento descrito con anterioridad que comprende casi todo el dominio extracelular del betaglicano, y un fragmento nuevo de 90 kDa (BGs-90). Se caracterizó a la proteasa que genera al fragmento BGs-90 y se encontró que el corte es mediado por dos metaloproteasas de la subfamilia de las MT-MMPs, la MT1- y la MT3-MMP. La metaloproteasa que genera al BGs-120 no se caracterizó, pero parece ser diferente de la que genera al BGs-90. Además, al igual que el betaglicano membranal el BGs-90 une al TGF- β , lo que sugiere que una vez liberado podría afectar su disponibilidad celular.

ABSTRACT

Betaglycan is a membrane receptor that binds transforming growth factor- β (TGF- β). A soluble form of betaglycan can be released by proteolytic cleavage of the membrane-bound form in a process known as "ectodomain shedding". The mechanism leading to the generation of soluble betaglycan is poorly understood. Since the membrane and soluble forms of betaglycan have opposite effects regulating the availability of TGF- β , it is important to further characterize the shedding of betaglycan. This work shows that the shedding of betaglycan is a regulated process and pervanadate, a general tyrosine phosphatase inhibitor, induces the shedding of two soluble betaglycan fragments, one of 120 kDa (sBG-120) that has been previously described and encompasses almost the entire extracellular domain of betaglycan, and one of 90kDa (sBG-90). The protease that generates the sBG-90 was characterized and we found that the shedding is mediated by two members of the subfamily of metalloproteases called MT1-MMP and MT3-MMP. The metalloprotease leading to the generation of sBG-120 appears to be different from that responsible for the generation of sBG-90 and remains to be further characterized. In a similar manner as the wild type membrane betaglycan, sBG-90 binds TGF- β , suggesting that once released it may affect the its cellular availability.

INTRODUCCION

I. EL TGF- β

La familia de citocinas del Factor de crecimiento transformante-beta o TGF- β (de "transforming growth factor- β ") controla diversos procesos celulares como son: proliferación, diferenciación y apoptosis, tanto en el desarrollo embrionario como en el tejido maduro (1).

La familia del TGF- β comprende alrededor de 42 miembros identificados en vertebrados e invertebrados. Esta familia ha sido agrupada en dos subfamilias basándose en su alto grado de homología de secuencia y su estructura relacionada, la subfamilia del TGF- β / Activina / Nodal y la subfamilia de BMPs (de "bone morphogenic protein") / GDF (de "growth and differentiation factor") / MIS (de "Muellerian inhibiting substance") (2).

Existen cinco isoformas del TGF- β : el TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 son las isoformas de mamífero, el TGF- β 4 es de pollo y el TGF- β 5 de *Xenopus* (3). Existe una gran similitud en la secuencia de aminoácidos entre las diferentes isoformas de TGF- β de mamífero. El TGF- β 1 y TGF- β 2 comparten 74 % de residuos idénticos, el TGF- β 1 y TGF- β 3 78 %, y el TGF- β 2 y TGF- β 3 comparten 82 % (4).

Todas las isoformas de TGF- β se sintetizan como precursores diméricos que se secretan al medio extracelular como moléculas inactivas. El precursor dimérico, proTGF- β , consta de 390 aminoácidos. Los 112 residuos localizados en el carboxilo terminal constituyen la forma activa y madura del TGF- β , mientras que los residuos restantes son el péptido asociado de latencia o LAP (de "latency associated peptide") (Fig. 1). El precursor dimérico tiene un péptido señal en el amino terminal que lo dirige a la vía de secreción celular y un prodominio que es necesario para el plegamiento y dimerización del factor (3). Antes de ser secretado el precursor dimérico sufre un corte proteolítico que separa al TGF- β maduro del LAP, este corte proteolítico se realiza intracelularmente por endopeptidasas como la furina (5). El TGF- β procesado por la furina se secreta como un complejo latente formado por la asociación no covalente entre el LAP y el TGF- β maduro, este complejo se

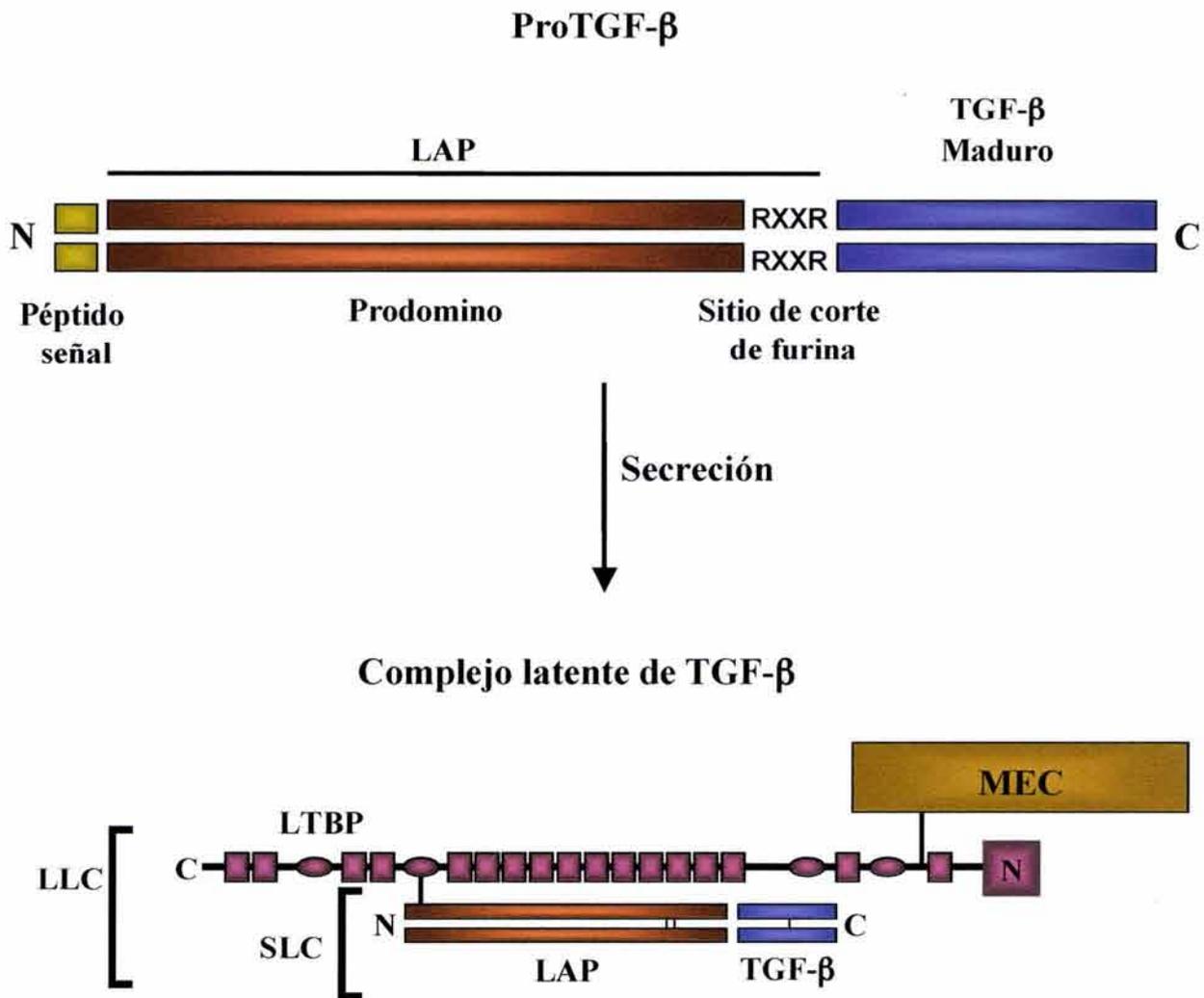


Figura 1. ProTGF- β y forma latente del TGF- β . El proTGF- β consiste en una péptido señal, un prodominio y el TGF- β maduro. La secuencia RXXR es el sitio de corte de la furina para liberar al factor maduro del prodominio. Aún después de cortado el prodominio (LAP) permanece asociado al TGF- β maduro por interacciones no covalentes, formando el complejo latente pequeño (SLC). El SLC se une a la proteína LTBP por medio de puentes disulfuro (I), formando el complejo latente grande (LLC). El SLC se une a la matriz extracelular (MEC) a través de la LTBP. Modificado de (3).

denomina complejo latente pequeño o SLC (de "small latent complex"). El SLC se libera de la célula en forma constitutiva. El SLC se une a la matriz extracelular a través de una proteína llamada proteína de unión al TGF- β latente ("latent TGF- β binding protein", LTBP), formando un complejo inactivo de mayor tamaño, conocido como complejo latente mayor o LLC (de "large latent complex") (6) (Fig. 1).

Cuando el TGF- β está unido al LAP carece de actividad biológica debido a que no puede unirse a sus receptores. Para que el TGF- β se active, es necesario que se libere del LAP. La liberación del TGF- β del LAP se puede realizar *in vitro* con procesos físicos como cambios de temperatura o pH. La activación del TGF- β *in vivo* aún no está del todo determinada, pero se ha propuesto la participación de la trombospondina-1. La trombospondina-1 se une a través de su secuencia de aminoácidos KRFRK a la secuencia LSKL en el amino terminal del LAP. Esta interacción genera un arreglo conformacional del LAP que permite la activación del TGF- β (7, 8). El TGF- β liberado puede unirse a proteínas que inhiben su actividad como son la α 2-macroglobulina (9) y la decorina (10), o bien a proteínas acarreadoras que preservan su actividad como son la albúmina y las IgGs (11).

1. Funciones biológicas del TGF- β

El TGF- β tiene un papel importante en la proliferación celular, el desarrollo embrionario, la respuesta inmune y la reparación de tejidos.

Los estudios realizados con ratones "knockouts" para cada uno de los genes de los tres TGF- β , confirman la importancia de esta citocina en procesos de desarrollo embrionario. Además estos estudios muestran que aunque las tres isoformas del TGF- β tienen funciones similares *in vitro*, cada uno tiene funciones específicas que no son redundantes *in vivo*. En los ratones "knockout" para el gen de TGF- β 1, el 50 % de los ratones mueren en el útero y los que sobreviven mueren a las 4 semanas por problemas inflamatorios (12). Los ratones carentes del gen de TGF- β 2 mueren en el útero debido a múltiples defectos en el desarrollo cardiovascular, pulmonar, craneofacial y urogenital (13).

Los ratones "knockout" para TGF- β 3 tienen paladar hendido y mueren a los pocos días de nacer por defectos en el desarrollo pulmonar (14).

El TGF- β inhibe la división de varios tipos celulares, como son células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas. El TGF- β detiene el ciclo celular en la fase G1 al reprimir al factor transcripcional mitogénico c-myc, o bien al inducir a los inhibidores de las cdk (de "cyclin dependent kinases") (1). La inactivación de la vía de señalamiento del TGF- β contribuye a la tumorigenesis. Muchas enfermedades hereditarias y somáticas resultan de la mutación o del mal funcionamiento de la vía del TGF- β ; así por ejemplo, en la mayoría de cánceres gastrointestinales el receptor tipo II del TGF- β está mutado y en la mitad de los carcinomas pancreáticos Smad 4 está mutado (1). Sin embargo, es importante resaltar que el TGF- β inhibe el crecimiento del epitelio normal y de los tumores de estadios tempranos, pero estimula la invasión y la metástasis de tumores agresivos (1). De manera reciente se ha demostrado que la metástasis de varios tipos de células tumorales requiere de la actividad del TGF- β en estadios avanzados de la enfermedad (15). Esta dualidad de la actividad del TGF- β está siendo ampliamente investigada. En parte se le ha atribuido al hecho de que el TGF- β se produce y puede actuar en casi cualquier célula, por lo que el resultado de su señal depende tanto del tipo como del contexto celular (15).

El TGF- β estimula la proliferación de células mesenquimatosas. Esta proliferación ocurre por la expresión de factores de crecimiento endógenos inducidos por el TGF- β , como son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (16), el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) (17) o por el incremento en la expresión de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico, EGF (de "epidermal growth factor") (18).

El TGF- β también participa en la regulación de la respuesta inmune. El TGF- β suprime la proliferación y diferenciación de células B y T *in vitro* y antagoniza los efectos de citocinas que participan en inflamación como son IL-1 β , TNF- α o IFN- γ , además bloquea la expresión de receptores para IL-1 β e IL-2. El TGF- β inhibe la adhesión de neutrófilos a células endoteliales, lo que limita el reclutamiento de células inflamatorias en la

lesión (19).

El TGF- β controla la producción y acumulación de los componentes de la matriz extracelular (3). Este factor incrementa la síntesis de componentes de la matriz extracelular como son la fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágena (20, 21). Además, incrementa la síntesis de inhibidores de enzimas que degradan la matriz, tales como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y el inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP), mientras que disminuye la expresión de proteasas como la colagenasa y el activador del plasminógeno (22, 23). El aumento en la síntesis de los inhibidores y la disminución en síntesis de proteasas lleva a un aumento en la acumulación de las proteínas de la matriz extracelular. Este proceso es importante en la reparación de tejidos. La liberación de TGF- β por las plaquetas en el sitio de una herida inicia una cascada de eventos que comprende el reclutamiento de células, formación de vasos sanguíneos y síntesis de matriz que da soporte a la herida (24). Estas actividades son benéficas a corto plazo. Sin embargo, en algunas ocasiones una producción y activación excesiva de TGF- β lleva a un depósito exagerado de tejido conjuntivo. Este fenómeno se presenta en una variedad de enfermedades como son la cirrosis hepática y fibrosis pulmonar, glomerulonefritis, escleroderma, ciertas formas de artritis reumatoide, entre otras (25, 26).

2. Receptores para el TGF- β

En la membrana celular existen varias proteínas que unen con alta afinidad al TGF- β , las cuales se clasifican de acuerdo a su peso molecular como receptores tipo I, II y III (27). Los receptores tipo I y II son considerados receptores de señalamiento, pues son los únicos indispensables para transmitir la señal del TGF- β al interior de la célula. Los receptores tipo III son considerados "co-receptores", pues no son requeridos para la generación de la señal, pero regulan el acceso del TGF- β a los receptores tipo I y II. Entre los receptores tipo III están dos glicoproteínas transmembranales llamadas el betaglicano y la endoglina (28, 29).

El receptor tipo I es una glicoproteína de un pase transmembranal, de 53 kDa. Su

región extracelular es rica en cisteínas y es la que une al TGF- β . Sin embargo, el receptor tipo I no es capaz de unir al TGF- β por sí mismo y requiere la presencia del receptor tipo II para unirlo. Las regiones citoplásmicas de ambos receptores tienen actividad de cinasa de proteína, fosforilando residuos de serinas y treoninas (Fig. 2). La región citoplásmica del receptor tipo I, precediendo al dominio de cinasa, tiene una región altamente conservada que se conoce como dominio GS, debido a su alto contenido en glicinas y serinas (30). La región GS es el blanco de fosforilación por el receptor tipo II, fosforilación que activa a la cinasa del receptor tipo I. Seguida de la secuencia GS se encuentra la secuencia LP (leucina-prolina) en donde se une la proteína FKBP12. La FKBP12 se une a la región GS cuando está desfosforilada y de esa manera mantiene a la cinasa en una conformación inactiva (31). La molécula FKBP12 actúa como regulador negativo de la señalización de los receptores del TGF- β (32). El receptor tipo II es una glicoproteína de un pase transmembranal, de 75 kDa. Su región extracelular, al igual que el receptor tipo I, es rica en cisteínas y une al TGF- β . El receptor tipo II puede unir al TGF- β de manera independiente, pero requiere de la presencia del receptor tipo I para que haya señalamiento (33). La región citoplásmica del receptor tipo II tiene actividad de cinasa en serinas y treoninas y presenta en el extremo carboxilo terminal una cola rica en serinas y treoninas (Fig. 2). La cinasa del receptor tipo II está constitutivamente activa y requiere que el residuo Ser213 esté fosforilado para mediar su efecto autocatalítico. La fosforilación en el residuo Ser409 estimula su capacidad para fosforilar, mientras que la fosforilación en el residuo Ser416 inhibe su actividad de cinasa, lo que impide la autofosforilación y la fosforilación del receptor tipo I (34).

3. Vía de señalamiento del TGF- β

El TGF- β inicia el proceso de señalamiento al unir y juntar a los receptores tipo I y II en la superficie celular (Fig. 3). El TGF- β se une primero al receptor tipo II. El TGF- β unido al receptor tipo II es reconocido por el receptor tipo I, lo cual induce la formación de un complejo heterotetramérico. La cinasa del receptor tipo II, la cual está constitutivamente activa, fosforila al receptor tipo I en su región reguladora GS y de esa manera activa su

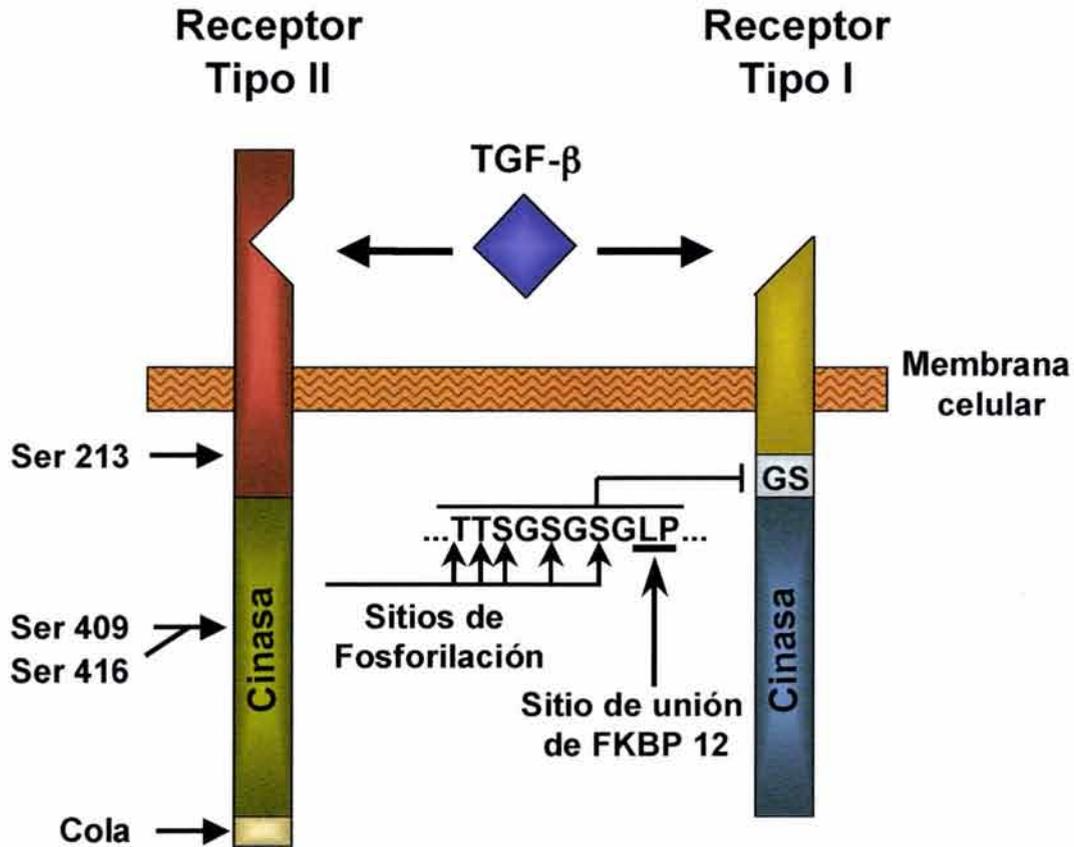


Figura 2. Receptores de señalamiento del TGF- β . Los receptores I y II son proteínas transmembranales con una pequeña región extracelular y un gran dominio citoplásmico con actividad de cinasa en serina y treoninas. El receptor II tiene en el extremo carboxilo terminal una cola rica de residuos de serinas y treoninas. El receptor I tiene una región altamente conservada en el extremo amino del dominio de cinasa conocida como dominio GS, que es rica en glicinas y serinas. En el dominio GS está la secuencia TTSGSGSG donde el receptor I es fosforilado por la cinasa del receptor II. El receptor I tiene una secuencia leucina-prolina (LP) donde se une la molécula FKBP12. Modificado de (3).

cinasa. La fosforilación de la región GS del receptor tipo I induce un cambio conformacional de su cinasa que favorece la separación de la proteína inhibitoria FKBP12, al mismo tiempo que favorece la unión y fosforilación de sus sustratos. El receptor tipo I activado fosforila y activa al mediador intracelular Smad2 en residuos de serina. Esta fosforilación induce su asociación con Smad4 y el complejo Smad2-Smad4 se trasloca al núcleo en donde interactúa con otros reguladores transcripcionales para modular positiva o negativamente la expresión de genes regulados por el TGF- β (30, 35) (Fig. 3). Los restantes miembros de la superfamilia del TGF- β , como son las BMP o las activinas poseen una vía de señalamiento similar, en donde participan receptores tipo I, receptores tipo II y proteínas Smad específicos.

Proteínas Smad

Los primeros mediadores intracelulares del señalamiento del TGF- β que se identificaron fueron las proteínas MAD en *Drosophila* (36); posteriormente se identificaron los ortólogos en vertebrados y se les llamó "Smad". Los reguladores transcripcionales Smad se han clasificado de acuerdo a sus características estructurales y funcionales en las siguientes familias: 1) R-Smads (de "Receptor-regulated Smads") son los sustratos directos de la cinasa del receptor tipo I, 2) Co-Smads (de "common Smads") son los que participan en la vía de señalamiento asociándose con los R-Smads y 3) I-Smads (de "inhibitory Smads") son los Smads inhibidores que bloquean la señalización de los otros dos grupos.

Entre los R-Smads, las Smad 2 y 3 responden a la vía de señalamiento de la subfamilia del TGF- β (35, 37), mientras que las R-Smads 1, 5 y 8 responden a la vía de señalamiento de la subfamilia de los BMPs (3). Entre las Co-Smads en vertebrados se han descrito dos proteínas relacionadas, Smad 4 y Smad 4 β (38). De las I-Smads se conocen la Smad 6 y 7, las cuales tiene poca homología con las otras Smad (38) (Fig. 4).

Las proteínas Smad tienen dos dominios globulares conservados evolutiva y funcionalmente, los dominios MH1 y MH2, que se localizan en el extremo amino y carboxilo respectivamente. Entre ambos dominios existe una región de unión ("linker") que

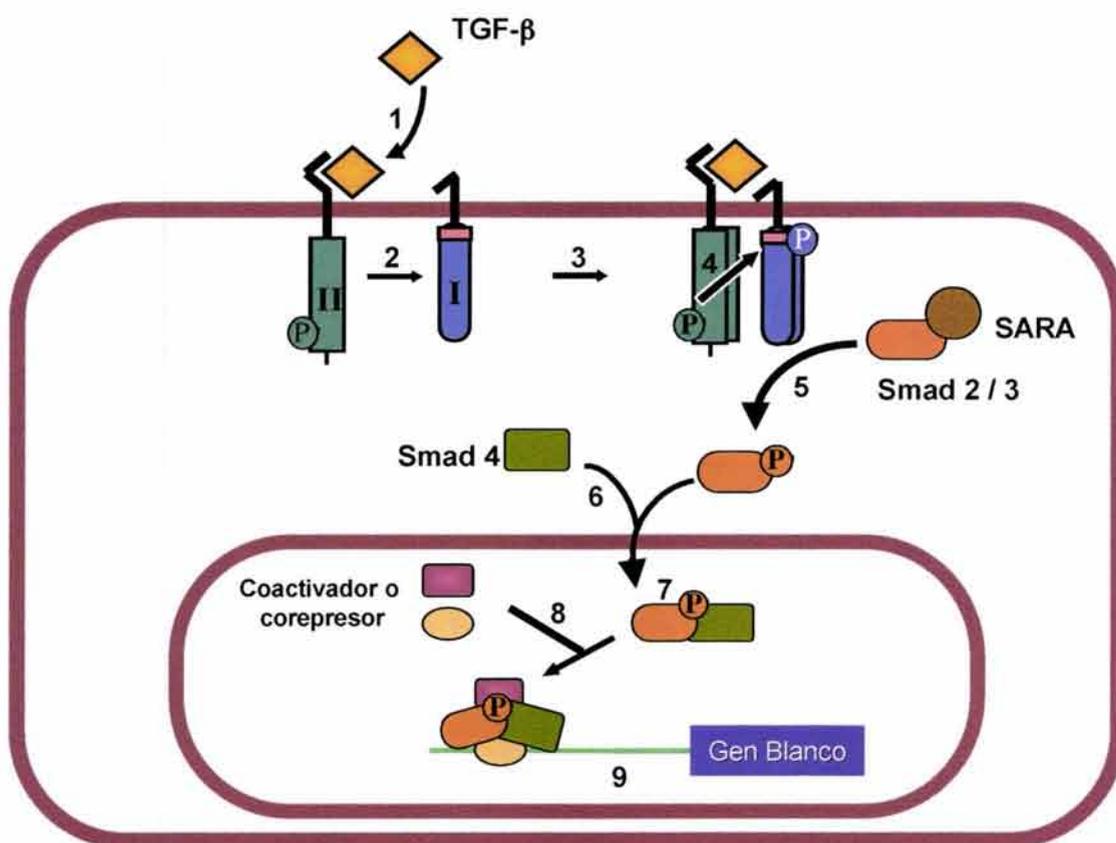


Figura 3. Vía de señalamiento del TGF-β. El TGF-β se une primero al receptor II (1). El TGF-β unido al receptor II es reconocido por el receptor I (2), lo cual induce la formación de un complejo heterotetramérico (3). La cinasa del receptor II fosforila al receptor I en su dominio GS (4) y de esa manera activa su cinasa. El receptor I activado fosforila a Smad 2 o Smad 3 en residuos de serina (5). Esta fosforilación induce su asociación con Smad 4 (6), y el complejo Smad 2/Smad 3 -Smad 4 se trasloca al núcleo (7) en donde interactúa con otros reguladores transcripcionales (8) para modular positiva o negativamente la expresión de genes regulados por el TGF-β (9). En estado basal la Smad 2 o 3 es retenida en el citoplasma por SARA. Modificado de (3).

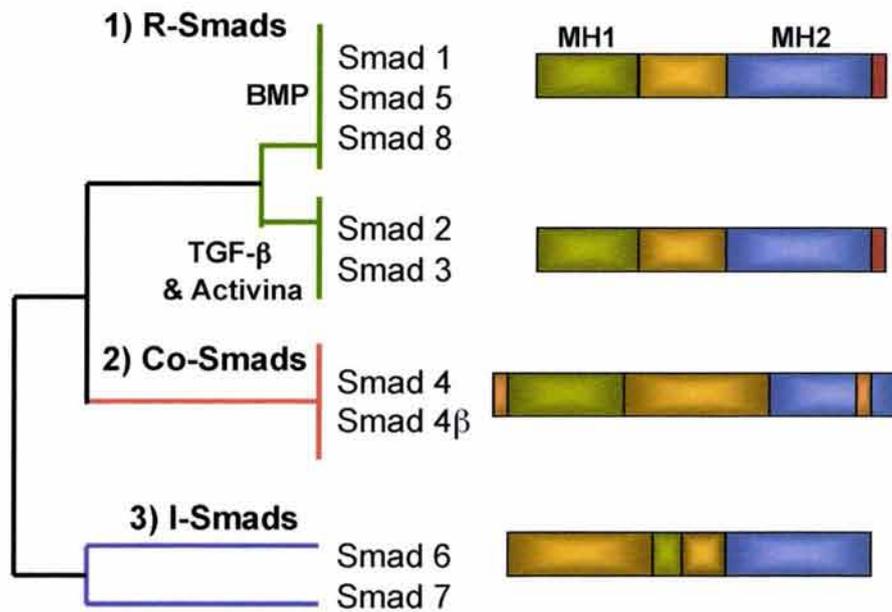


Figura 4. Familia de proteínas Smad. Dendrograma de similitud de secuencia de las tres familias de proteínas Smad. Las R-Smad y las Co-Smad tienen los dominios amino terminal MH1 (cuadro verde) y carboxilo terminal MH2 (cuadro azul) conservados. En estas familias ambos dominios están separados por una región divergente llamada región de unión (cuadro amarillo). En las I-Smads sólo el dominio MH2 está conservado. Las R-Smad presentan en la región carboxilo terminal el sitio de fosforilación (cuadro rojo). Modificado de (1).

es de tamaño y secuencia variable. En estado basal las Smad forman homo-oligómeros y permanecen en un estado inactivo a través de la interacción entre los dominios MH1 y MH2. Las R-Smad interactúan con el receptor I a través del dominio MH2 y son activadas al ser fosforiladas en el extremo carboxilo en la región MH2 en la secuencia SSXS. En estado activado las R-Smad, a través del dominio MH2, se asocian con Smad 4 y con proteínas unidoras de DNA. En algunas Smad el dominio MH1 une al DNA a través de la secuencia de nucleótidos CAGAC llamada SBE de "Smad Binding Element" (3).

Los Smad 2 y 3 tienden a localizarse de manera natural en el núcleo celular, sin embargo en estado inactivo se mantienen en el citoplasma. Esta retención está mediada en parte por su interacción con la proteína SARA (de "Smad Anchor for Receptor Activation") (39). SARA bloquea la señal de localización nuclear presente en el dominio MH2 y facilita la presentación de los Smad a los receptores I activados. La fosforilación del receptor tipo I a la Smad 2 hace que disminuya su afinidad por SARA, separándose de ésta, lo cual permite su asociación con la Smad 4 y la liberación de la señal de localización nuclear, lo que lleva a la acumulación rápida de Smad2-Smad4 en el núcleo (40).

Una vez en el núcleo, el complejo activado de R-Smad- Co-Smad se asocia con otras proteínas y de esta manera logran una alta afinidad y especificidad por el DNA. Algunas de estas proteínas no tienen actividad transcripcional propia y sólo funcionan como adaptadores de unión a DNA. En este grupo están las proteínas OAZ (de "Olf-associated zinc finger") para Smad 1 y FAST (de "Forkhead activin signal transducer") y Mixer para Smad 2 (41). Otras proteínas a las que se asocia el complejo de Smads activado son factores de transcripción que además de unir secuencias específicas de DNA, tienen la capacidad de activar o reprimir la expresión de genes. Algunos ejemplos de estos factores de transcripción son: JUNB, TFE3, CBFA/AML y LEF1/TCF. Estos factores además transducen señales de estímulos distintos al TGF- β , lo cual permite a la célula integrar diferentes señales extracelulares. El complejo activado de Smads puede reprimir o activar la transcripción de genes reclutando tanto coactivadores como corepresores transcripcionales. Entre los coactivadores están las acetilasas de histonas como p300 y CBP. Entre los represores se

encuentran las proteínas TGIF, SKI y SnoN, que se unen a desacetilasas de histonas, enzimas que favorecen la condensación de la cromatina, un proceso que reprime la transcripción de genes (38, 42).

Las I-Smads tienen una estructura diferente a las demás Smads, su dominio MH1 está truncado y no presentan el sitio de fosforilación en el extremo carboxilo del MH2. Las Smad 6 y 7 pertenecen a este grupo. La Smad 6 inhibe la vía de señalamiento de los BMP al unirse a la R-Smad y bloquear su unión con la Co-Smad (43). La Smad 7 inhibe la vía del TGF- β al unirse al receptor tipo I, lo cual bloquea la fosforilación de la R-Smad por la cinasa del receptor (44).

5. Receptores III o co-receptores del TGF- β

El betaglicano y la endoglina son los receptores tipo III o co-receptores del TGF- β . Estos co-receptores no participan directamente en la vía de señalamiento del TGF- β , pero son de gran importancia pues modulan el acceso del TGF- β a los receptores de tipo I y II.

5.1 Endoglina

La endoglina es una glicoproteína homodimérica de 180 kDa que se expresa de manera abundante en células endoteliales y en menor grado en monocitos, precursores eritroides y células estromales (28, 45, 46). El gen que codifica para la endoglina, ha sido identificado como el blanco de una enfermedad hereditaria autosómica dominante conocida como telangiectasia hemorrágica tipo I (47). Este padecimiento es una displasia vascular asociada con epistaxis frecuente, sangrado gastrointestinal, telangiectasias y malformaciones arteriovenosas en cerebro, pulmón e hígado (48). La endoglina une con alta afinidad al TGF- β 1 y al TGF- β 3, pero no une al TGF- β 2 (49). Aunque se han observado complejos entre la endoglina y los receptores para el TGF- β , el significado biológico de esta interacción se desconoce. La endoglina no favorece la unión del TGF- β a los receptores de señalamiento, al contrario, pareciera que la sobreexpresión de la endoglina en monocitos puede disminuir la respuesta del TGF- β (45). La endoglina también puede interactuar con la activina A y con la

BMP-7, sin embargo requiere de la coexpresión del receptor tipo II correspondiente para interactuar con el ligando. También une a BMP-2, pero en este caso requiere la presencia del receptor tipo I llamados ALK3 o ALK6 (50). Los significados fisiológicos de estas interacciones no se conocen.

5.2 Betaglicano membranaral

El betaglicano es un proteoglicano transmembranaral de 250-350 kDa con cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) de heparan y condroitina sulfato. El betaglicano de rata es una proteína de 853 aminoácidos, tiene un dominio extracelular muy grande con 16 cisteínas, una región transmembranaral y una pequeña cola citoplasmática de sólo 43 aminoácidos rica en serinas y treoninas y que no presenta ningún tipo de secuencia de señalamiento (29). El betaglicano tiene regiones de alta homología con diversas proteínas. La región transmembranaral y la citoplasmática tienen un 71% de similitud con la endoglina. La mitad amino terminal del ectodominio tiene un 28% de similitud también con la endoglina y se le ha llamado región E. La mitad carboxilo terminal del ectodominio tiene una alta homología con la uromodulina, una proteína abundante en la orina (49, 51) y se le ha llamado región U. Las cadenas GAGs se unen a la proteína medular del betaglicano a través de dos serinas ubicadas en la región U del ectodominio. En la serina 535 se unen principalmente cadenas de heparano sulfato, mientras que en la serina 546 se unen cadenas de condroitina y heparan sulfato (29, 51) (Fig. 5). El betaglicano con cadenas GAGs migra electroforéticamente en un intervalo de 280 a 330 kDa (29), mientras que la proteína medular del betaglicano en ausencia de las cadenas GAGs tiene una masa molecular de unos 120 kDa. El TGF- β se une al betaglicano a través de la proteína medular y no requiere de las cadenas GAGs para su unión (29, 51). Sin embargo, se ha descrito que las cadenas GAGs del betaglicano pueden unir al factor de crecimiento básico para fibroblastos (FGFb) (52). El TGF- β se une a la proteína medular del betaglicano en dos sitios, uno en la región similar a endoglina (51, 53) y el otro en la región similar a uromodulina (53, 54).

El betaglicano se expresa en varios tipos celulares como son células

BETAGLICANO

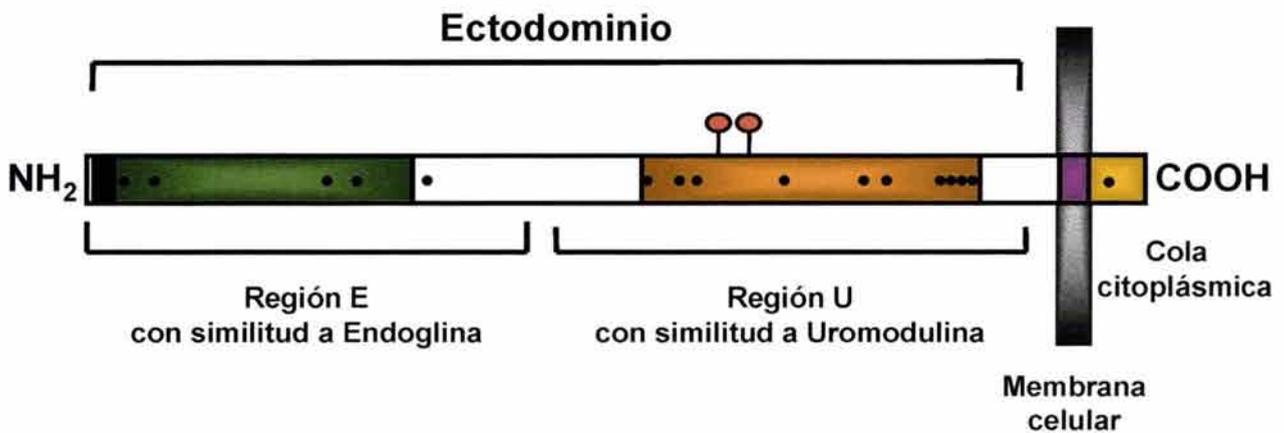


Figura 5. Estructura del betaglicano. Representación esquemática del betaglicano. La proteína medular del betaglicano de rata es un polipéptido de 853 aminoácidos. Este polipéptido está formado por una gran ectodominio y una pequeña cola citoplásmica. Está representado el péptido señal en el amino terminal (caja negra), 16 cisteínas (puntos negros), la region con similitud a endoglina (caja verde) y con similitud a uromodulina (caja naranja), la región transmembranal (caja morada) y la cola citoplásmica (caja amarilla). En el ectodominio hay dos sitios de unión a las cadenas de glicosaminoglicanos (círculos rojos).

mesenquimatosas, epiteliales, neuronales y otras. Sin embargo, no se expresa en células como mioblastos, células endoteliales y hematopoyéticas que sí responden al TGF- β (55), lo cual sugiere que el betaglicano es dispensable para la transducción de la señal del TGF- β .

El betaglicano es la proteína de unión a TGF- β más abundante en varios tipos celulares y une a las tres isoformas del TGF- β con alta afinidad (56, 57). El betaglicano facilita la unión del TGF- β al receptor tipo II con lo cual potencia el efecto del TGF- β (58). El efecto potenciador del betaglicano es más evidente con la isoforma TGF- β 2, la cual señala a través de los receptores tipo I y II, sin embargo tiene una baja afinidad intrínseca para el receptor II en ausencia de betaglicano y sus acciones son menos potentes que las del TGF- β 1 en células hematopoyéticas, células endoteliales y mioblastos que carecen de betaglicano (57-59). La sobreexpresión del betaglicano en estas células incrementa la unión del TGF- β a los receptores de señalamiento y las acciones del TGF- β 2 (58). Recientemente se desarrolló el ratón "knockout" para el betaglicano y se mostró que a partir del día 13.5 del estado embrionario presenta defectos letales en corazón e hígado, además los embriones no son viables y mueren por el día 16.5 del estado embrionario, lo cual indica que el betaglicano es requerido durante el desarrollo somático murino. En este trabajo, además mostraron que los fibroblastos primarios provenientes de los ratones "knockout" para betaglicano muestran una sensibilidad reducida al TGF- β 2. Este hallazgo y los defectos en el desarrollo del corazón que asemejan los defectos en corazón encontrados en el "knockout" para TGF- β 2 sugieren un importante papel del betaglicano como modulador del TGF- β *in vivo*; sin embargo, el fenotipo del "knockout" para el TGF- β 2 y del betaglicano son distintos en varios aspectos, lo cual sugiere que el betaglicano debe tener acciones biológicas independientes del TGF- β (60). El betaglicano también modula a otros dos miembros de la superfamilia del TGF- β : las activinas y las BMPs. Las activinas tienen como antagonistas endógenos a las inhibinas. Recientemente el betaglicano se identificó como el co-receptor que une a la inhibina e incrementa la afinidad de la inhibina por el receptor tipo II de la activina. Cuando la inhibina está unida al betaglicano también une al receptor tipo II de la activina y lo secuestra, previniendo la formación del complejo receptor tipo I/tipo II en respuesta a la

activina, y con eso se bloquea el señalamiento por activina (61) (Fig. 6). La capacidad del betaglicano de unir a la inhibina reside en la región similar a uromodulina (53). Las BMPs también utilizan al receptor tipo II de la activina, por lo que el betaglicano y la inhibina también bloquean las acciones de las BMPs a través de este receptor. El betaglicano además confiere al receptor tipo II de las BMPs la habilidad de unir a la inhibina con lo cual compite con las BMPs por la unión a su receptor y de esta manera antagoniza las respuestas de las BMPs (62). Por lo tanto, el betaglicano es un co-receptor versátil que modula a varios miembros de la superfamilia del TGF- β (Fig. 6).

La función del betaglicano como co-receptor no requiere la presencia de las cadenas GAGs, sin embargo la modificación de las cadenas GAGs puede alterar la función del betaglicano. El betaglicano presente en las células epiteliales renales LLC-PK₁ tiene GAGs de alto peso molecular y en este caso previene la asociación entre el receptor I y receptor II, con lo cual bloquea la señal del TGF- β . Mientras que en las células L6, la expresión de un betaglicano con GAGs de menor peso molecular incrementa la respuesta al TGF- β , lo que es consistente con lo que se había descrito (63)

Se ha propuesto que el betaglicano podría tener un papel más directo en alguna vía de señalamiento del TGF- β o en alguna otra vía de señalamiento. El receptor tipo II y el betaglicano participan en la transformación epitelio-mesenquimal dependiente de TGF- β 2 en el corazón (64). Sin embargo el betaglicano media respuestas diferentes a las del receptor tipo II. Cuando se bloquea al betaglicano con anticuerpos específicos se inhibe la pérdida de contacto célula-célula endotelial, uno de los procesos en la transformación epitelio-mesenquimatoso, cosa que no ocurre al bloquear al receptor II. Además existe un patrón distinto de expresión de marcadores de desarrollo cuando se bloquea al betaglicano o al receptor II. Estos datos sugieren que el betaglicano y el receptor II participan en la transformación epitelio-mesenquimal del corazón a través de vías de señalización diferentes (64, 65).

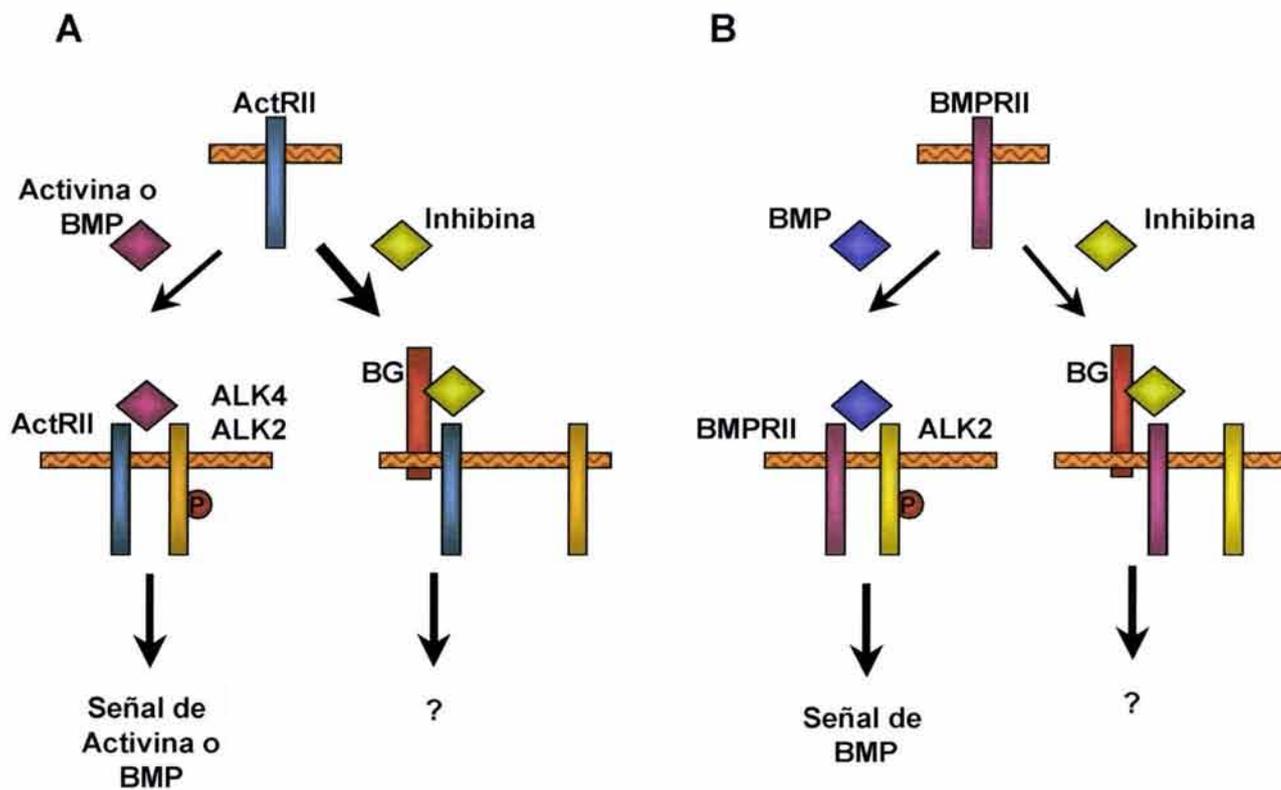


Figura 6. La inhibina con ayuda del betaglicano es un antagonista del señalamiento de la activina y de la BMP. A) En ausencia del betaglicano (BG), la activina o la BMP se unen al receptor tipo II de activina (ActRII) y forman el complejo de señalamiento con el receptor tipo I de activina (ALK4) o el receptor tipo I de la BMP (ALK2) respectivamente. Sin embargo, en presencia de betaglicano la unión de inhibina al ActRII se incrementa y se bloquea la unión de la activina o de la BMP. Se forma un complejo BG-Inhibina-ActRII, que impide el reclutamiento y la activación de ALK2 o ALK4. B) La BMP se une a su receptor tipo II (BMPRII) y a su receptor tipo I ALK2 para llevar a cabo su señalamiento. En este caso el betaglicano permite que la inhibina se una al BMPRII, con lo cual bloquea el acceso de la BMP a sus receptores y antagoniza su efecto. La diferencia entre ambos procesos es que el betaglicano incrementa la unión de la inhibina al ActRII, mientras que el betaglicano confiere al BMPRII la habilidad de unir a la inhibina. Modificado de (61).

II. BETAGLICANO SOLUBLE

Además de la forma unida a la membrana el betaglicano existe de forma soluble, el cual también puede unir al TGF- β con alta afinidad. El betaglicano soluble se ha encontrado en medios de cultivos de varias líneas celulares y en forma natural en suero fetal y matriz extracelular (66) y leche (67). Se ha propuesto que la forma soluble del betaglicano podría ser generada por un corte proteolítico del ectodominio del betaglicano membranal (29, 51). Este tipo de procesamiento proteolítico de proteínas de membrana ha sido llamado en inglés "ectodomain shedding". La evidencia que sugiere que el betaglicano sufre un corte proteolítico es que células que carecen de este receptor al ser transfectadas con el cDNA que codifica para el betaglicano membranal liberan al medio al receptor soluble (29). Sin embargo, la actividad proteolítica responsable del corte aún no se ha caracterizado

El betaglicano soluble que se produce de manera recombinante, a diferencia del betaglicano membranal, actúa como un potente inhibidor del TGF- β (51, 68). Vilchis-Landeros y cols. han preparado y caracterizado la forma soluble del betaglicano recombinante usando el sistema de expresión del baculovirus en células de insecto. El betaglicano soluble recombinante baculoviral comprende todo el ectodominio del receptor, se expresa como una proteína homodimérica, con monómeros de 110 kDa, unidos no covalentemente y a diferencia del betaglicano soluble natural el betaglicano soluble recombinante no presenta cadenas de glicosaminoglicanos (68). El betaglicano soluble recombinante evita la unión del TGF- β a los receptores de señalamiento I y II (51). También inhibe la actividad biológica del TGF- β en varios ensayos *in vitro*; por ejemplo, en ensayos con células Mv1Lu donde se usa un reportero sensible al TGF- β acoplado a la luciferasa, el betaglicano soluble recombinante inhibe la inducción de la luciferasa. Esta inhibición depende de la concentración del betaglicano soluble y tiene una potencia similar a la de un anticuerpo neutralizante del TGF- β (68). Además, el betaglicano soluble recombinante también es capaz de bloquear el efecto del TGF- β *in vivo*. El betaglicano soluble tiene un efecto protector del daño renal en el modelo de glomerulonefritis experimental en ratas, pues disminuye el depósito de fibronectina, colágena I y IV en el glomérulo y la síntesis de la

cinasa SGK en el riñón (69). Además, el betaglicano soluble recombinante ha mostrado una actividad antitumoral en un modelo animal de cáncer (70). Por lo tanto, se ha propuesto que el betaglicano soluble recombinante podría ser usado como un potente agente anti-TGF- β *in vivo*.

Los hallazgos con el betaglicano soluble recombinante sugieren que el betaglicano tiene una función dual y puede funcionar como un modulador de las acciones del TGF- β : el betaglicano anclado a la membrana incrementa la unión del TGF- β a los receptores de señalamiento, mientras que el betaglicano soluble inhibe esta unión y por lo tanto bloquea las acciones del TGF- β (51) (Fig. 7).

III. CORTE PROTEOLITICO DE PROTEINAS TRANSMEMBRANALES O "ECTODOMAIN SHEDDING"

Numerosas proteínas transmembranales son liberadas de la superficie celular por un corte proteolítico en su región extracelular. Este proceso postraducciona se ha llamado en inglés "ectodomain shedding" o "shedding". En esta tesis se identificará a este proceso por su nombre en inglés debido a que no existe una traducción biológica en castellano y para que no exista confusión. El "shedding" afecta a una gran variedad de proteínas de la superficie celular, entre las que se encuentran factores de crecimiento, citocinas, receptores, moléculas de adhesión y el precursor del péptido β -amiloide. El corte proteolítico de las proteínas transmembranales altera su actividad biológica y tiene un papel importante en procesos fisiológicos y patológicos (71-75). Se conoce muy poco de los mecanismos que regulan el proceso de "ectodomain shedding", sin embargo las evidencias experimentales indican que tiene características que son comunes entre si: a) es realizado por metaloproteasas dependientes de zinc; b) puede ser activado por estímulos que encienden una vía de señalamiento; c) es un evento rápido que no requiere síntesis de proteína nueva.

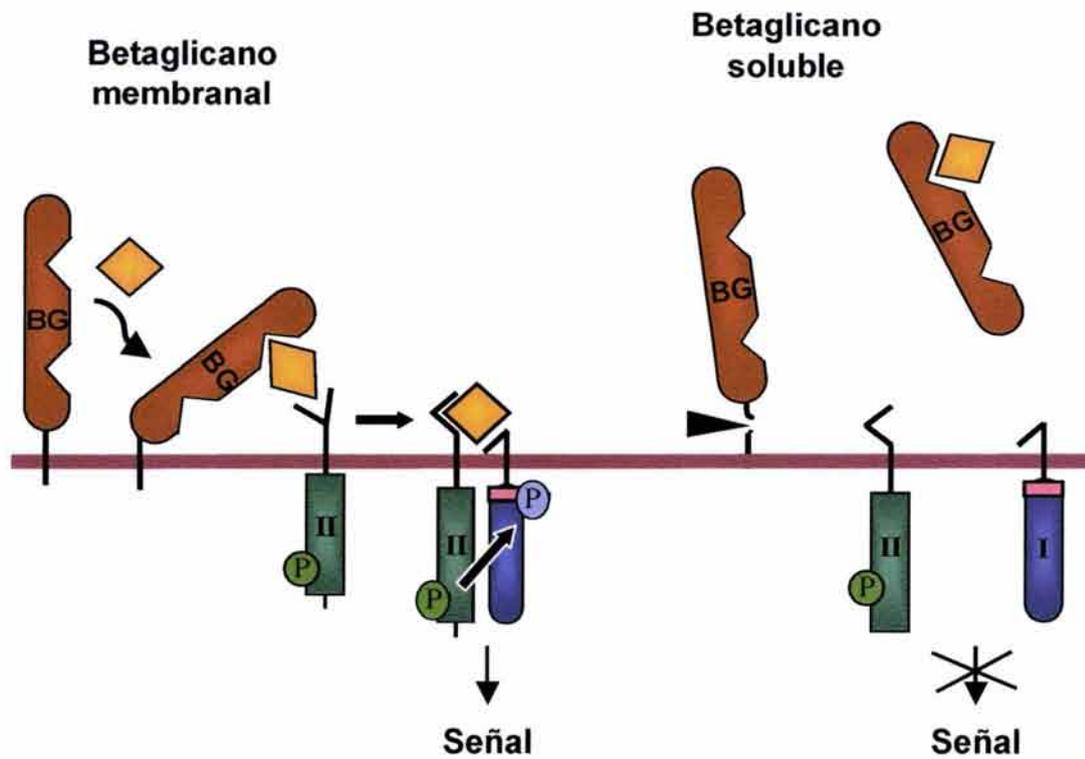


Figura 7. El betaglicano como modulador de la actividad del TGF-β. El betaglicano membranal potencia los efectos del TGF-β, facilitando la unión de este factor al receptor II. El betaglicano soluble se genera por un corte proteolítico del betaglicano membranal. El betaglicano soluble secuestra al TGF-β y previene su unión a los receptores I y II, inhibiendo su actividad.

1. Proteasas involucradas en el corte del ectodominio de proteínas transmembranales

En 1994 varios grupos determinaron que los inhibidores derivados del ácido hidroxámico, conocidos por bloquear a las metaloproteasas dependientes de zinc, también tenían la capacidad de inhibir el "shedding" del pro-TNF- α (76-78). Posteriormente se ha demostrado que este tipo de inhibidores puede bloquear a la gran mayoría de los procesos de "shedding" (75).

Bajo el nombre de metaloproteasas se agrupan varias familias de proteasas que tienen en común el requerimiento para su funcionamiento catalítico de un catión metálico bivalente, generalmente el zinc. Entre las metaloproteasas está la superfamilia de las metzincinas. Esta superfamilia se caracteriza por tener en su dominio catalítico un sitio de unión a zinc y por tener una metionina conservada que forma una estructura particular llamada "vuelta de metionina" (Met-turn) (79). Dentro de la superfamilia de las metzincinas, existen dos familias de metaloproteasas estructuralmente relacionadas: las metaloproteasa-desintegrinas también conocidas como ADAMs o MDCs (de "A Disintegrin And Metalloprotease domain" y de "Metalloprotease/Disintegrin/Cystein-rich", respectivamente) (74, 80, 81), y las metaloproteasas de la matriz extracelular conocidas como MMP (de "matrix metalloproteinase") (Fig. 8).

2. Familia de metaloproteasas-disintegrina ADAM y "shedding"

Las ADAM son una familia de glicoproteínas transmembranales que se caracterizan por tener dos funciones distintas: función de adhesión y actividad de proteasa (74, 81, 82). Las ADAM están formadas por varias regiones: el péptido señal, el prodominio que bloquea la actividad de proteasa, la región de metaloproteasa, la región de disintegrina con actividad de adhesión, la región rica en cisteínas, la región parecida a EGF, la región transmembranal y la región citoplásmica. Algunas presentan un sitio de corte por furina (Fig. 8). Hasta el momento se han descrito 29 cDNA de metaloproteasa-desintegrinas ADAM. Aunque todas presentan la región de metaloproteasa y la región de disintegrina, no se sabe si ambas

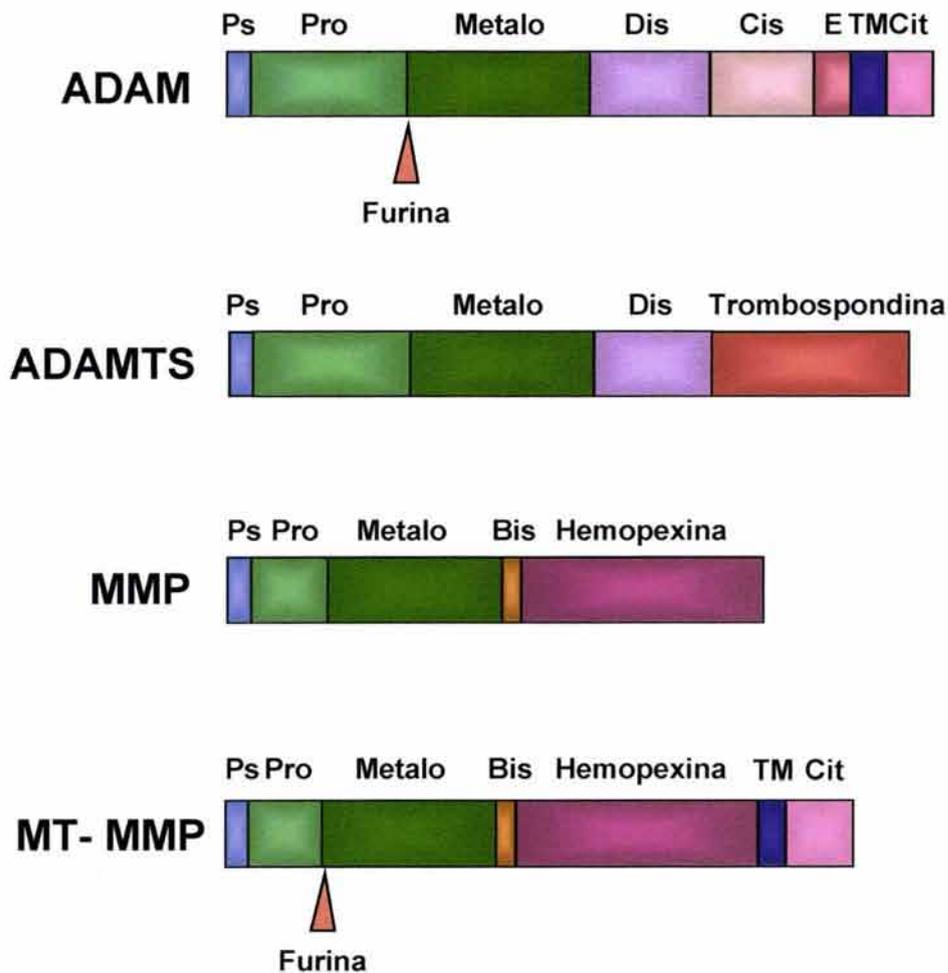


Figura 8. Estructura general de distintas familias de metaloproteasas. Péptido señal (Ps); Prodominio (Pro); sitio catalítico de la metaloproteasa (Metalo); región de disintegrina (Dis); región rica en cisteínas (Cis); región parecida a EGF (E); región transmembranal (TM); región citoplásmica (Cit); región de trombospondina; región de bisagra (Bis); región de hemopexina. En las ADAM y las MT-MMP existe un sitio de corte reconocido por furina (triángulo rojo) entre el prodominio y el sitio catalítico. Modificado de (79).

regiones son activas al mismo tiempo en una misma ADAM.

De los 29 cDNAs de ADAMs descritos, sólo 17 tienen la secuencia del sitio activo de una metaloproteasa funcional. Las 12 ADAMs restantes presentan el dominio de metaloproteasa, pero tienen cambios en los aminoácidos del sitio activo que las hacen teóricamente no funcionales (81). Las ADAM involucradas en el corte del ectodominio de proteínas transmembranales son: ADAM 17, ADAM 10 o Kuzbanian, ADAM 9, ADAM 19 y ADAM 12.

La primera metaloproteasa involucrada en el corte del ectodominio de una proteína transmembranal identificada fue la que corta al proTNF- α (de "tumor necrosis factor- α "). La proteasa resultó ser la ADAM 17 y se le dio el nombre de TACE (por "tumor necrosis factor- α converting enzyme) (82, 83). La obtención de ratones "knockout" y de líneas celulares que expresan una forma no funcional de TACE, ha permitido demostrar que esta enzima también corta el ectodominio de una gran variedad de otras proteínas que incluyen: los receptores I y II para TNF, la molécula de adhesión L-selectina, el proTGF- α (84), el precursor del β -amiloide (β APP) en el sitio de la α -secretasa (85), el receptor II de IL-1 (86), el receptor α de IL-6 (87), el receptor con actividad de cinasa de tirosina HER4 (88) y el receptor Notch (89).

Aunque TACE se considera la metaloproteasa preponderante en el corte de proteínas transmembranales, algunos estudios han demostrado que otras metaloproteasas de la familia ADAM también están involucradas en este proceso (Tabla 1). Se ha propuesto que la metaloproteasa ADAM 9 es capaz de cortar el ectodominio de uno de los ligandos del receptor a EGF, el proHB-EGF (de "heparin-binding EGF-like growth factor") en células Vero (90). Sin embargo, aún no se ha demostrado si ésta es capaz de cortar directamente al proHB-EGF en el sitio correcto, o si bien es otra proteasa la responsable del corte *in vivo*. De hecho, de manera reciente se ha demostrado que fibroblastos provenientes de ratones que carecen de TACE (células *tace* $-/-$) son deficientes en el corte de proHB-EGF (91). Esto abre la posibilidad de que proHB-EGF es sustrato de varias metaloproteasas dependiendo del tipo celular.

Tabla 1. Metaloproteasas involucradas en el corte de proteínas transmembranales

Metaloproteasa	Sustrato propuesto	Referencia
Metaloproteasas Disintegrinas		
ADAM 9	proHB-EGF	(90)
	β APP	(168)
ADAM 10	Delta	(92)
	β APP	(93)
	L1	(95)
	proHB-EGF	(169)
ADAM 12	proHB-EGF	(96)
ADAM 17 o TACE	proTNF- α	(82, 83)
	proTGF- α	(84)
	proHB-EGF	(91)
	Receptor II p75 de TNF- α	(84)
	Receptor p55 de TNF- α	(84)
	Receptor α de IL-6	(87)
	HER-4	(88)
	L-Selectina	(84)
	β APP	(85)
	Receptor Notch	(89)
ADAM19	Neuregulina	(97)
MMP		
MMP-1 (colagenasa-1)	proTNF- α	(100)
MMP-9 (gelatinasa B)	proTNF- α	(100)
MMP-3 (estromelisina-1)	Fas membranal (FasL)	(102)
MMP-7 (matrilisina)	Fas membranal (FasL)	(103)
MMP-2 (Gelatinasa A)	Receptor de FGF	(104)
MMP-3	proHB-EGF	(105)
MT1-MMP	proTNF- α	(113)
	TRANCE	(114)
	CD44	(115)
	Transglutaminasa membranal	(164)
MT3-MMP	CD44	(115)
MT4-MMP	proTNF- α	(110)

La ADAM 10 corta al ligando del receptor Notch, llamado Delta (92) y al precursor del β -amiloide (β APP) en el sitio de la α -secretasa en células embrionarias de riñón humano (células HEK) (93). La ADAM 10 recombinante es capaz de cortar péptidos de TNF- α *in vitro* en el mismo sitio de corte de TACE, aunque con menor sensibilidad (94). La ADAM 10 también media el corte de la molécula de adhesión L1 tanto en la superficie celular como en membranas vesiculares (95).

La ADAM 12 o meltrina α tiene actividad de proteasa en sustratos no fisiológicos (81). Sin embargo, en un estudio realizado en cardiomiocitos de ratón, se demostró que la activación de receptores acoplados a proteínas G estimulan a ADAM 12 la cual corta al proHB-EGF. Inclusive en este trabajo proponen que el "shedding" de proHB-EGF por ADAM 12 juega un importante papel en la hipertrofia cardíaca y proponen la inhibición de este corte como una estrategia terapéutica importante (96). Por último, la ADAM 19 o meltrina β se ha relacionado con el procesamiento de la neuregulina, un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico EGF (97).

Recientemente se clonaron nuevos miembros de la familia ADAM, llamados las ADAMTS (de "A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs"). Estas proteínas tienen varios dominios de las ADAM conservados, pero además se distinguen por tener motivos de trombospondina tipo I que se unen a cadenas de glicosaminoglicanos (Fig. 8). Las ADAMTS no poseen región transmembranal, por lo que son proteasas secretadas al medio a diferencia de las ADAM que son proteínas transmembranales que se localizan en la superficie celular. Algunas de las funciones que se han descrito para estas proteínas son: remueve proteolíticamente aminoácidos en el procesamiento de la procolágena a colágena; tiene actividad de agrecanasa, pues tienen la habilidad de cortar en sitios específicos al agrecan, un proteoglicano que mantiene las propiedades mecánicas del cartílago y tener actividad antiangiogénica (98).

3. Familia de metaloproteasas de la matriz o MMP y "shedding"

Las metaloproteasas de la matriz o MMPs han sido ampliamente estudiadas puesto

que degradan componentes de la matriz extracelular en varios fenómenos fisiológicos como el crecimiento, la morfogénesis, la reparación de tejidos y en algunas situaciones patológicas como la migración celular en inflamación y metástasis (99).

Las MMP están formadas por el péptido señal, el prodominio que bloquea la actividad de proteasa, la región catalítica con el sitio de unión a zinc con actividad de metaloproteasa, la región de bisagra y la región c-terminal parecida a hemopexina requerida para cortar colágena de triple hélice (Fig. 8). Otras regiones que también pueden estar presentes en uno o más miembros de la familia son: un sitio de corte para furina antes del sitio catalítico, una región parecida a fibronectina y una región similar a colágena V (79).

Existen pocos reportes en donde se han identificado a miembros de la familia de MMPs como responsables del corte del ectodominio de proteínas transmembranales. La MMP-1 (colagenasa 1) y MMP-9 (gelatinasa B) pueden cortar péptidos de TNF- α *in vitro* (100). Estas proteasas cortan en dos sitios, uno de los cuales es igual al sitio donde corta TACE. La MMP-7 o matrilisina se identificó como la proteasa del pro-TNF- α en estudios con macrófagos de ratones "knockout" para la MMP-7 (101). Sin embargo en estos estudios no se vio si hay interacción directa entre el proTNF- α y la matrilisina, lo cual no descarta que otra proteasa sea la responsable del corte y que la matrilisina sólo esté activando a esa otra proteasa. También se ha propuesto que la MMP-3 (estromelisina-1) puede cortar al ligando de Fas membranar (FasL) (102). En otro estudio, con proteínas recombinantes *in vitro*, se demostró que FasL es sustrato directo de la MMP-7 (103). La MMP-2 (gelatinasa A) recombinante es capaz de cortar el ectodominio del receptor 1 para FGF (de "Fibroblast growth factor") tanto *in vitro*, como en células que sobreexpresan el receptor (104). En un estudio similar demostraron que MMP-3 recombinante corta al proHB-EGF *in vitro* y en células que sobreexpresan el proHB-EGF (105) (Tabla 1).

Las MT-MMP (de "Membrane-Type Matrix Metalloproteinases") son una subfamilia de las MMP que se caracterizan por estar ancladas a la membrana. Presentan las mismas regiones que las MMP, pero además tiene una región transmembranar y una región citoplásmica pequeña (79) (Fig. 8).

Hasta el momento se han clonado 6 distintas MT-MMP (106-111). Las MT-MMP son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular, sin embargo una de sus funciones más estudiadas es la de activar a la pro-MMP-2 (112). De estas proteasas, las MT1-MMP, MT3-MMP y la MT4-MMP son las únicas que se ha demostrado que cortan el ectodominio de proteínas transmembranales. La MT1-MMP es capaz de cortar a una proteína de fusión GST-TNF- α *in vitro* (113). Cuando la MT1-MMP se sobreexpresa en células aumenta el "shedding" de TRANCE (de "TNF-related activation induced cytokine"), un miembro de la familia del TNF que está relacionado con la diferenciación de osteoclastos (114). Se ha sugerido que la MT3-MMP es capaz de cortar directamente al receptor CD44 (115). *In vitro*, el sitio catalítico de la MT4-MMP puede cortar péptidos de TNF- α , así mismo, la cotransfección de MT4-MMP y de pro-TNF- α en células COS-7 hace que aumente de manera significativa la liberación de TNF- α al medio (110) (Tabla 1). En el caso de esta subfamilia aún no se han realizado estudios con ratones "knockout" para determinar si alguna de estas proteasas está involucrada en el corte de una proteína, que es uno de los criterios más importantes.

Las evidencias experimentales indican que una misma proteína puede ser cortada por distintas proteasas, como es el caso de pro-TNF- β , proHB-EGF o β APP (ver Tabla 1). Una posibilidad es que dependiendo el tipo celular sean sustrato de diferentes metaloproteasas, aunque no está claro si sólo una o varias proteasas pueden cortar a la misma proteína *in vivo*.

4. Remoción del prodominio de las metaloproteasas

Las metaloproteasas son sintetizadas como proenzimas, en donde el prodominio bloquea el sitio catalítico y las mantiene inactivas. El prodominio tiene en su secuencia una cisteína que interactúa con el Zn^{2+} del sitio catalítico, lo que previene la asociación del Zn^{2+} con una molécula de agua, lo cual es requerido para la actividad catalítica de la enzima. Este proceso se conoce como "switch de cisteína" y esta hipótesis postula que para que la enzima se active el prodominio debe eliminarse o bien debe interrumpirse la interacción de la

cisteína con el Zn^{2+} (79) (Fig. 9). Las metaloproteasas solubles MMPs se secretan al medio celular como proenzimas que son activadas extracelularmente. Mientras que las ADAM y las MT-MMPs tienen un sitio de corte entre el prodominio y el dominio catalítico y son activadas intracelularmente por la eliminación proteolítica del prodominio por convertasas de proproteínas intracelulares como la furina o la PC7, que actúan en el *trans-Golgi* (74, 79, 116). El procesamiento por las convertasas de proproteínas se considera un proceso constitutivo, sin embargo, varios reportes indican que puede ser un proceso regulado. Por ejemplo, la sobreexpresión de la PC7 lleva a un aumento en el corte del β APP (117), mientras que en células que carecen de furina, el corte de β APP es deficiente (118). Por lo tanto, el aumento o la disminución en la actividad de la proproteína convertasa puede ser un punto de regulación de la actividad de metaloproteasas responsables de "shedding".

5. Los inhibidores tisulares de las metaloproteasas o TIMPs

Los TIMP (de "Tissue Inhibitor of Metalloprotease Protein") son los inhibidores endógenos que regulan la actividad de las metaloproteasas en los tejidos. Estos inhibidores son proteínas que se unen al sitio activo de la metaloproteasa. Los TIMP forman complejos uno a uno con la metaloproteasa y la alteración de este balance puede resultar en enfermedades neurológicas, artritis, cáncer, y fibrosis (112). Hasta el momento se han identificado 4 tipos distintos de TIMPs. Los TIMP difieren en su especificidad para las metaloproteasas y los patrones de inhibición de las TIMP son uno de los criterios útiles para distinguir el tipo de metaloproteasa que puede estar involucrada en el corte de cierta proteína transmembranal. La familia de metaloproteasas MMP en general es sensible a los 4 TIMPs (112). Los miembros de la familia ADAM en general sólo son inhibidos por el TIMP-3 (119). De la subfamilia de metaloproteasas ancladas a la membrana, la MT1 es inhibida por TIMP-2 y TIMP-3 (107), las MT2 y MT5-MMP son inhibidas por TIMP-2, pero no por TIMP-1 (107, 109), mientras que MT4-MMP puede ser inhibida por TIMP-1, y en menor medida por TIMP-2 y -3 (110) (Tabla 2).

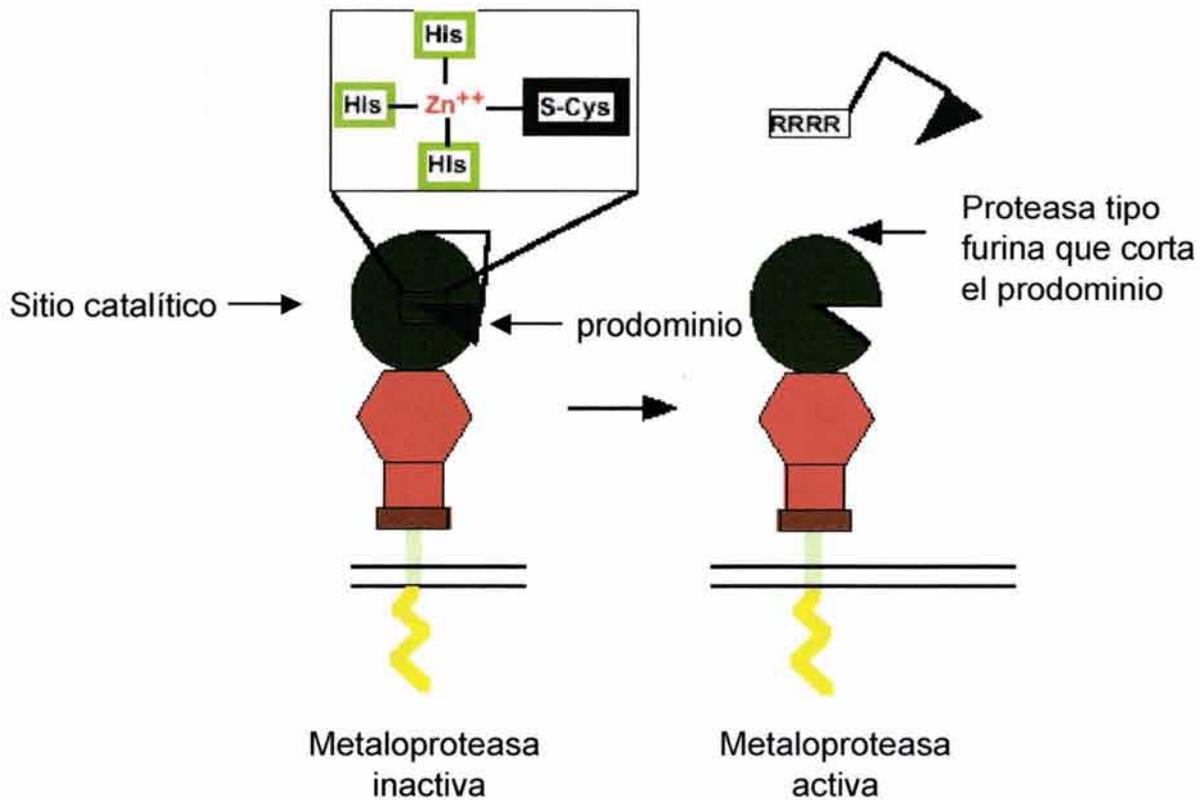


Figura 9. Mecanismo de activación “switch de cisteínas” de las metaloproteasas. Se ejemplifica a las ADAM, pero el mecanismo de “cysteine switch” también ocurre para las MMP y las MT-MMP. El prodominio tiene en su secuencia una cisteína que interactúa con el Zn²⁺ del sitio catalítico, esto previene la asociación del Zn²⁺ con una molécula de agua, lo cual es requerido para la actividad catalítica de la enzima. Para que la enzima se active el prodominio debe removerse. En las MMP la remoción del prodominio ocurre fuera de la célula, mientras que en las ADAM y MT-MMP una proteasa tipo furina remueve el prodominio de manera constitutiva en el *trans-Golgi*. Modificado de (74).

Tabla 2. Inhibición de las distintas subfamilias de metaloproteasas por los TIMPs

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
MMP-1	++	++	++
MMP-2	++	++	++
MMP-3	++	++	++
MMP-7	++	++	++
MMP-9	++	++	++
ADAM 8	-	-	-
ADAM 9	-	-	-
ADAM 10	++	-	++
ADAM 12	-	-	+
ADAM 17	+	-	++
MT1-MMP	-	++	++
MT2-MMP	-	++	nd
MT3-MMP	-	++	nd
MT4-MMP	++	+	+
MT5-MMP	-	++	nd
MT6-MMP	++	+	+
ADAMTS-1	-	+	+
ADAMTS-4	++	nd	++
ADAMTS-5	nd	nd	++

- no inhibe; + poca inhibición; ++ alta inhibición y nd no determinado

6. Inhibidores sintéticos

La mayor parte de los inhibidores sintéticos preparados para bloquear a las metaloproteasas tienen un grupo de unión a zinc capaz de quelar al Zinc del sitio activo. Algunos de los grupos de unión a zinc usados son: hidroxamatos, formilhidroxilaminas, sulfhidrilos, fosfinatos, aminocarboxilatos y carboxilatos (120). Muchos de los estudios de los inhibidores de metaloproteasas usados en medicina se han enfocado en los hidroxamatos. Uno de los primeros hidroxamatos desarrollados fue el BB-94 o batimastat, el cual es un inhibidor de amplio espectro y se ha usado *in vivo* para bloquear el crecimiento de tumores y metástasis en diferentes modelos animales de cáncer. El BB-94 se ha usado con éxito en un modelo de carcinoma mamario en rata (121), en colon humano en ratones desnudos (122), entre otros. En 1994, varios grupos determinaron que los inhibidores derivados de hidroxamatos eran capaces de bloquear el "shedding" del pro-TNF- α (76-78). Posteriormente usando diferentes inhibidores sintéticos de metaloproteasas se vio que también bloqueaban el "shedding" de la mayoría de las proteínas transmembranales que son cortadas. Desde entonces estos inhibidores se han usado de manera rutinaria para caracterizar el corte de muchas proteínas transmembranales y en la mayor parte de los casos se ha visto que lo previenen. El TAPI-2 es un inhibidor de amplio espectro derivado de hidroxamato que en un inicio también se usó para inhibir el "shedding" del pro-TNF- α (123). En la actualidad se están desarrollando inhibidores sintéticos más específicos, tal es el caso del BMS-275291, un inhibidor de metaloproteasas derivado de sulfhidrilo. Este inhibidor bloquea a varias metaloproteasas solubles de la familia MMP, sin embargo no afecta la actividad de metaloproteasas asociadas con el "shedding" del pro-TNF- α , el receptor del TNF- α , el receptor de IL-6 o la L-selectina (124).

7. Corte activable

Una característica del corte del ectodominio de la mayoría de las proteínas membranales es que puede ser activado con ciertos estímulos fisiológicos o compuestos sintéticos. Entre los estímulos fisiológicos están: factores de crecimiento (125), citocinas

(71), suero (126), el mediador de inflamación fMLP (N-formilmetionil-leucil fenilalanina) en el corte de L-selectina (125), acetilcolina en el corte de β APP (127) y el lipopolisacárido LPS. El corte de los receptores puede ser activado por el propio ligando, como por ejemplo el de los receptores para IL-2, IL-4 y TNF- α (71). El corte de sindecán-1 puede ser activado por *Pseudomonas aeruginosa in vivo* (128).

Entre los compuestos sintéticos que activan el corte del ectodominio de proteínas, el más usado y caracterizado ha sido el éster de forbol 12-miristato-13-acetato (PMA). En algunos casos los ionóforos de calcio y el pervanadato también activan el corte (74, 129, 130).

En muy pocos casos ha sido posible determinar los estímulos fisiológicos que inducen el corte de cada proteína transmembranal y sólo se ha podido determinar el estímulo sintético que lo activa. Sin embargo, no se conoce hasta donde el corte activado con estos estimuladores sintéticos refleja la activación de metaloproteasas por estímulos fisiológicos.

Los factores de crecimiento estimulan el corte de varias proteínas por la activación de receptores con actividad de cinasas de tirosina a través de la inducción de la vía de ERK de las MAP cinasas. Es el caso del "shedding" de pro-TGF- α (125), proHB-EGF (131), Sindecán-1 y -4 (132) y el receptor para factor de crecimiento de hepatocitos, c-Met (133).

Los agonistas de los receptores acoplados a proteína G también son activadores del "shedding" de los ectodominios de varias proteínas. Un estudio reciente demuestra que la estimulación de los receptores acoplados a proteínas G causan un incremento en el "shedding" del proHB-EGF, produciendo HB-EGF soluble que a su vez estimula al receptor de EGF (134). De esta manera se explicaría el diálogo o "cross talk" entre los receptores acoplados a proteínas G y el receptor a EGF que se conocía desde hace tiempo, pero del cual no se conocía el mecanismo.

El PMA es el estímulo sintético que más se usa para inducir el corte de muchas proteínas membranales. Debido a que el PMA es un activador de la Proteína Cinasa C (PKC), se ha pensado que esta proteína podría estar controlando el corte activado con PMA (84, 135). En algunos casos sí se ha visto la participación directa de la PKC en la inducción

del corte con PMA, como es el caso de Sindecán-1 y -4 (132) y del proHB-EGF (90). Aunque también se ha sugerido que la estimulación del corte con PMA no es consecuencia directa de la actividad de la PKC, sino que se debe a la inducción de la vía de señalamiento de ERK dada directamente por el PMA y en parte por la PKC (125, 130, 131).

El pervanadato, que es la combinación equimolar de ortovanadato de sodio y de peróxido de hidrógeno, es un potente inhibidor de fosfatasa de tirosina que permite la activación de cinasas que normalmente se inactivan por desfosforilación (136). El pervanadato inhibe oxidando de manera irreversible la cisteína del sitio catalítico de las fosfatasa de tirosina (137). De hecho, la oxidación reversible de la cisteína del sitio catalítico de las fosfatasa se está considerando como un mecanismo de regulación general de estas enzimas, aunque apenas se está caracterizado (138). Algunas proteínas transmembranales que no activan su corte por PMA sí lo hacen al ser tratadas con pervanadato, como es el caso de TRANCE (114) y del receptor HER2 (129). Se conoce muy poco de las vías de señalamiento específicas involucradas en el corte activado por pervanadato. En un estudio se vio que la estimulación del corte de la molécula de adhesión L1 dada por el pervanadato puede ser bloqueada por un inhibidor de la familia Src de cinasas de tirosina (130). Otro reporte menciona que la activación del corte de TRANCE por pervanadato no es bloqueada por inhibidores de la vía de la cinasa MAP p38 o de la cinasa ERK (114), sin embargo no se conoce el mecanismo molecular. Finalmente, el corte de β APP estimulado por pervanadato no es bloqueado por inhibidores de la PKC (139), lo que indica que la vía de señalamiento involucrada en el corte activado por pervanadato debe ser distinta a la activada por el PMA.

8. Corte constitutivo

En cultivos celulares varias proteínas son cortadas y liberadas al medio extracelular en ausencia de cualquier estimulación celular por agentes externos (72). A este tipo de corte se le conoce como "shedding" basal o constitutivo y aunque los mecanismos que regulan este proceso se desconocen, probablemente se debe a proteasas constitutivamente activas que

participan en el recambio celular de proteínas de la superficie celular (140). En algunos casos el corte constitutivo de una proteína transmembranal se realiza por una metaloproteasa diferente a la que realiza el corte activado. Esto se ha sugerido a partir de las observaciones de que el corte constitutivo y el activado se inhiben por distintos TIMP, ocurren en distinto sitio y están regulados por diferentes vías de señalamiento. Por ejemplo, en el caso del pro-TGF- α y del pro-TNF- α el corte constitutivo se debe a la vía de la cinasa MAP p38, mientras que el corte activado por factores de crecimiento o PMA se debe a la vía de la cinasa ERK (125). O bien en el caso de TRANCE, en donde el corte inducido por pervanadato es inhibido por TIMP-2, pero el constitutivo no es inhibido por TIMP-1 o TIMP-2, además de que ambos cortes ocurren en distinto sitio (114).

9. Posibles mecanismos de activación de las proteasas

El mecanismo por el cual la activación de cierta vía de señalamiento intracelular lleva a un aumento en la actividad proteolítica de una metaloproteasa no se conoce. Se proponen varias posibilidades: la metaloproteasa puede estar ubicada en un lugar aislada de su sustrato y, en respuesta a un evento de señalización, la localización de la metaloproteasa puede cambiar de tal manera que entre en contacto con su sustrato. Otra alternativa es que el evento de señalización haga que el inhibidor TIMP se disocie de la metaloproteasa, permitiendo su actividad. Una posibilidad más es que la cascada de señalamiento modifique la región citoplasmática de la proteasa o del sustrato, lo cual se refleje en un cambio conformacional en la región extracelular de la proteasa activándola, o del sustrato haciendo que el sitio de corte sea accesible (74, 99). Actualmente se están explorando experimentalmente varias de estas posibilidades, sin embargo la manera en que la actividad de TACE y otras metaloproteasas es regulada aún se desconoce y permanece como una de las preguntas más desafiantes en el campo.

10. El modelo de la maquinaria común de "shedding"

El hecho de que las proteínas membranales sustratos de "shedding" son muy

heterogéneas y no presentan una secuencia consenso en su sitio de corte, sugiere que deben existir proteasas específicas para el corte de cada una de ellas. Sin embargo, las evidencias experimentales indican que existe una maquinaria que es común para el "shedding" de varias de estas proteínas (135). Esto se sugirió a partir del estudio de una línea celular CHO mutagenizada químicamente incapaz de liberar TGF- α soluble al medio extracelular (141). La caracterización posterior de esta línea, denominada M1 o M2, indica que estas células también son deficientes en el corte de muchas proteínas membranales no relacionadas entre sí, incluyendo β APP, L-selectina, receptor para IL-6, pro-TNF- α y proHB-EGF (135, 141, 142). Posteriormente varios estudios han determinado que todas estas proteínas son cortadas por TACE, por lo que se pensó que las mutantes M1 o M2 podrían tener un defecto en esta metaloproteasa. Sin embargo, al transfectar a TACE en estas células mutantes no se recuperó el fenotipo silvestre (142). Además, cuando las células CHO mutantes se fusionaron con fibroblastos que carecían de TACE, las células híbridas si recuperaron la habilidad para cortar al pro-TNF- α , pro-TGF- α y β APP (142). A partir de estos resultados se sugirió que la mutación en las células CHO debía afectar a un componente común que controla la actividad de TACE y quizás a otras metaloproteasas. En un trabajo reciente se determinó que la mutación en estas células es un defecto en la eliminación del prodominio de TACE que hace que se quede en su forma inactiva (116). Sin embargo, este defecto no se debe a una deficiencia en la actividad de las proteasas convertasas como la furina, que procesan el prodominio, sino a un bloqueo en la salida de TACE del retículo endoplásmico (116). Además de manera importante en este trabajo se determinó que otras proteasas que también cortan proteínas de membrana no están afectadas en estas células CHO mutantes y sólo está afectada TACE.

11. Función biológica de proteínas membranales solubles

Aunque en muchos casos el significado fisiológico del corte de las proteínas transmembranales no se ha definido, existen algunos estudios que demuestran la función biológica de las moléculas solubles *in vivo*. Además, las metaloproteasas del tipo ADAM

tienen un papel esencial durante el desarrollo de mamíferos, lo cual se hizo evidente a partir de la observación de que los ratones mutantes que carecen de la metaloproteasa TACE tienen defectos perinatales y postnatales (84). A continuación se describen algunos ejemplos de la actividad biológica de proteínas transmembranales que son cortadas.

11.1 Receptores membranales

El efecto biológico de los receptores solubles depende de su interacción con su ligando y con el receptor anclado a la membrana. La mayor parte de los receptores solubles retienen su habilidad para unir al ligando y su función más común es la de competir con el receptor anclado a la membrana por la unión al ligando. La potencia del receptor soluble como inhibidor competitivo está determinada por su afinidad por el ligando comparada con la afinidad del receptor membranal. En algunos casos los receptores solubles estabilizan al ligando y lo protegen de degradación proteolítica aumentando su vida media, lo que resulta en una potenciación de la actividad del ligando. Un ejemplo de este caso es el de la proteína de unión a la hormona de crecimiento GH-BP (de "growth hormone binding protein"), esta proteína es el receptor soluble para la hormona de crecimiento que cuando se une a esta hormona prolonga su vida media (71, 73). En otros casos los receptores solubles confieren sensibilidad al ligando, como por ejemplo, el receptor soluble a IL-6. La respuesta a IL-6 está mediada por dos glicoproteínas membranales: el receptor a IL-6 y la subunidad gp130 que transduce la señal. Se ha identificado un receptor soluble a IL-6 el cual, al igual que el receptor membranal, es capaz de unirse a la subunidad gp130 que transduce la señal, por lo tanto el receptor soluble IL-6 potencia la actividad biológica de la IL-6 en vez de inhibirla (143).

El efecto biológico exacto de los receptores solubles *in vivo* no se ha establecido todavía con exactitud. Sin embargo, los niveles en suero de receptores solubles de varias citocinas aumentan considerablemente bajo condiciones asociadas a un aumento a la respuesta inmunológica e inflamatoria. Tal es el caso del receptor α para IL-2, el receptor α para IL-6 y los receptores I y II para TNF- α (Tabla 3). Los niveles de estos receptores

Tabla 3. Patologías asociadas a receptores membranales liberados por corte proteolítico

Proteína soluble	Patologías asociadas	Referencia
Receptor HER 2 con actividad de cinasa en tirosina	Altos niveles en suero de pacientes con cáncer. En cáncer de mama su nivel en suero tiene una correlación con una disminución en la respuesta a la terapia endocrina y quimioterapia.	(129)
Receptor α de IL-2	Algunas patologías donde su nivel aumenta y es usado como marcador de la enfermedad o indicador de la progresión son: tuberculosis, escleroderma, linfoma maligno, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cánceres de páncreas, mama, pulmón y ovario.	(71)
Receptor de IL-6	Sus niveles están elevados en: artritis reumatoide, asma, esclerosis sistémica, esclerosis múltiple, HIV, malaria cerebral, mieloma múltiple.	(143)
Receptores I y II de TNF- α	Sus niveles están elevados en tuberculosis, malaria, HIV, artritis reumatoide, lupus sistémico eritomatoso.	(71)

solubles en suero se usan como marcadores de una gran variedad de condiciones clínicas, pero se requiere una mayor investigación para definir la relación existente entre el aumento en suero de los receptores solubles y estas enfermedades.

11.2 Factores de crecimiento transmembranales

La familia de factores de crecimiento transmembranales que son ligandos del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) son el TGF- α , el EGF, el HB-EGF y la anfiregulina. Estos factores se sintetizan como proteínas transmembranales que se cortan por proteasas de la familia ADAM y se liberan de manera soluble. En la actualidad existe la controversia acerca de si la forma transmembranal del factor tiene actividad biológica. Una de las teorías establece que tanto los factores de crecimiento unidos a la membrana como los que son solubles son capaces de activar al receptor. El factor unido a la membrana activaría receptores en células vecinas, conocida como señal yuxtacrina, mientras que el factor soluble difundiría y activaría a receptores lejos de su síntesis, conocida como señal parácrina o autócrina (90, 125). Sin embargo, de manera reciente se ha descrito que para que el factor transmembranal tenga actividad biológica es necesario que sea cortado y liberado de forma soluble. Los ratones que carecen de TACE, que es responsable de cortar al proTGF- α , tienen un fenotipo similar a los ratones que carecen de pro-TGF- α o de EGFR (84). La activación del EGFR, la proliferación y la migración celular dependientes de EGFR se reduce si se incuba con inhibidores de metaloproteasas, lo cual se recupera si se agrega EGF soluble (144). Se ha descrito que se requiere la actividad de la metaloproteasa TACE para que el EGFR se active *in vivo* y para el desarrollo de tumores en ratones desnudos, lo cual indica que TACE es importante en tumorigénesis. Además TACE se sobreexpresa en la mayoría de tumores de mama, por lo que se propone que TACE podría ser un blanco terapéutico antitumoral (145). También se ha visto que los ratones transgénicos que sobreexpresan proTGF- α susceptible de ser cortado tienen mayor incidencia de tumores que los que sobreexpresan proTGF- α que no puede ser cortado (125).

Los inhibidores de metaloproteasas sintéticos como el batimastat o BB-94 se han

usado con éxito para prevenir la metástasis en animales de estudio y en la clínica (144). Estos inhibidores previenen la proteólisis de la matriz extracelular por las células tumorales. Sin embargo, ahora se sabe que estos inhibidores también inhiben la proliferación y la migración celular y este efecto inhibitorio de batimastat es consecuencia de bloquear el corte de los factores de crecimiento y con eso interferir en el señalamiento autócrino de EGFR.

11.3 Proteínas de adhesión

Las moléculas de adhesión también pueden ser reguladas por el corte de su región extracelular, lo cual afecta la interacción célula-célula o célula-matriz extracelular en la que estén involucradas. Por ejemplo, el corte del ectodominio de la molécula de adhesión L-selectina modula la velocidad de rodamiento (“rolling velocity”) de los leucocitos a lo largo del endotelio, puesto que inhibidores que bloquean el corte de la L-selectina disminuyen la velocidad de rodamiento (146). Otras moléculas de adhesión que también pueden ser reguladas por proteólisis son la E-caderina (revisado en (147) o la molécula de adhesión L1 que se une a integrinas, la cual de forma soluble puede servir como sustrato para la adhesión y migración celular mediada por integrinas. Inhibidores del corte de L1 bloquean la migración celular y el efecto de los inhibidores se puede evitar agregando el ectodominio soluble de L1 (148).

En muchas enfermedades la concentración en suero de varias proteínas de adhesión aumenta. Tal es el caso de la molécula de adhesión L-selectina, la molécula de adhesión ELAM-1 (por “endothelial leukocyte adhesion molecule”); la molécula ICAM-1 (por “intercellular adhesion molecule-1”) y la molécula VCAM-1 (por “vascular cell adhesion molecule-1”) (Tabla 4). La concentración en suero de estas moléculas se puede usar como marcador de progresión de enfermedades y pronóstico (149), sin embargo, no se sabe la relación existente entre el aumento de estas moléculas solubles con estas enfermedades.

11. 4 Proteoglicanos

Los proteoglicanos de heparan sulfato como el sindecan también son cortados y se

Tabla 4. Patologías en las que las moléculas de adhesión ELAM, ICAM, L-selectina y VCAM solubles aumentan sus niveles en suero.

Patologías asociadas	Referencia
<i>Enfermedades inflamatorias o autoinmunes</i>	
Asma	(170)
Esclerosis múltiple	(171)
Artritis reumatoide	(172)
<i>Enfermedades Infecciosas</i>	
Tuberculosis	(173)
HIV	(174)
<i>Enfermedades cancerosas</i>	
Mieloma, cáncer de Ovario, cáncer de mama, tumores gastrointestinales, tumor de riñón, enfermedad de Hodgkin, leucemia de las células T de adulto (ATL)	(175)

ha visto que su corte puede ser una respuesta del hospedero a un daño en el tejido (150). En el caso de sindecan-1 el corte de su ectodominio puede ser activado *in vivo* por el factor de virulencia LesA de *Pseudomonas aeruginosa* y esto hace que el hospedero sea más susceptible a ser infectado (128). El corte del ectodominio de sindecan también lo convierte en un potente inhibidor del factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 (147).

11. 5 Precursor del β -amiloide o β APP

La enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer se caracteriza por la deposición del péptido β -amiloide (péptido $A\beta$) en placas seniles en el cerebro. El péptido $A\beta$ se genera por proteólisis de una proteína transmembranal llamada el precursor del β -amiloide (β APP). Las proteasas que cortan al β APP son llamadas α -, β - y γ -secretasas. El corte de la β APP por la β - y γ - secretasas resulta en la formación del péptido $A\beta$ y en la liberación de la porción extracelular del APP ($APP\beta$ soluble) (Fig. 10). La α -secretasa corta cerca de la membrana plasmática, en medio del péptido $A\beta$ evitando la formación del péptido $A\beta$ y resulta en la liberación de toda la porción extracelular del APP ($APP\alpha$ soluble). Se considera que el corte por la α -secretasa es un factor protector en contra de la enfermedad de Alzheimer, debido a que el corte por la α -secretasa evita el corte por la β -secretasa y con esto la formación del péptido $A\beta$. Las primeras secretasas en cortar al APP son la α o la β -secretasa, después del corte inicial el fragmento que queda unido a la membrana es cortado por la γ -secretasa (151) (Fig. 10).

En células no neuronales la actividad de α -secretasa se ha asociado con TACE en fibroblastos y con ADAM10 en células HEK (85, 93). En células neuronales del hipocampo, el sitio de corte de la α -secretasa es distinto al de TACE o ADAM10 y se propone que ADAM9 es la que tiene la actividad de α -secretasa en estas células, ya que *in vitro* ADAM9 recombinante es capaz de cortar al APP en ese mismo sitio (74).

La β -secretasa es una aspartil-proteasa unida a la membrana que se le ha llamado BACE (de " β -site APP cleaving enzyme"). Esta proteasa tiene un pH óptimo ácido y se

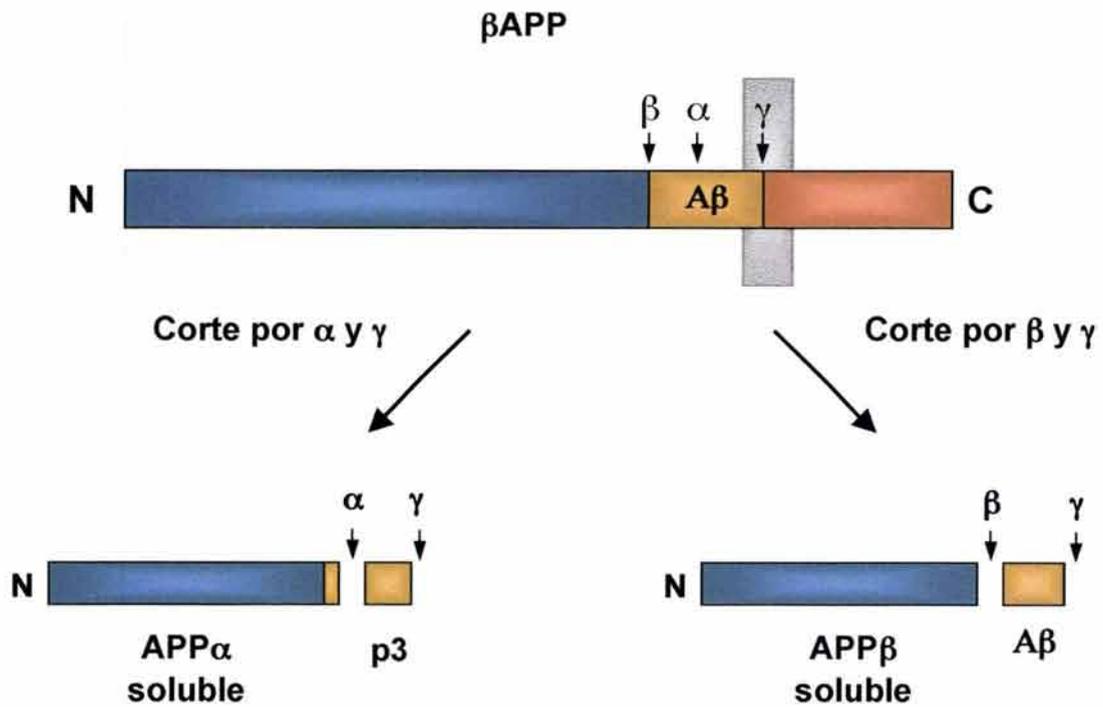


Figura 10. Mecanismo de corte del precursor del β -amiloide. El precursor del β -amiloide (β APP) es una proteína transmembranal. Las proteasas que cortan al β APP son llamadas α , β y γ secretasas. El corte de la β APP por la α y γ secretasa resulta en la liberación de todo el ectodominio del APP, llamado APP soluble α (APPs α) y de un péptido pequeño llamado p3. El corte por la β y γ secretasa resulta en la liberación de una porción del ectodominio del β APP, llamado APP soluble β (APPs β) y en la formación del péptido β -amiloide (A β) que es el que se deposita en las placas seniles del cerebro. Modificado de (151).

crea que corta en endosomas ácidos (152).

Recientemente se ha identificado a la presenilina como la responsable de la actividad de γ -secretasa (revisado en (151)). La γ -secretasa corta el fragmento carboxi-terminal que queda unido a la membrana después del corte realizado por las α - y β -secretasas. El corte lo realiza en el centro de la región transmembranal liberando el péptido A β (corte de β - y γ -secretasa) o un péptido más pequeño llamado p3 (corte de α y γ secretasas) (Fig. 10). El péptido A β puede ser de 40 o 42 aminoácidos, según sea el sitio de corte de la γ -secretasa, estos péptidos son los que forman a las placas seniles y se piensa que la forma de A β 42 es la más tóxica.

ANTECEDENTES

La forma soluble del betaglicano inhibe la unión del TGF- β a sus receptores de señalamiento. Se ha propuesto en varios trabajos que el betaglicano soluble se genera por un corte proteolítico del ectodominio del betaglicano membranal, pero este corte no ha sido caracterizado (51, 58, 66). El corte proteolítico de proteínas de membrana se le ha llamado en inglés "ectodomain shedding" y de manera reciente se han identificado a los activadores de distintas vías de señalamiento que lo estimulan, así como a las proteasas que lo realizan. En un trabajo previo demostramos que el corte del betaglicano no es estimulado por el éster de forbol PMA y que su corte no se ve afectado en una línea celular mutante que es defectuosa en el corte de una variedad de proteínas (153). En este trabajo se caracterizó el corte del betaglicano en varias líneas celulares utilizando las estrategias que se han seguido para caracterizar el corte de otras proteínas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El betaglicano membranal es un co-receptor que incrementa la unión del TGF- β a los receptores I y II (58). Además de la forma unida a la membrana, el betaglicano existe de forma soluble, el cual se ha encontrado *in vivo* en suero y matriz extracelular (66). En contraste con la forma membranal, el betaglicano soluble secuestra al TGF- β y no permite que se una a los receptores I y II, con lo cual bloquea las acciones del TGF- β (51, 68). Aunque se sabe que el betaglicano soluble es generado por un corte proteolítico cerca de la superficie celular del betaglicano membranal, se conoce muy poco de este proceso y no se sabe si se trata de un proceso regulado ni se ha identificado a la proteasa que lo corta. Comprender el mecanismo por el cual se genera el betaglicano soluble nos permitirá entender mejor la capacidad del betaglicano de modular las acciones del TGF- β .

HIPOTESIS

El betaglicano soluble se genera por un corte proteolítico en la superficie celular del betaglicano membranal y se trata de un proceso regulado.

OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es determinar el mecanismo responsable del corte proteolítico del ectodominio del betaglicano. Para esto se utilizarán células en cultivo transfectadas con el betaglicano membranal y se analizará la aparición del betaglicano soluble en el medio. Se comparará el corte del betaglicano en distintas líneas celulares y se caracterizará a la proteasa que corta al betaglicano. Los criterios utilizados para caracterizar a la proteasa incluyen: i) respuesta a activadores de vías de señalamiento que regulan el corte de otras proteínas transmembranales, ii) sensibilidad a distintos tipos de inhibidores de proteasas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos. El ortovanadato de sodio, el peróxido de hidrógeno, PMA, BSA, los amortiguadores, sales, detergentes e inhibidores de proteasas fueron adquiridos y preparados de reactivos de Sigma-Aldrich (México). Las endonucleasas de restricción y otras enzimas fueron de Roche Molecular Biochemicals (Basel, Switzerland). La sefarosa-Cl, sefarosa Proteína A y sefarosa proteína G fueron de Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden). El disuccinimidilsuberato (DSS) fue de Pierce. El TGF- β 2 se obtuvo de Ciba-Geigy AG (Basel, Switzerland). El TGF- β 1 se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los TIMP-1 y TIMP-2 humanos recombinantes se compraron de Fuji-Chemical Industries Ltd. (Takaoka, Japón). El TAPI-2, el BB-94 y el BMS-275291 fueron donados por el Dr. J. Arribas (Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona, España). El pervanadato se preparó fresco previo a cada experimento mezclando ortovanadato de sodio (1M) y peróxido de hidrógeno (1M) disueltos en PBS. Todos los reactivos para cultivos celulares se obtuvieron de Gibco/BRL. El material de plástico empleado para los cultivos celulares se obtuvo de Corning Costar (Cambridge, MA).

Anticuerpos. El anticuerpo policlonal de conejo # 822 se generó a partir de la proteína GST acoplada al ectodominio del betaglicano de rata y el anticuerpo # 821 a partir de la proteína GST acoplada a la región citosólica del betaglicano. El anticuerpo monoclonal contra el epítopo c-myc 9E10 se ha descrito con anterioridad (154). El anticuerpo monoclonal anti-HA fue de Babco (Richmond, CA). Los anticuerpos monoclonales anti-MT2-MMP de ratón (clona 162-22G5) y anti-MT3-MMP de humano (clona 117-10C6) se adquirieron en Fuji-Chemical Industries Ltd. (Takaoka, Japan). El anticuerpo monoclonal anti-MT1-MMP de humano LEM 2/63 fue donado generosamente por la Dr. Alicia Arroyo (Madrid, España). El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo y el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa fueron de Sigma-Aldrich (México).

Cultivos celulares. Los mioblastos de rata L6E9 se usaron para transfectar de manera estable al betaglicano. Las células CHO, COS-1 y COS-7 se usaron para transfectar de manera transitoria al betaglicano y a las distintas metaloproteasas. Las células M1 son células CHO mutantes que están transfectadas establemente con el cDNA del proHATGF- α y que se seleccionaron por ser defectuosas en el corte de varias proteínas transmembranales (141). Las células Rat-1 y 3T3-L1 se usaron para ver el corte del betaglicano endógeno. Las células L6E9 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 20% de suero fetal bovino. Las células CHO, COS-1, COS-7, M1, Rat-1, 3T3-L1 se crecieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Todas las células transfectadas de manera estable se crecieron en presencia del antibiótico geneticina G418 (Gibco/BRL) a una concentración final de 400 μ g/ml.

Construcciones y cDNAs. En el esquema de la figura 11 se muestran las distintas construcciones de betaglicano que se utilizaron en este estudio. Se le ha llamado BG a las construcciones que tienen el betaglicano silvestre con cadenas de glicosaminoglicanos. Se le ha llamado gag⁻ a las construcciones que son una doble mutante puntual de las serinas donde se anclan las cadenas GAGs (S535, 546A) y expresan el betaglicano como proteína medular sin glicosaminoglicanos (51, 53)]. La construcción HABG es el cDNA del betaglicano de rata con el epítopo HA en el amino terminal y está subclonada en el vector de expresión pCEP4. La construcción de la mutante Myc-gag⁻ está subclonada en el vector de expresión pCDNA3 (Invitrogen) y su construcción se realizó previamente (53). Las mutantes HA-gag⁻ y HA-gag⁻ FLAG (Fig. 11) se construyeron a partir del cDNA del betaglicano silvestre de rata con el epítopo HA en el amino terminal. Ambas construcciones se crearon reemplazando en el cDNA de betaglicano silvestre un fragmento de la mutante gag⁻ previamente descrita, en los sitios Xho I y Bgl II (51). El epítopo de FLAG se insertó en el carboxilo terminal en las construcciones HABGFLAG y HA-gag⁻ FLAG por PCR. Las construcciones HA-gag⁻, HA-gag⁻ FLAG, HABG y HABGFLAG se subclonaron en el vector de expresión pCMV5 para expresión transitoria en células en cultivo. Todas las

manipulaciones con el DNA se verificaron por secuenciación usando técnicas estándar (155).

Los siguientes plásmidos con los cDNAs que codifican para distintas metaloproteasas fueron donados amablemente por el Dr. J. Arribas (Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona, España): el plásmido pcDMycMT1 corresponde al cDNA de MT1-MMP de hamster con el epítopo de myc en el amino terminal (156). Los vectores pSG MT2-MMP y pSG MT3-MMP corresponden a los cDNA humano de MT2-MMP y MT3-MMP respectivamente. Los vectores pcD3 MT4-MMP HA, pcD3 MT5-MMP HA ct y pcD MT6-MMP HA ct corresponden a los cDNAs que codifican para la MT4-MMP de ratón y las MT5- y MT6-MMP humanas con el epítopo de HA y han sido descritos previamente (109-111). El plásmido pcD3.1Z (+) bKU z codifica para la ADAM 10 bovina. El cDNA de ADAMTS1 fue proporcionado por el Dr. JC. Rodríguez-Manzaneque (Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona, España).

Transfecciones. La expresión estable de la construcción Myc-gag⁻ o del vector vacío pCDNA3 en las células L6E9, así como la purificación y obtención de las clonas usadas en este estudio, se realizaron anteriormente (53). A estas células se les llamó L6E9/Myc-gag⁻ o L6E9/pCDNA3. Brevemente, las células L6E9 se transfectaron por el método de fosfato de calcio (157), las transfectantes se seleccionaron con 400 µg/ml de Geneticina. Las células transfectadas con la construcción Myc-gag⁻ se enriquecieron por tres rondas de citometría magnética ("Magnetic cell Sorting", MACS; Miltenyi Biotec Inc, Aubur, CA), usando como anticuerpo primario el anti-ectodominio del betaglicano # 822, y como anticuerpo secundario el antisuero de cabara anti-inmunoglobulina total de conejo conjugado a micro perlas magnéticas (Miltenyi Biotec Inc, Aubur, CA). Las células CHO mutantes M1/HABG son células M1 mutantes (141) transfectadas establemente con el cDNA del betaglicano silvestre membranal y se clonaron con anterioridad en el laboratorio. Para la transfección estable de estas células se utilizó la construcción HABG subclonada en el vector pCEP4 usando el método de precipitación de fosfato de calcio (157).

Las células CHO y las células L6E9/Myc-gag⁻ se transfectaron de manera transitoria usando el reactivo LipofectAMINE plus (Life Technologies, Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células COS-1 se transfectaron de manera transitoria con el método de dietilaminoetil-dextran (DEAE-Dextran) (158). Para ello, las células se sembraron en platos para cultivo de 78.5 cm² de área. Al día siguiente, el medio de cultivo se eliminó y las células se lavaron 2 veces con medio DMEM sin suero y se adicionaron 2 ml de la mezcla de transfección (10 µg de plásmido, cloroquina 0.1 mM, 0.4 mg/ml de DEAE-Dextran). Las células se incubaron a 37 °C por 3 horas. Posteriormente, se quitó la mezcla a las células y se incubaron con PBS adicionado con 10 % de DMSO por 1.5 min. Las células se lavaron una vez con DMEM y se les agregó DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Al día siguiente se despegaron y se sembraron en platos para cultivo de 9.6 cm² de área. Las células se ensayaron 48 horas después de la transfección.

Marcado metabólico. Aproximadamente 7×10^5 células, sembradas en platos para cultivo de 9.6 cm² de área, se ayunaron en medio DMEM libre de metionina por 1 hora a 37°C. Posteriormente se marcaron por 1 o 2 horas con 250 µCi/ml de metionina marcada con ³⁵S, [³⁵S]-Pro-Mix (Amersham Pharmacia Biotech), en medio DMEM libre de L-metionina y L-cisteína (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron 2 veces con medio completo (DMEM con 10% SFB) y se incubaron en este medio por 1 o 2 horas. Posteriormente las células se incubaron en presencia o ausencia de distintos compuestos en medio DMEM con 0.2% SFB o en medio DMEM solo, por el tiempo indicado. El medio se recuperó, se le adicionó 1mM de PMSF y se centrifugó a 14,000 rpm para eliminar restos celulares. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se lisaron con el amortiguador de lisis (PBS, 1% Nonidet P-40, 5mM EDTA y 1mM PMSF). Los lisados celulares o el medio se inmunoprecipitaron como se describe más adelante. Los inmunoprecipitados se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de SDS-PAGE. Las bandas se visualizaron usando el "Phosphorimager" (Molecular Dynamics) y el análisis cuantitativo de la densitometría se hizo con el programa "Image Quant" (Molecular Dynamics).

Inmunoprecipitación. Los medios y los lisados celulares se incubaron primero con sefarosa-Cl por 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras se incubaron con los anticuerpos indicados a una dilución de 1:200 por 2 horas o toda la noche a 4 °C en presencia de sefarosa proteína A (para los anticuerpos policlonales # 822 y # 821) o de sefarosa proteína G (para los anticuerpos monoclonales anti-c-myc y anti-HA). Los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con 1 ml de amortiguador de lavado (PBS, 0.1% Tritón X-100 y 0.1% SDS) y se analizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de SDS-PAGE.

Western blot. Los complejos inmunes de las inmunoprecipitaciones o bien alícuotas de medio o de células lisadas con el amortiguador de lisis se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) o a membranas de PVDF (Millipore) y se probaron con los anticuerpos indicados. Para ello, las membranas fueron bloqueadas incubándolas en PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T) adicionada con 5% de leche descremada por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Las membranas se incubaron posteriormente con el anticuerpo primario diluido en PBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. Las diluciones usadas fueron: 1:5000 para el anticuerpo # 822; 1:2000 para los anticuerpos #821, anti-c-myc y anti-HA; 1:200 para el anticuerpo anti-MT2-MMP y 10 µg/ml para el anti-MT3-MMP. Para detectar a la MT2-MMP endógena el anti-MT2-MMP se usó a 10 µg/ml. El anti-MT1-MMP LEM-2/63 se usó sin diluir. Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. La dilución usada fue de 1:5000 para el anti-IgG de conejo o de ratón conjugados a peroxidasa. Finalmente las membranas se lavaron y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Sólo donde se indica se usó el reactivo de ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech).

Iodinación del TGF- β . El TGF- β 2 se marcó con ^{125}I usando el método de cloramina T (27). Se mezclaron 2 μg de TGF- β 2, en 5 μl de acetonitrilo al 30% y tricloroacético al 0.1%, con 5 μl de fosfato de sodio 1.5 M. Se añadieron 400 μCi de Na^{125}I y se mezcló suavemente. A la mezcla de iodinación se le adicionaron 2 μl de cloramina T (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 3 veces en lapsos de 2, 1.5 y 1 min respectivamente, mezclando suavemente en cada ocasión. La reacción se detuvo adicionando 10 μl de N-acetil tirosina 50 mM, 100 μl de KI 60 mM y 100 μl de urea en ácido acético (1.2 g urea en 1 ml de 1M ácido acético). La actividad específica se cuantificó mediante cromatografía de capa fina, para lo cual se depositaron 2 μl de la mezcla de yodinación en una tira de fibra de vidrio impregnada de silica gel (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Se usó ácido tricloroacético al 10 % como fase móvil. Las tiras se cortaron por la mitad y se midió la radioactividad en la base y el frente en un contador para radiación tipo gamma (Packard). Se consideró una incorporación del 30 % o mayor como aceptable. Posteriormente se separó el ^{125}I libre del TGF- β 2 marcado utilizando columnas PD-10 de sephadex-G25 (Pharmacia Biotech). La columna se equilibró con el amortiguador de columna (HCl 4 mM, NaCl 75 mM y BSA 0.1%). Se adicionó la mezcla de iodinación a la columna y se agregaron 10 ml de amortiguador de columna. Se recuperaron fracciones de 500 μl de elución. Se seleccionaron por cromatografía de capa fina las fracciones con el mayor número de cuentas por minuto. La concentración del ^{125}I -TGF- β 2 se calculó por cromatografía de capa fina tomando 2 μl de la fracción seleccionada. Las alícuotas de ^{125}I -TGF- β 2 se guardaron a - 20 °C.

Marcado por afinidad. Aproximadamente 2×10^6 células sembradas en platos de 9.6 cm^2 de área, se lavaron dos veces con medio DMEM con 0.2 % SFB. Posteriormente se incubaron con o sin 100 μM de pervanadato en medio DMEM con 0.2 % SFB por el tiempo indicado. El medio se recuperó y se realizó el marcado por afinidad con el ^{125}I -TGF- β 2 del medio y de las células por separado. Las células se incubaron con 200 pM de ^{125}I -TGF- β 2 en amortiguador KRH-BSA (Krebs-Ringer-Hepes con 0.5% de BSA) por 2 horas a 4°C. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con el amortiguador de KRH-BSA y una vez

con el amortiguador KRH. Se realizó el entrecruzamiento del ^{125}I -TGF- β 2 incubando las células con 0.1mg/ml de disuccimidilsubarato (DSS) en KRH por 15 minutos a 4°C. La reacción de entrecruzamiento se detuvo lavando las células dos veces con KRH que contenía 10mM Tris-Cl pH 7.4. Las células se lisaron con el amortiguador de lisis. El medio de marcó por afinidad con 250pM de ^{125}I -TGF- β 2 por 3 horas en presencia de 0.05% Triton-X100. Se realizó el entrecruzamiento del ^{125}I -TGF- β 2 con 0.1mg/ml de DSS por 15 minutos y se agregó Tris-Cl pH 7.4 2 M de tal manera que quedara a una concentración de 10mM final. Los lisados celulares o el medio se inmunoprecipitaron como ya se ha descrito anteriormente utilizando los anticuerpos indicados. Los inmunoprecipitados se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de SDS-PAGE. Las bandas se visualizaron usando el "Phosphorimager" (Molecular Dynamics) y el análisis cuantitativo de la densitometría se hizo con el programa "Image Quant" (Molecular Dynamics).

Northern blot. El RNA total se aisló de células en cultivo usando el reactivo de Trizol (Invitrogen), 10 μg de RNA de cada línea celular se separó en geles de agarosa/formaldehído al 0.9%, los geles se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech). Las sondas de cDNA usadas fueron: para MT1-MMP de hamster, el fragmento XbaI/HindIII de 2669-bp del plásmido pcD MycMT1. Para MT2-MMP humana, el fragmento EcoRI/PstI de 1996-bp del plásmido pSG MT2-MMP y para MT3-MMP humana el fragmento EcoRI de 1330-bp del plásmido pSG MT3-MMP. La sonda de cDNA para GAPDH fue de ratón. Las sondas se marcaron con el Random Primer Labeling Kit (Boehringer) y [α - ^{32}P]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La hibridización se realizó toda la noche a 65°C en 0.5 M de buffer de fosfatos (pH 7.2), 7 % SDS y 10 mM EDTA. Las bandas se visualizaron con el "Phosphorimager" (Molecular Dynamics).

Ensayos de competencia. El medio de las células L6E9 / Mycgag⁻ tratadas con pervanadato se concentró utilizando el sistema de amición (Millipore, Bedford, MA). La

muestra se dializó contra PBS conteniendo 1mM PMSF. La concentración del betaglicano soluble BGs-90 en el medio se determinó por western blot, comparando con diferentes concentraciones conocidas de betaglicano soluble recombinante (BGsr) como estándares. Para los experimentos de competencia, se utilizaron 10 ng de BGs-90 o de BGsr. Las muestras se marcaron por afinidad con 100 pM de 125 I-TGF- β 2 en presencia de distintas concentraciones (0.062 - 4 nM) de TGF- β 1 o TGF- β 2 frío por 3 horas a 4 °C. La reacción de entrecruzamiento se realizó con la adición de disuccimidilsuberato (DSS) a una concentración de 0.1mg/ml. La reacción se detuvo después de 15 minutos, adicionando Tris/HCl pH 7.5 a una concentración final de 10 mM. Las muestras se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc y sefarsa proteína G. Los inmunoprecipitados se corrieron en geles de SDS-PAGE y se visualizaron con el "Phosphorimager". La densitometría se llevó a cabo con el programa "ImageQuant".

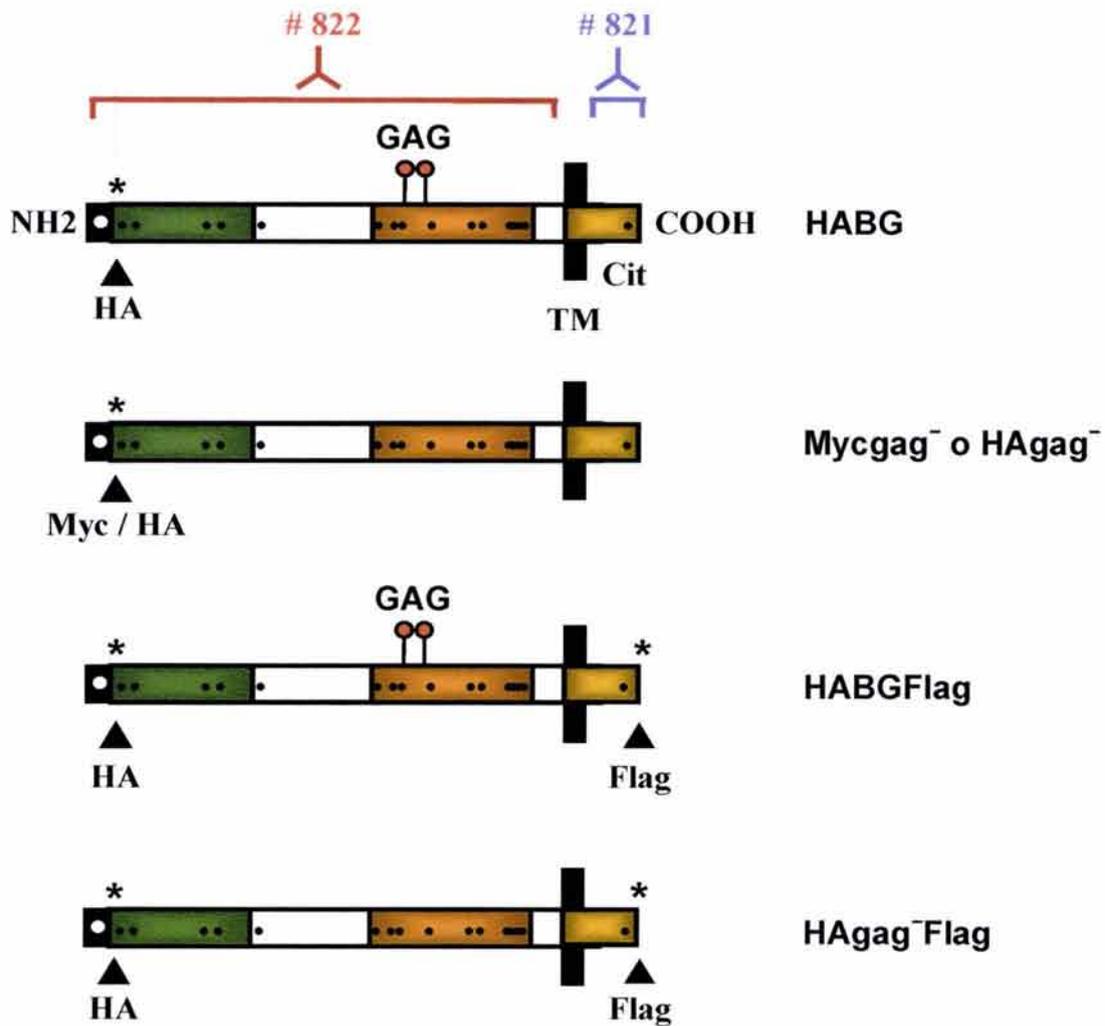


Figura 11. Construcciones de betaglicano. Representación esquemática de las distintas construcciones utilizadas en este trabajo. Se muestra el péptido señal en el amino terminal (caja negra), la posición de las cisteínas (puntos), las regiones con similitud a endoglina (caja verde) y a uromodulina (caja naranja), la región transmembranal (TM) y la región citoplasmática (Cit). Los epitopes Myc, HA y Flag están representados con un asterisco (*). Las construcciones que carecen de glicosaminoglicanos están representadas como gag⁻. Los glicosaminoglicanos están representados con círculos rojos y las construcciones que sí los presentan están señaladas como BG. También se muestran las regiones reconocidas por el anticuerpo policlonal # 822, dirigido contra electodominio del betaglicano, y el anticuerpo policlonal # 821 dirigido contra la región citosólica.

RESULTADOS

I. EL CORTE DEL BETAGLICANO ES UN PROCESO REGULADO

1. El corte de la región extracelular del betaglicano es estimulado por el pervanadato.

El "shedding" de proteínas transmembranales es un proceso generalmente regulado que puede ser inducido con distintos agentes. Sin embargo, en un trabajo previo se había demostrado que el corte del ectodominio del betaglicano es insensible a activadores que inducen el corte de muchas proteínas transmembranales, como son el PMA, ionóforos de calcio o suero (153). Recientemente se demostró que el pervanadato, un potente inhibidor de fosfatasa de tirosina, es capaz de inducir el corte de algunas proteínas que también son insensibles a estos agentes (129, 159). Por lo tanto, se decidió analizar el efecto del pervanadato en el corte del betaglicano. El betaglicano migra en los geles de SDS-PAGE como un barrido de 180-250 kDa, debido a la presencia de las cadenas de GAGs, lo cual dificulta su análisis. Para facilitar el análisis del betaglicano soluble se utilizó una versión de betaglicano que carece de GAGs, llamada gag⁻ betaglicano. La construcción gag⁻ es una doble mutante puntual donde los residuos de serina 535 y 546, que son los sitios de unión a las cadenas de GAGs, se han cambiado a alanina. Esta mutante se expresa sólo como proteína medular y migra en los geles como una banda definida de 120 kDa. Aunque la mutante gag⁻ no es procesada como proteoglicano, une al TGF- β y se comporta igual que el betaglicano silvestre (51). Se utilizó una clona de las células L6E9 transfectadas establemente con la construcción gag⁻ que tiene el epítopo c-myc en el extremo amino terminal, llamada construcción Myc-gag⁻ (Fig. 11) y como control una clona de L6E9 transfectada establemente con el vector de expresión vacío (pcDNA3). Ambas clonas de L6E9 estables fueron creadas y seleccionadas anteriormente en el laboratorio (53) y en este trabajo se les llamaron células L6E9/Myc-gag⁻ y células L6E9/pcDNA3. Las células L6E9 son una línea de mioblastos de rata que no expresan betaglicano en ningún momento de su desarrollo

(160), lo que las hace un buen tipo celular para expresar solamente betaglicano exógeno.

Para evaluar el efecto del pervanadato en el corte del betaglicano, las células L6E9/Myc-gag⁻ y las células L6E9/pcDNA3 se marcaron metabólicamente con ³⁵S-metionina y se incubaron por 30 minutos con o sin pervanadato. Posteriormente los lisados celulares y el medio se inmunoprecipitaron con distintos anticuerpos y se analizaron en geles de SDS-PAGE. La Figura 12 muestra que un tratamiento corto de las células L6E9/Mycgag⁻ con pervanadato indujo la liberación de un fragmento de unos 90 kDa (que llamaremos de aquí en adelante BGs-90). Este fragmento fue inmunoprecipitado por el anticuerpo policlonal #822 y por el anticuerpo monoclonal dirigido en contra del epitope c-myc ubicado en el extremo amino terminal. Como sería de esperar para un producto soluble, este fragmento no fue inmunoprecipitado por el anticuerpo # 821 dirigido contra la región citoplásmica del betaglicano (Fig. 12), ni se observó en el medio o los lisados celulares de las células control L6E9/pcDNA3 (Fig. 12). En algunas ocasiones, además del fragmento de 90 kDa se observó un fragmento menos abundante de mayor movilidad electroforética (ver * en la Fig. 12), pero el cual no seguimos caracterizando.

El fragmento BGs-90 difiere en tamaño del betaglicano soluble endógeno previamente descrito en los medios condicionados de las células 3T3-L1. El betaglicano soluble endógeno posee cadenas de GAGs, las cuales al ser digeridas con heparitinasa y condroitinasa dejan una proteína medular que tiene una movilidad electroforética de ~110-120 kDa (66). Es decir, el fragmento BGs-90 obtenido de las células L6E9 con el estímulo del pervanadato es una versión nueva de betaglicano soluble, de menor tamaño que la que se había descrito para el betaglicano soluble endógeno.

El efecto del pervanadato en el "shedding" de BGs-90 es específico, puesto que al incubar las células con vanadato o H₂O₂ no se liberó betaglicano soluble al medio (Fig. 13A), lo cual indica que la activación del corte del ectodominio del betaglicano debe darse por una modificación covalente del tipo fosforilación y/o desfosforilación de tirosinas. Además el corte del betaglicano tampoco se estimuló con PMA o suero fetal bovino (Fig. 13B), lo cual confirma los resultados descritos anteriormente (153) y diferencia el corte del betaglicano del

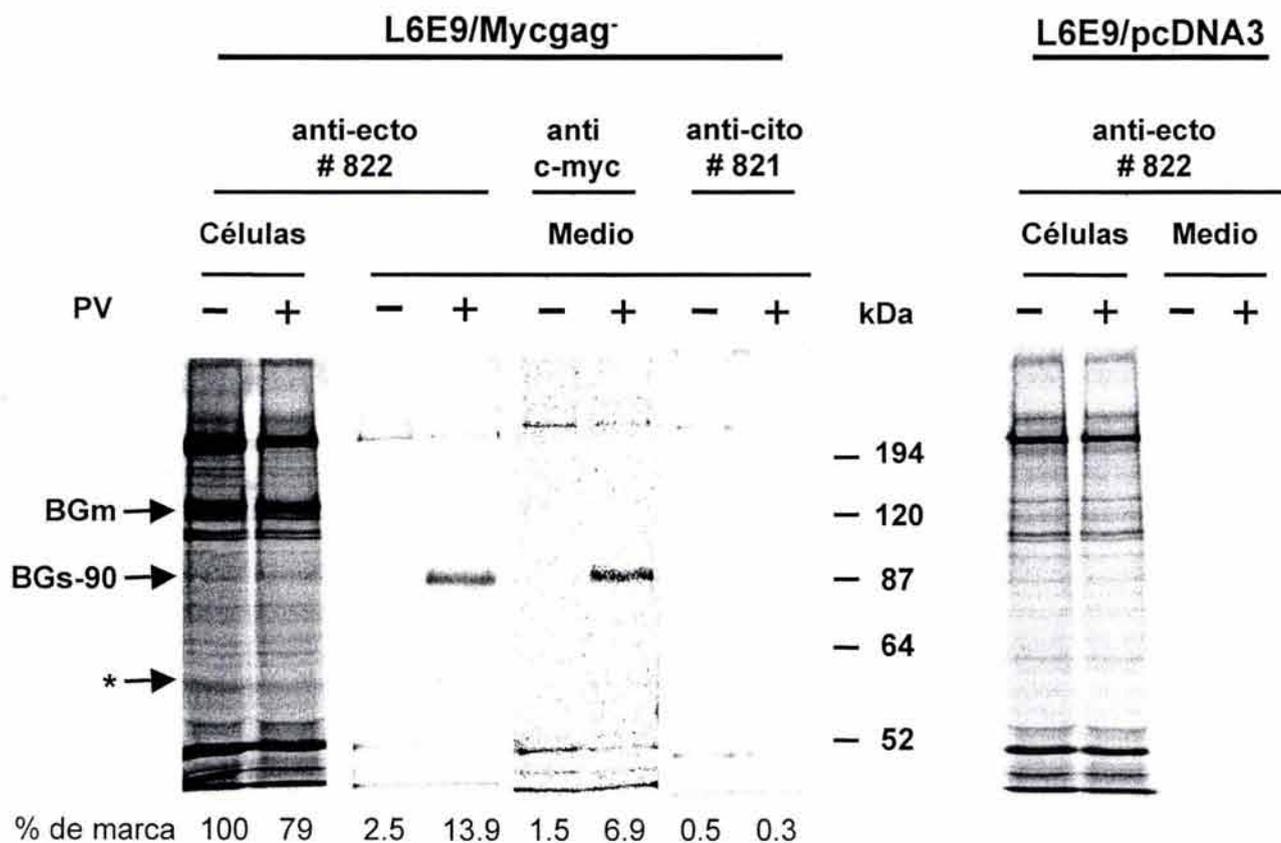


Figura 12. El corte del ectodominio del betaglicano es estimulado con el pervanadato. Las células L6E9/ Mycgag⁻ y las células L6E9/ pCDNA3 se marcaron metabólicamente con metionina-³⁵S por 1 hora, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron por 30 min sin (-) o con (+) 100 μ M de pervanadato (PV) en medio con 0.2% de suero. El medio y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo # 822 dirigido contra el ectodominio del betaglicano; el anticuerpo monoclonal contra el epítopo c-myc o bien el anticuerpo # 821 dirigido contra de la región citosólica del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "Phosphorimager". La localización del betaglicano membranar (BGm) o del betaglicano soluble de 90 kDa (BGs-90) está indicada con flechas.

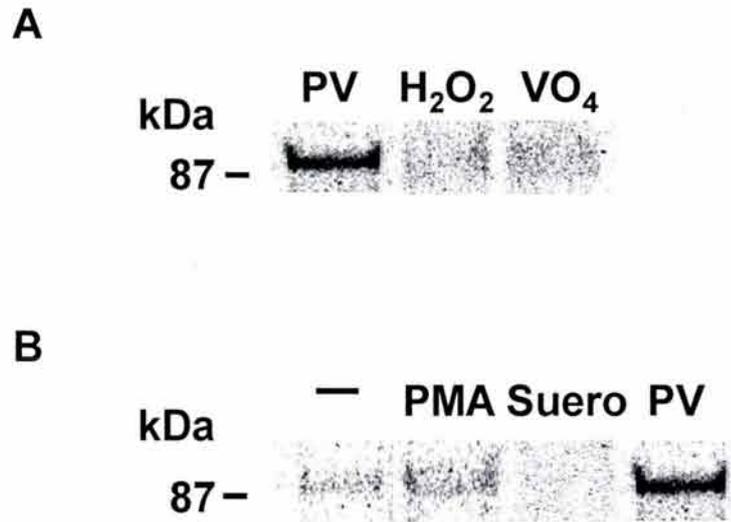


Figura 13. El corte del ectodominio del betaglicano estimulado con el pervanadato es específico. Las células L6E9/ Mycgag⁻ se marcaron por 1 hora con 250μCi/ml de metionina-³⁵S, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron por 30 min con 100μM de pervanadato, 100μM de H₂O₂ o 100μM deVO₄ (A) o bien en ausencia o presencia de 1μM PMA, 10% Suero Fetal Bovino o 100μM de pervanadato (B). El medio se inmunoprecipitó con el anticuerpo # 822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el “Phosphorimager”.

corte de otras proteínas.

2. El corte constitutivo del betaglicano es distinto al corte inducido con pervanadato en las células L6E9.

En los cultivos celulares muchas proteínas transmembranales son cortadas y liberadas al medio sin que exista estimulación celular por agentes externos, a este tipo de proceso se le llama "shedding" basal o constitutivo (140). En algunos casos el "shedding" constitutivo es realizado por una metaloproteasa diferente a la que realiza el "shedding" activado, ocurren en distinto sitio y están regulados por diferentes vías de señalamiento. Para comparar el corte constitutivo con el corte activado con el pervanadato, las células L6E9/Myc-gag⁻ betaglicano se incubaron en medio bajo en suero fetal bovino por 0, 7 y 24 horas. Los medios se inmunoprecipitaron y se analizaron por western blot. En la Figura 14 se observa que el betaglicano soluble es liberado al medio constitutivamente. Este proceso es lento pues apenas es visible a las 7 horas, pero a las 24 horas se puede apreciar claramente. De manera interesante, se observa betaglicano soluble de dos tamaños distintos. Uno presenta el mismo tamaño del liberado por las células incubadas con pervanadato, de 90 kDa, y el otro es de mayor tamaño, con un peso aproximado de 120 kDa (Fig. 14). Este último tiene un tamaño similar al betaglicano soluble endógeno que se había descrito anteriormente en el medio de células 3T3-L1 (66). Estos resultados muestran que el betaglicano se corta por dos tipos de mecanismos en las células L6E9. Un mecanismo que se activa por pervanadato y otro que es constitutivo. El corte constitutivo ocurre en dos sitios, el corte en uno de los sitios produce una forma de betaglicano soluble de unos 120 kDa (que llamaremos de aquí en adelante BGs-120) y el corte en otro de los sitios produce el fragmento BGs-90, que exhibe una movilidad electroforética igual al que se genera con pervanadato.

3. Diferentes líneas celulares producen betaglicano soluble de distinto tamaño.

Con el fin de explorar si el pervanadato también estimula el corte en otras células y

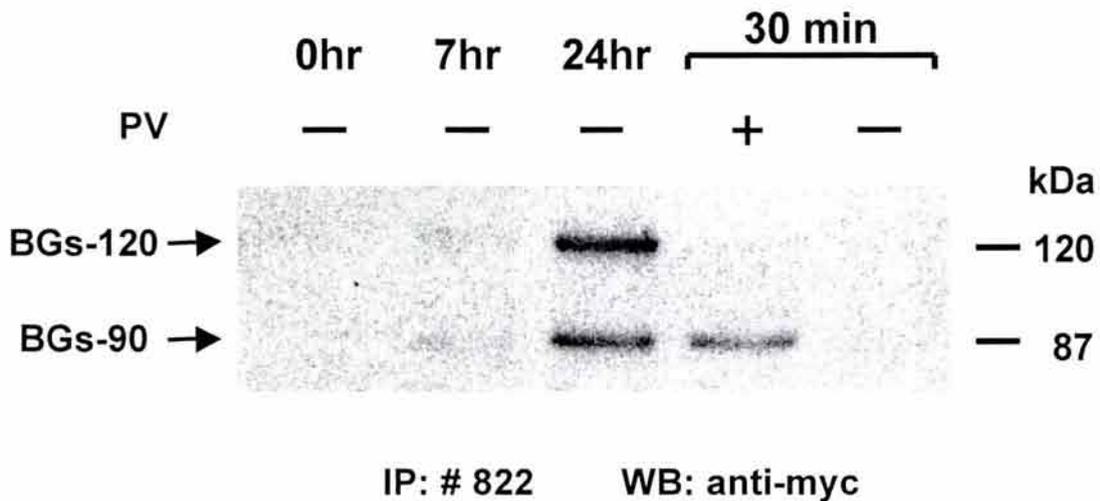
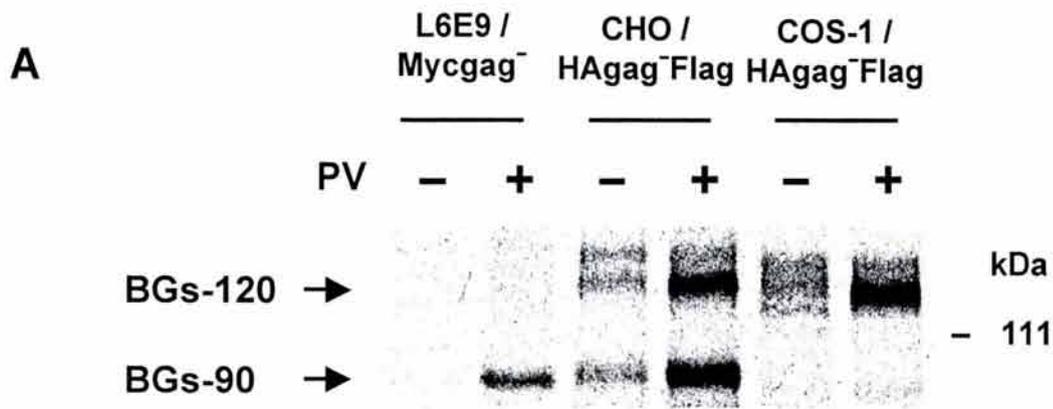


Figura 14. Corte constitutivo y corte estimulado con el pervanadato del ectodominio del betaglicano en las células L6E9. Las células L6E9/ Myc-gag⁻ se incubaron por distintos tiempos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 μ M de pervanadato. El medio se inmunoprecipitó con el anticuerpo # 822 dirigido contra el ectodominio del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron por western blot con el anticuerpo monoclonal contra el epitope c-myc. La localización de Bs-90 y BGs-120 esta indicada con flechas.

no se trata de una propiedad particular de los mioblastos L6E9, se probó el efecto del pervanadato en el corte del betaglicano en las células CHO y COS-1. Para ello, las células CHO y COS-1 se transfectaron de manera transitoria con las construcciones HA-gag⁻ o HA-gag⁻-Flag (Fig. 11) y se comparó el "shedding" del betaglicano en estas células con el de las células L6E9/Myc-gag⁻ después de ser tratadas con pervanadato. El tratamiento con pervanadato también estimuló el corte del betaglicano en las células CHO y COS-1 (Fig. 15A). Sin embargo, en las células CHO el pervanadato estimuló la liberación de los dos fragmentos de betaglicano soluble: el BGs-90 y el BGs-120. En contraste, en las células COS-1 el pervanadato sólo estimuló la liberación de fragmento grande BGs-120 (Fig. 15A). Estos resultados indican que en distintas líneas celulares el pervanadato es capaz de estimular el corte del betaglicano. Es importante resaltar que en este trabajo no se determinó el sitio de corte exacto de ambos fragmentos, sin embargo, dado que los dos fragmentos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo en contra del epítopo c-myc ubicado en el amino terminal, los sitios putativos de corte deben estar localizados en el extremo carboxilo del ectodominio, ver figura 15B. Por lo tanto, con estos resultados se puede concluir que el betaglicano puede ser cortado en dos sitios, lo cual genera dos receptores solubles distintos, uno es el BGs-120, que comprende todo ectodominio del betaglicano y otro es el BGs-90, fragmento más pequeño que sólo corresponde a una parte del ectodominio (Fig. 15B). Dependiendo del repertorio de proteasas de la célula el corte de sólo uno de los fragmentos o de ambos es estimulado por el pervanadato.

4. El pervanadato también estimula el corte del betaglicano con glicosaminoglicanos.

Para evaluar si el corte del betaglicano con cadenas GAGs también es estimulado con pervanadato, se analizó el efecto del pervanadato en células CHO transfectadas de manera estable con la construcción de betaglicano silvestre HABG (Fig. 11). Las células se marcaron metabólicamente y se incubaron por 30 minutos sin o con pervanadato. El medio se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra el ectodominio o contra la región citosólica y se analizó en geles de SDS-PAGE. La Figura 16 muestra que el pervanadato estimuló la



B

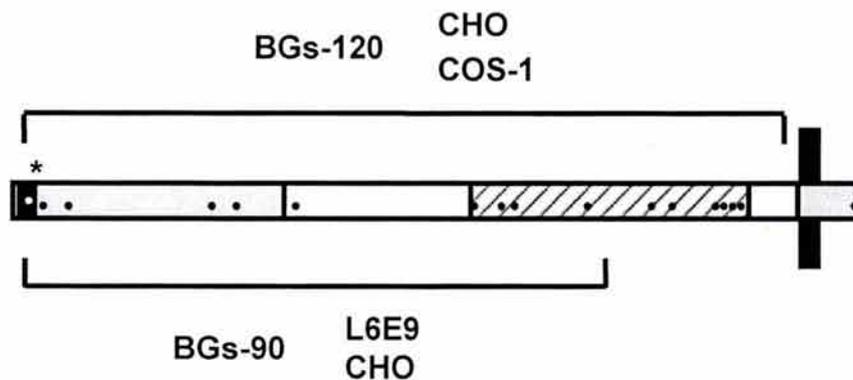


Figure 15. Distintas líneas celulares producen diferentes fragmentos de betaglicano soluble-
 A, Las células L6E9/ Myc-gag⁻ o células CHO y COS-1 transfectadas de manera transitoria con la construcción HA-gag⁻-Flag se marcaron metabólicamente por 2 horas, se incubaron 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron por 30 min en ausencia o presencia de 100 μM pervanadato. El medio se inmunoprecipitó con el anticuerpo contra el ectodominio del betaglicano, se separó en geles de SDS-PAGE y se visualizó en el "PhosphorImager". La localización de BGs-90 y BGs-120 está indicada. B, Representación esquemática del tamaño de los fragmentos BGs-90 y BGs-120 obtenidos en las distintas líneas celulares y putativos sitios de corte.

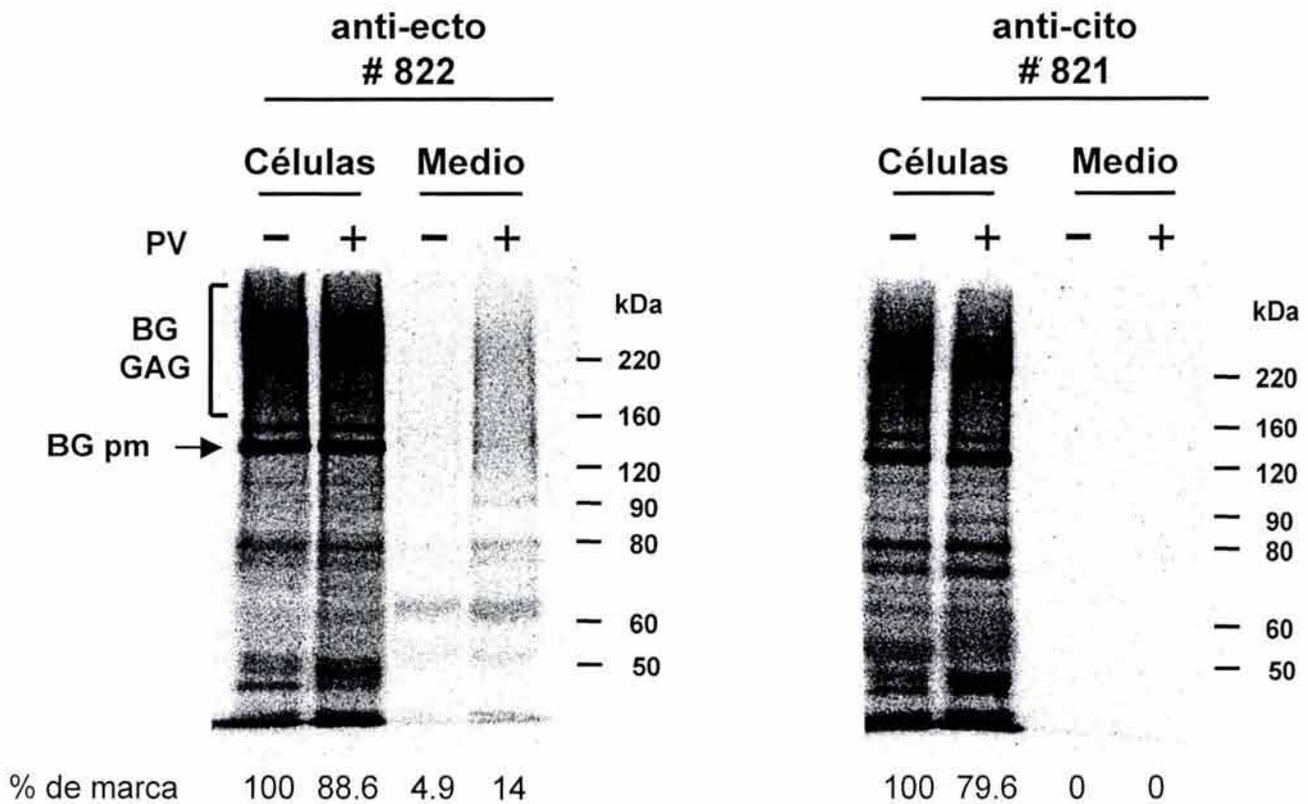


Figura 16. Los glicosaminoglicanos no interfieren con el corte del ectodominio del betaglicano estimulado con el pervanadato. Las células CHO/ HABG se marcaron metabólicamente por 1 hora, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron por 30 min sin (-) o con (+) 100 μ M de pervanadato (PV) en medio con 0.2% de suero. El medio y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo # 822 dirigido contra el ectodominio del betaglicano, o bien el anticuerpo # 821 dirigido contra de la región citosólica del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "Phosphorimager". La localización del betaglicano con cadenas de glicosaminoglicanos (BG GAG) y del betaglicano como proteína medular (BG pm) está indicada.

liberación del betaglicano al medio. El betaglicano silvestre se observó en este caso como barrido por la presencia de las cadenas GAGs, además del betaglicano como proteína medular (BGpm). Estos resultados prueban que la presencia de las cadenas GAGs del betaglicano silvestre no interfiere con el "shedding" estimulado con pervanadato.

5. El pervanadato estimula el corte del betaglicano en las células que lo expresan endogenamente.

También se analizó la capacidad del pervanadato de estimular el corte del betaglicano en células que lo expresan de manera endógena. Se utilizó la línea celular de fibroblastos embrionarios de rata Rat-1 y la línea de fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1. Ambas líneas celulares expresan niveles altos de betaglicano membranal (66). Las células se incubaron en ausencia o presencia de pervanadato por 60 minutos. Posteriormente el medio o las células se marcaron por afinidad con ^{125}I -TGF- β 2. El ^{125}I -TGF- β 2 se entrecruzó y los medios o lisados celulares se inmunoprecipitaron con distintos anticuerpos. El tratamiento con pervanadato indujo la liberación al medio de betaglicano soluble endógeno en ambas líneas celulares (Fig. 17). En este caso el betaglicano se observó como un barrido de alto peso molecular debido a la presencia de las cadenas GAGs. Este resultado confirma que el betaglicano endógeno también es liberado con el pervanadato, cuando menos en las líneas celulares 3T3- L1 y Rat-1.

6. El corte del betaglicano inducido con pervanadato no es mediado por TACE.

En un trabajo previo se reportó que el corte del betaglicano no está afectado en una línea celular mutante llamada M1 que es defectuosa para el corte de varias otras proteínas (153). Las células mutantes M1 son células CHO deficientes en el "shedding" de TGF- α y de varias proteínas como son el β -APP, la L-selectina, la subunidad α del receptor de la Interleucina 6, el pro-TNF- α y el proHB-EGF (135, 141, 142). Se ha demostrado de manera reciente que esta línea celular mutante tiene un defecto específico que previene la activación de TACE y no de otras metaloproteasas (116). A manera de determinar si TACE participa

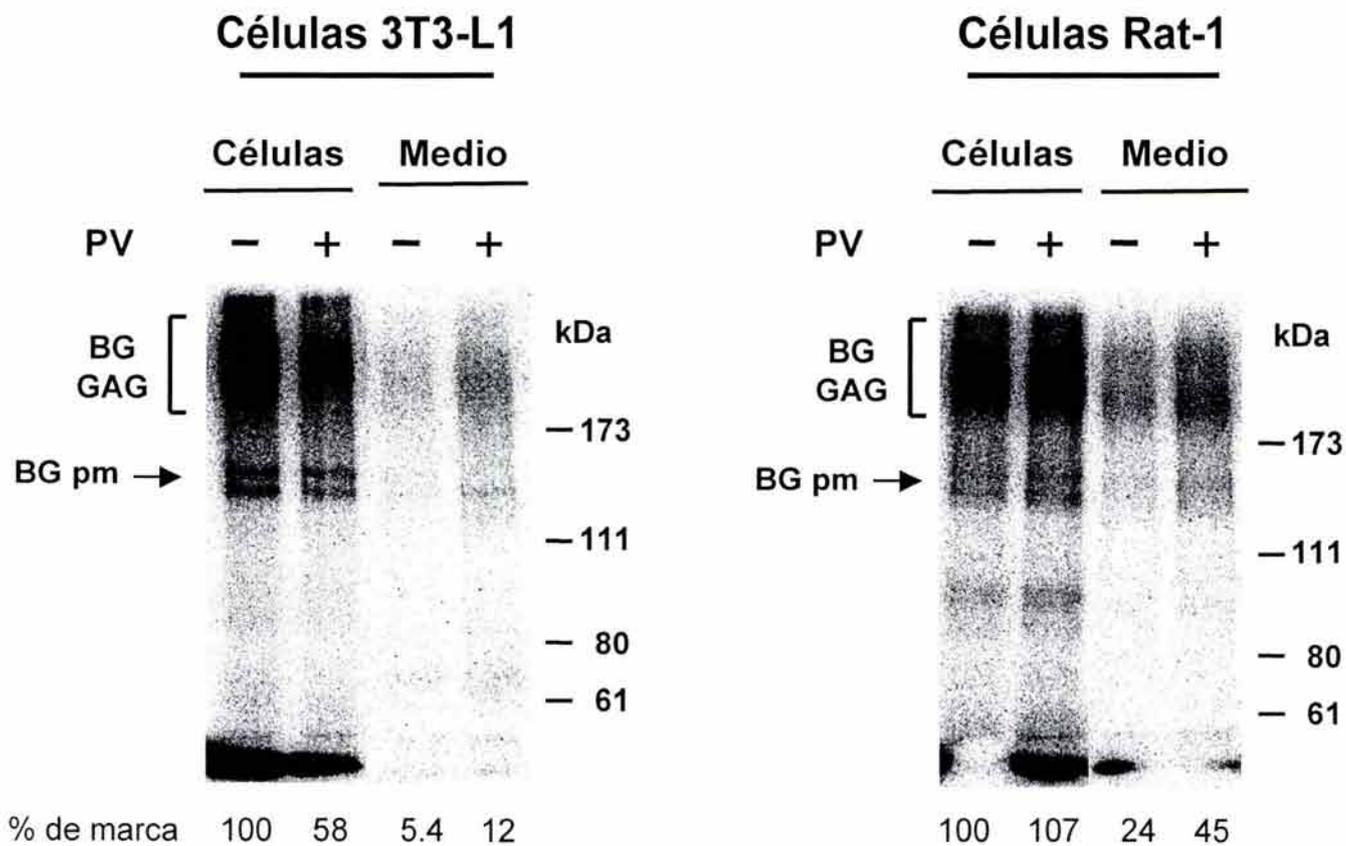


Figura 17. El pervanadato estimula el corte del betaglicano endógeno. Las células 3T3-L1 o las células Rat-1 se incubaron sin o con 100 μ M de pervanadato por 60 min en medio con 0.2% de suero. Las células se marcaron por afinidad con 200pM de 125 I-TGF β 2 y el medio se marcó con 250pM de 125 I-TGF β 2. Los lisados celulares y el medio se inmunoprecipitaron con el anticuerpo # 822 contra el ectodominio del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se visualizaron en el "Phosphorimager". La localización del betaglicano con cadenas de glicosaminoglicanos (BG GAG) y del betaglicano como proteína medular (BG pm) está indicada.

en el "shedding" del betaglicano inducido con pervanadato, se analizó el efecto del pervanadato en las mutantes M1 y en células CHO silvestres. Se usaron estas células transfectadas de manera estable con el betaglicano silvestre que tiene el epítopo HA en el amino terminal (construcción HABG, ver Fig. 11). El pervanadato indujo el corte del betaglicano tanto en las células CHO/ HABG silvestres como en las células M1/ HABG (Fig. 18). Estos resultados sugieren que TACE no participa en el corte del betaglicano activado con pervanadato. Además, observamos que el PMA no estimuló el corte del betaglicano (Fig. 18), lo cual ya había sido descrito anteriormente (153).

II. CARACTERIZACION DE LA PROTEASA QUE GENERA AL BGs-90

1. El corte del betaglicano estimulado con pervanadato es realizado por una metaloproteasa.

La mayor parte de los eventos de "shedding" analizados hasta la fecha son realizados por metaloproteasas dependientes de zinc (72). Con el fin de determinar el tipo de proteasa responsable del corte del betaglicano estimulado con el pervanadato en las células L6E9/Myc-gag⁻ estudiamos el efecto de distintos tipos de inhibidores de proteasas. Las células L6E9/Myc-gag⁻ se marcaron metabólicamente con ³⁵S-metionina y se incubaron con pervanadato por 30 minutos en presencia de los distintos inhibidores de proteasas. Los inhibidores de proteasas de serina, cisteína o aspártico no bloquearon el corte del betaglicano inducido con el pervanadato (Fig. 19 y Tabla 5). En contraste, un inhibidor de metaloproteasas derivado de ácido hidroxámico, el BB-94, previno el corte inducido con el pervanadato (Fig. 19 y Tabla 5). Este patrón de inhibición indica que una metaloproteasa dependiente de zinc es necesaria para el corte de BGs-90 inducido con pervanadato. Para estudiar de manera más detallada el efecto de BB-94 se hizo una curva dosis respuesta de este compuesto y de otro inhibidor de metaloproteasas también derivado de ácido hidroxámico, el TAPI-2. Ambos inhibidores bloquearon el corte del betaglicano activado con pervanadato de manera dosis dependiente (Fig. 20).

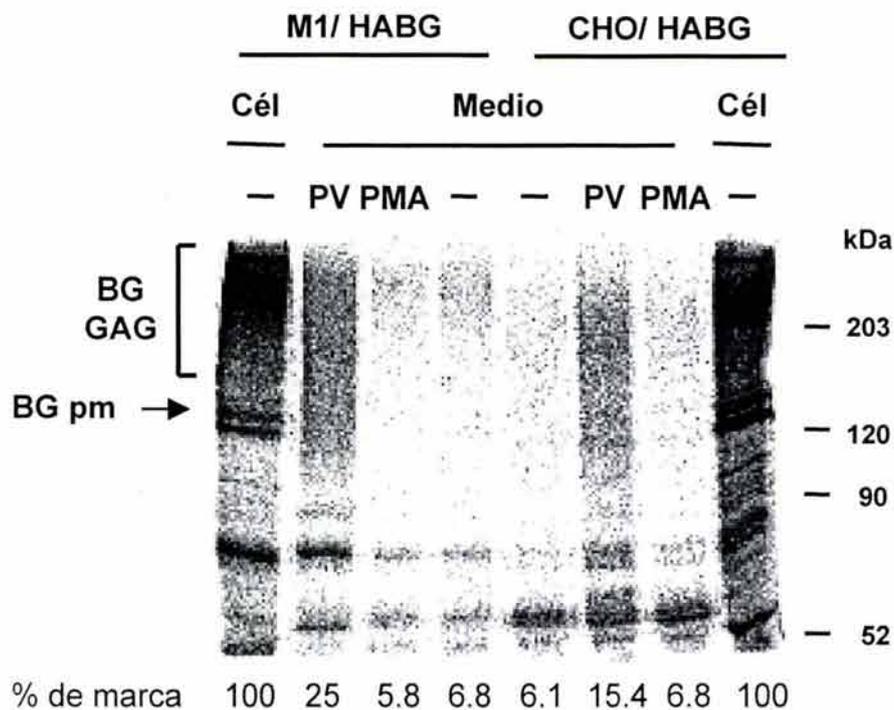


Figura 18. El corte del del betaglicano en las células M1 es estimulado con el pervanadato. Las células M1/HABG o CHO/ HABG se marcaron metabólicamente por 1 hora, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron por 30 min en ausencia (-) o presencia de 100 μ M de pervanadato o 1 μ M de PMA en medio con 0.2% de suero. El medio o los lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo # 822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "Phosphorimager". La localización del betaglicano con cadenas de glicosaminoglicanos (BG GAG) y del betaglicano como proteína medular (BG pm) está indicada.

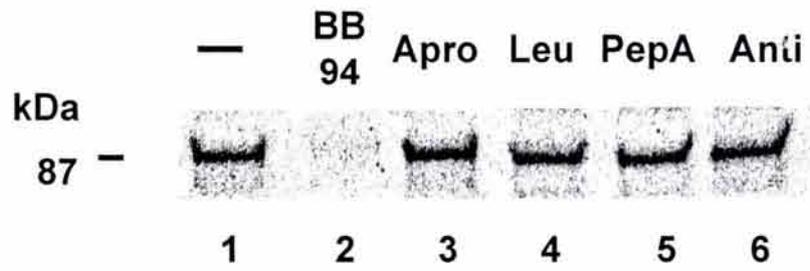


Figura 19. El corte del betaglicano que genera a BGs-90 en las células L6E9 es realizado por una metaloproteasa. Las células L6E9/ Mycgag⁻ se marcaron metabólicamente por 1 hora, se incubaron por 2 horas en medio completo, y finalmente se incubaron con 100 μ M de pervandato por 30 min en medio con 0.2% de suero en ausencia (-) (carril 1) o presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: BB-94 (carril 2), aprotinina (carril 3), leupeptina (carril 4), pepstatina A (carril 5) o antipaina (carril 6). Después de la incubación los medios se inmunoprecipitaron con el anticuerpo contra el ectodominio del betaglicano # 822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el “Phosphorimager”.

Tabla 5. Efecto de los inhibidores de proteasas en el shedding del betaglicano estimulado con pervanadato en las células L6E9/Mycgag⁻

Inhibidor	Especificidad	Concentración	Porcentaje de inhibición
BB-94	Metalloproteasas	5 μ M	92
Aprotinina	Proteasas de serina	2 μ g/ml	0
Leupeptina	Proteasas de serina y cisteina	2 μ g/ml	12
Pepstatina A	Proteasas de ac. Aspártico	1 μ g/ml	15
Antipaina	Proteasas de serina y cisteina	2 μ g/ml	6

Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición de betaglicano liberado al medio en ausencia de inhibidor.

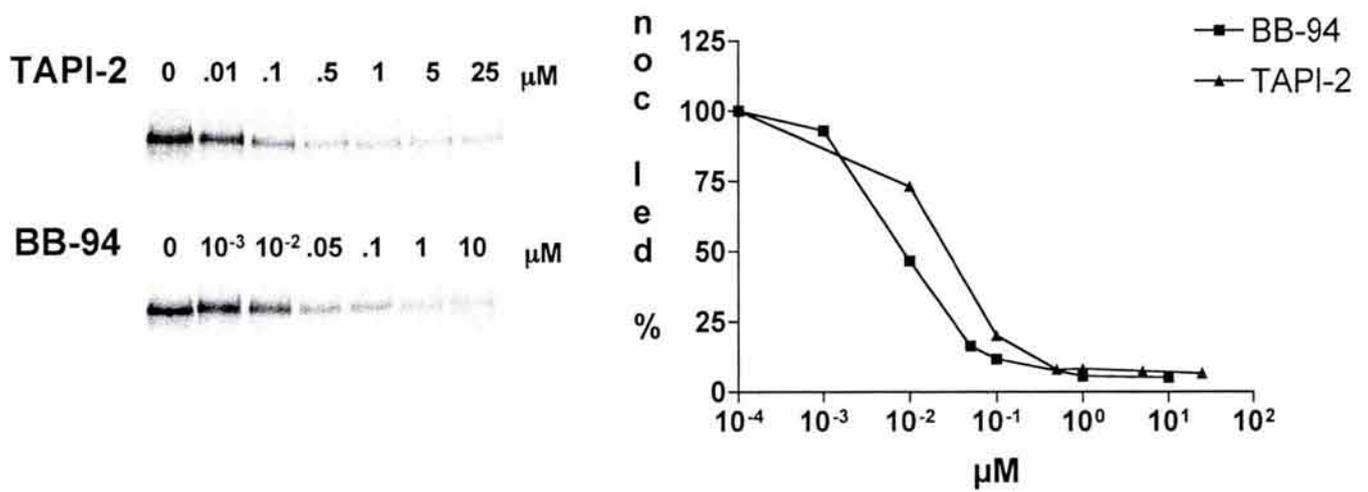


Figura 20. El corte del betaglicano que genera a BGs-90 en las células L6E9 es bloqueado por inhibidores de metaloproteasas derivados de ácido hidroxámico. Las células L6E9/ Myc-gag⁻ se marcaron metabólicamente por 1 hora, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron con 100 μM de pervandato por 30 min en medio con 0.2% de suero en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor TAPI-2 o BB-94. Después de la incubación los medios se inmunoprecipitaron con el antisuero # 822 en contra del ectodominio del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE, y se analizaron y cuantificaron en el “Phosphorimager”.

2. La actividad proteolítica que genera el fragmento BGs-90 es una metaloproteasa sensible a TIMP-2.

Los hidroxamatos inhiben a todos los miembros de las matrixinas (MMPs) así como a los miembros de las adamsilinas (ADAMs o también llamadas metaloproteasas-desintegrinas) (75). Para determinar con mayor precisión cual es la actividad proteolítica que genera al BGs-90, se analizó el efecto de dos miembros de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas, TIMP-1 y TIMP-2, los cuales son específicos para ciertos miembros de MMPs o ADAMs (112, 161). Encontramos que bajas concentraciones de TIMP-2 bloquearon el corte de BGs-90, mientras que TIMP-1 no tuvo ningún efecto o un efecto muy pequeño (Fig. 21); este resultado indica que una metaloproteasa sensible a TIMP-2 es necesaria para el corte del betaglicano inducido con pervanadato que genera al BGs-90.

3. La sobreexpresión de MT1- y MT3-MMP induce la producción de BGs-90 en diferentes líneas celulares.

La actividad de muchas metaloproteasas-desintegrinas, como TACE, que son responsables del "shedding" de varias proteínas no es inhibida por TIMP-2 (161), lo cual sugiere que este tipo de metaloproteasa no debe estar involucrada en la generación de BGs-90. Por el contrario, se ha visto que el TIMP-2 inhibe a varios miembros de la subfamilia de MMPs llamadas MT-MMP (por "membrane type matrix metalloprotease") (110). Hasta la fecha se han clonado seis miembros de las MT-MMPs (106-111). Para estudiar el posible papel de alguna MT-MMP en el "shedding" del betaglicano, se analizó el efecto de la sobreexpresión de las 6 distintas MT-MMPs en la producción de BGs-90 en las células L6E9/ Myc-gag⁻. La expresión de cada una de las metaloproteasas se verificó por western blot (Fig. 22A). Como se muestra en la Figura 22, la sobreexpresión de MT1- o MT3-MMP en las células L6E9/Myc-gag⁻ indujo la producción del BGs-90 en las células no tratadas con pervanadato, mientras que MT4, MT5- y MT6- no tuvieron ningún efecto. Además con MT1- también aumentó significativamente el corte del betaglicano en las células tratadas con

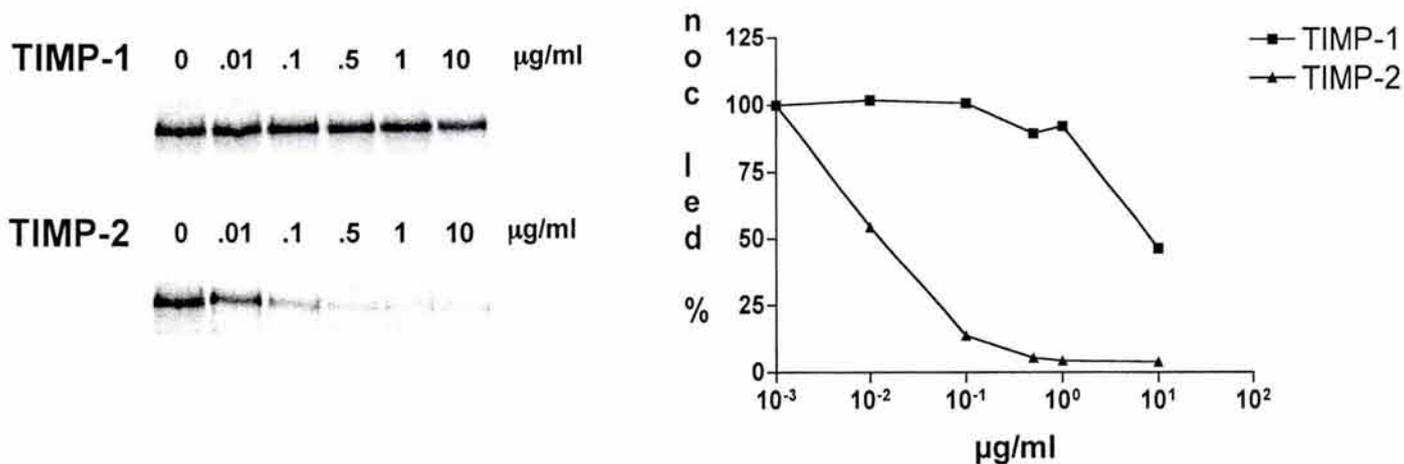
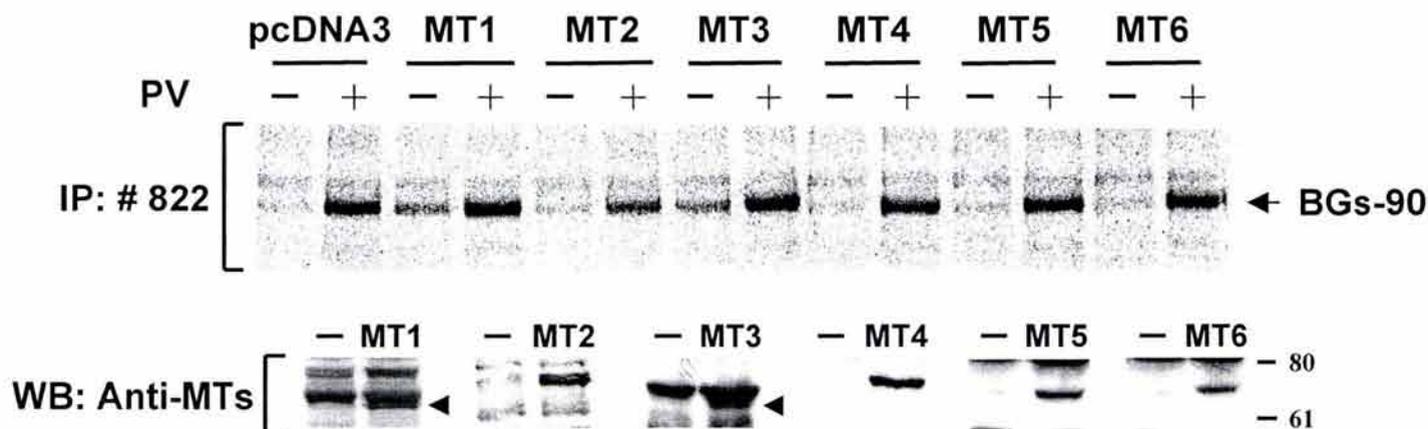


Figura 21. El corte del betaglicano que genera a BGs-90 en las células L6E9 es bloqueado por TIMP-2. Las células L6E9/ Myc-gag⁻ se marcaron metabólicamente por 1 hora, se incubaron por 2 horas en medio completo y finalmente se incubaron con 100 µM de pervanadato por 30 min en medio con 0.2% de suero en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor tisular TIMP-1 o TIMP-2. Después de la incubación los medios se inmunoprecipitaron con un antisuero en contra del ectodominio del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE, se analizaron en el "Phosphorimager" y el betaglicano soluble se cuantificó con el programa de ImageQuant .

L6E9 / Mycgag⁻



B

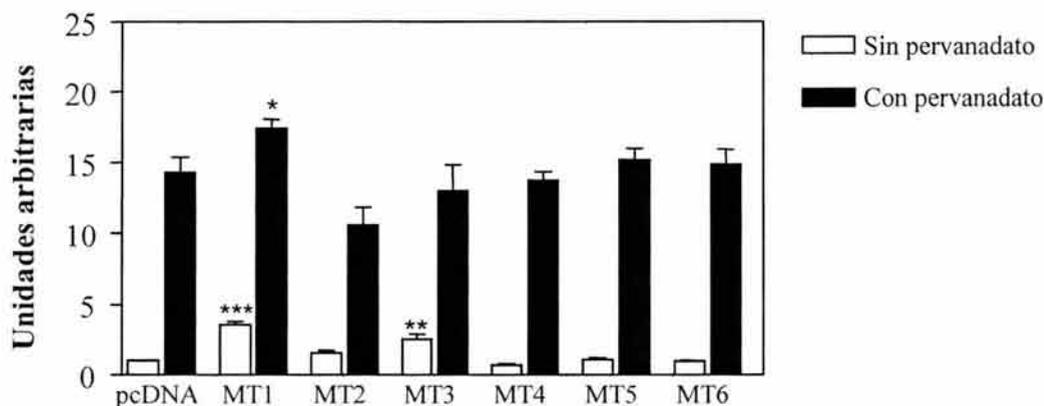


Figura 22. Efecto de la expresión de distintas MT-MMP en el "shedding" del betaglicano en las células L6E9/ Mycgag⁻. A, Las células L6E9/ Mycgag⁻ se transfectaron de manera transitoria con el cDNA que codifica para las distintas MT-MMP o bien con el plásmido vacío (pcDNA3) como control. 48 horas después de la transfección las células se marcaron metabólicamente y se incubaron sin o con pervanadato por 30 min. Los medios se inmunoprecipitaron con el anticuerpo contra el ectodominio del betaglicano. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE, y se analizaron en el "Phosphorimager". La expresión de cada MT-MMP se verificó por western blot de los lisados celulares de células transfectadas con el plásmido control (-) y células transfectadas con las MT-MMPs indicadas. Los anticuerpos usados fueron: MT1, anti-c-myc; MT2, anti-MT2; MT3, anti-MT3; MT4, MT5 y MT6 anti-HA. Las puntas de flecha indican las bandas específicas. B, El betaglicano soluble se cuantificó con el programa de ImageQuant y está representado como el porcentaje del betaglicano liberado en las células transfectadas con el plásmido vacío (pcDNA3) en ausencia de pervanadato y es el promedio ± ESM de una determinación por cuatruplicado. Se calculó la significancia con la prueba de *t Student* de dos colas de la $\alpha=0.05$ *** P <0.0001; ** P <0.0069; * P <0.041 contra las células control.

pervanadato (Fig. 22B). Estos resultados indican que tanto MT1- como MT3-MMPs podrían ser las responsables de la producción de BGs-90 en las células L6E9. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de MT2-MMP inhibió parcialmente la producción del BGs-90, aunque esta disminución no fue significativa (Fig. 22).

Para confirmar el papel de MT1- y MT3- en el corte del betaglicano, se realizó un experimento con las células COS-1, las cuales en contraste con las células L6E9 sólo producen BGs-120 (Fig. 15). Las células COS-1 se cotransfectaron de manera transitoria con HA-gag⁻-FLAG y cada una de las MT-MMP o bien con el plásmido vacío como control y se analizó la aparición del fragmento BGs-90 en presencia o ausencia de pervanadato. Se verificó la expresión de cada una de las MT-MMP por western blot de los lisados celulares (Fig. 23). De la misma forma que en las células L6E9, la sobreexpresión de MT4, MT5- y MT6- no tuvo ningún efecto en el corte del betaglicano, mientras que la sobreexpresión de MT1- y MT3-MMP indujo la producción de un fragmento de tamaño similar al BGs-90 (Fig. 23). Este resultado confirma los datos obtenidos con las células L6E9 y apuntan a que MT1- y MT3-MMP pudieran ser las responsables de la producción del BGs-90. Sin embargo, pareciera que se perdió la regulación de MT1- y MT3-MMP por pervanadato en las células COS-1, pues el BGs-90 se liberó tanto en las células tratadas como no tratadas con pervanadato. Para determinar si con cantidades menores de proteasa se observaba la regulación por pervanadato, las células COS-1 se transfectaron con distintas cantidades del cDNA de ambas proteasas. Con bajas cantidades de cDNA de MT1-MMP (0.4 µg) o MT3-MMP (0.05 µg) se liberó al medio tanto el BGs-120 como el BGs-90, pero sólo el BGs-120 conservó la regulación por pervanadato, pues el BGs-90 se liberó aún sin pervanadato (Fig. 24). Cuando se utilizó mayor cantidad de ambas proteasas, el fragmento de BGs-120 dejó de producirse y sólo apareció el fragmento de BGs-90 en presencia y ausencia de pervanadato (Fig. 24). Estos datos sugieren que en las células COS-1 no deben existir los mecanismos que regulan la actividad de las proteasas MT1- o MT3-MMP, las cuales cortan un fragmento de BGs-90 aún en ausencia de pervanadato y a expensas del corte de BGs-120. Otra posibilidad es que la sobreexpresión de estas metaloproteasas debe

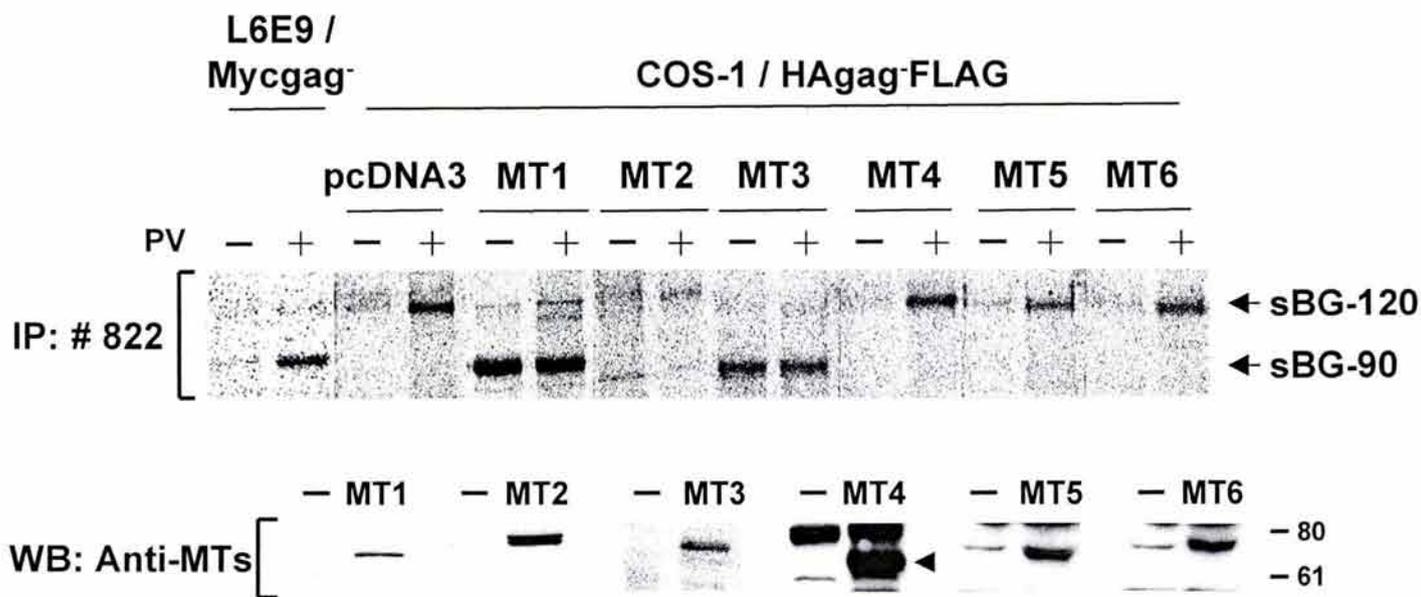


Figura 23. Efecto de la expresión de distintas MT-MMP en el corte del betaglicano en las células COS-1. Las células COS-1 se co-transfectaron transitoriamente con HA_{gag}-Flag y con las distintas MT-MMP o bien con el plásmido vacío (pcDNA3) como control, 48 horas después de la transfección las células se marcaron metabólicamente por 2 horas, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron con o sin 100 μ M de pervandato por 30 min en medio con 0.2% de suero. Los medios se inmunoprecipitaron con el anticuerpo en contra del ectodominio del betaglicano #822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "Phosphorimager". La expresión de cada MT-MMP se verificó por western blot de los lisados celulares de células transfectadas con el plásmido control (-) o células transfectadas con las MT-MMPs indicadas, de la misma forma que en la figura 22.

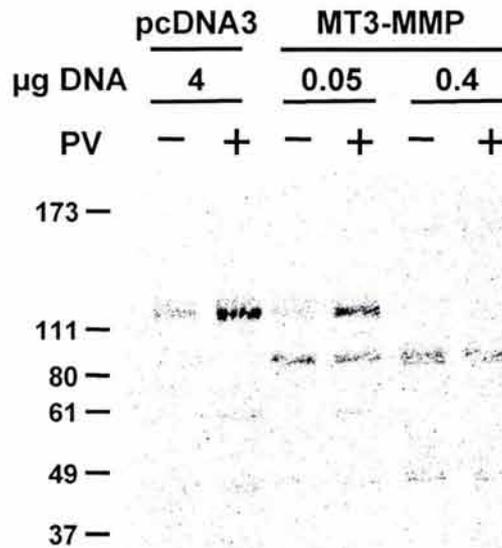
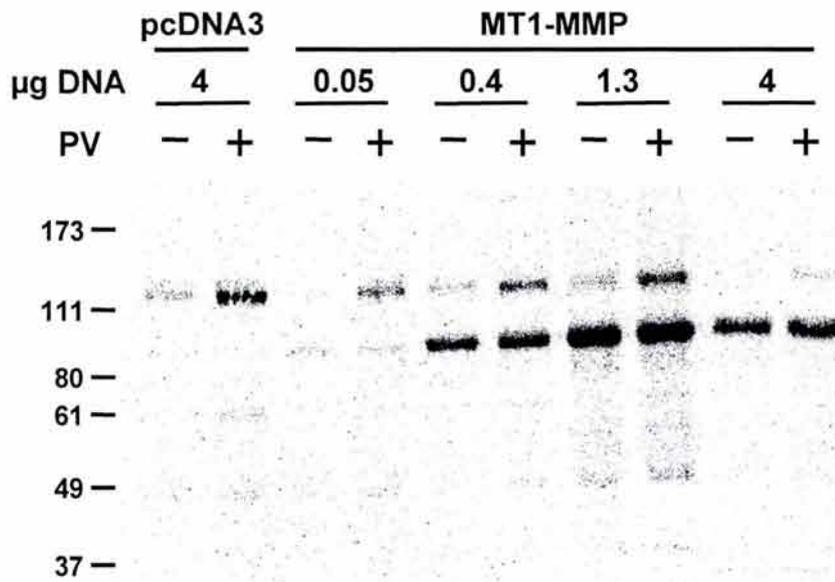


Figura 24. Efecto de la expresión de distintas cantidades de MT1-MMP y MT3-MMP en el corte del betaglicano en las células COS-1. Las células COS-1 se co-transfectaron transitoriamente con la construcción HA_{gag}- y con las cantidades indicadas de MT1-MMP, MT3-MMP o el plásmido vacío pcDNA3 como control, 48 horas después de la transfección las células se marcaron metabólicamente por 2 horas, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron con o sin 100 µM de pervandato por 30 min en medio con 0.2% de suero. Los medios se inmunoprecipitaron con el anticuerpo en contra del ectodominio del betaglicano #822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y los geles se analizaron en el “Phosphorimager”.

sobrepasar los mecanismos regulatorios que normalmente operan con las enzimas endógenas. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de MT2-MMP inhibió totalmente la producción de BGs-120 (Fig. 23), de la misma forma que ocurrió en las células L6E9 con la producción del BGs-90.

4. La MT1-MMP es responsable del corte del BGs-90 en las células L6E9 y CHO

Para verificar que MT1- y MT3- son las metaloproteasas responsables del corte del BGs-90 se midieron sus niveles endógenos en las células CHO, COS-1 y L6E9. El RNAm que codifica para la MT1-MMP se detectó en las células CHO y L6E9, mientras que en las células COS-1 no se detectó expresión de esta metaloproteasa (Fig. 25A). Este resultado concuerda con el hecho de que el BGs-90 se genera tanto en las células L6E9 como en las CHO, pero no en las células COS-1. La expresión de MT1-MMP también se verificó por western blot de lisados celulares usando el anticuerpo anti-MT1-MMP LEM-2/63 (Fig. 25C). Por otra parte, el RNAm que codifica para la MT3-MMP no se detectó en ninguna de las tres líneas celulares analizadas (Fig. 25B). En conjunto estos resultados sugieren que al menos en las células L6E9 y CHO la MT1-MMP es la metaloproteasa responsable de la generación del BGs-90.

III. EFECTO DE MT2-MMP SOBRE EL "shedding" DEL BETAGLICANO

1. La MT2-MMP disminuye el "shedding" del betaglicano

Como se describió anteriormente, un resultado sorprendente fue que la sobreexpresión de la MT2-MMP disminuyó la producción del fragmento de BGs-90 en las células L6E9 (Fig. 22) y del fragmento de BGs-120 en las células COS-1 (Fig. 23 y 27A). Para corroborar este resultado, se determinó el efecto de expresar cantidades crecientes de MT2-MMP en las células CHO transfectadas con HA α g $\bar{}$. De nuevo, se observó que el "shedding" de ambos fragmentos, BGs-90 y BGs-120, disminuyó con cantidades crecientes de la MT2-MMP (Fig. 26). Por otro lado, al cotransfectar a las células COS-1 con la MT1-MMP y el betaglicano, la sobreexpresión de cantidades crecientes de MT2-MMP indujo

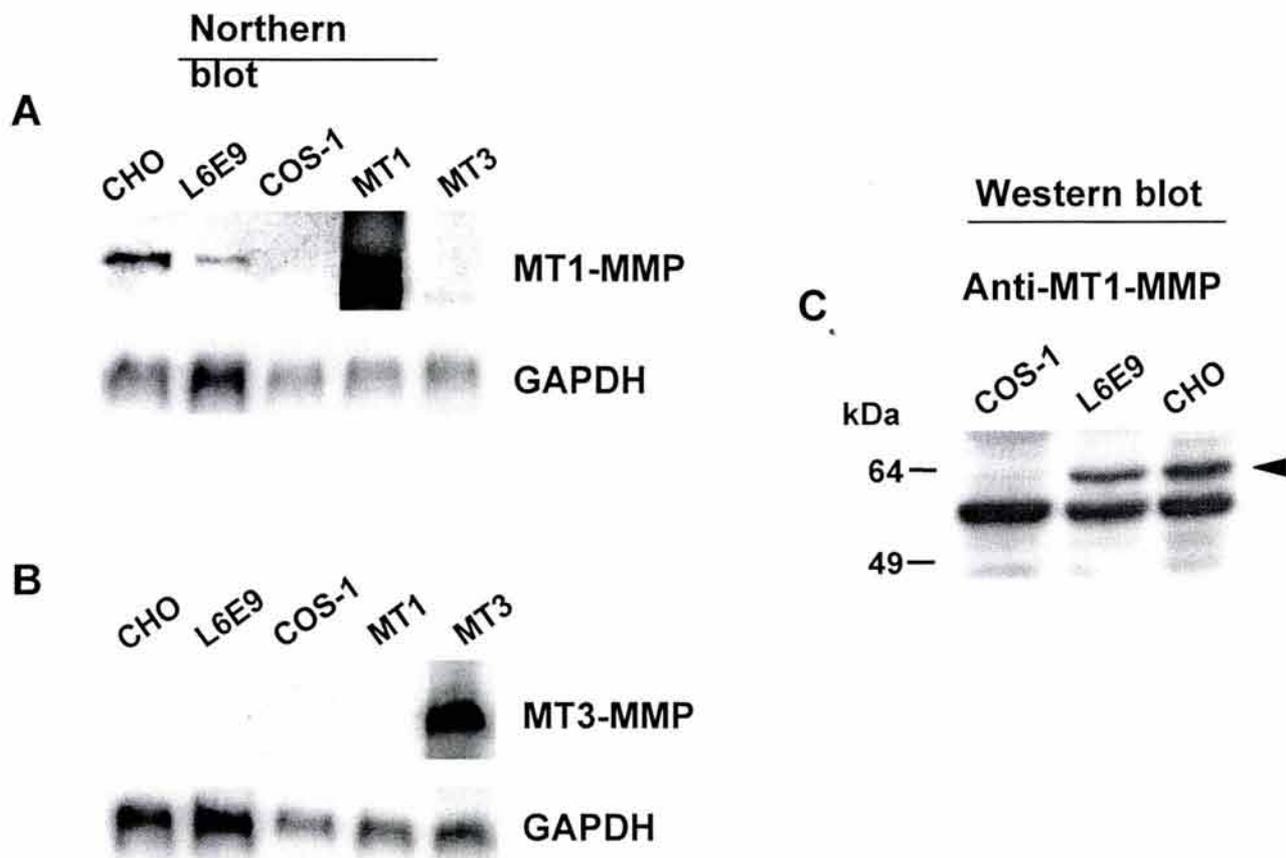


Figura 25. Expresión de MT1-MMP y MT3-MMP. 10 μ g de RNA total por carril de células CHO, L6E9/ Mycgag⁻ y COS-1 se analizó por Northern blot con sondas de cDNA de MT1-MMP (A) o MT3-MMP (B) marcadas con ³²P-. El RNA de células COS-1 transfectadas de manera transiente con el cDNA de MycMT1-MMP o MT3-MMP se usó como control positivo. Las membranas se desnudaron y se rehibridaron con el cDNA para GAPDH. C, Análisis de la expresión endógena de la proteína MT1-MMP por western blot de lisados celulares usando el anticuerpo monoclonal anti-MT1-MMP LEM-2/63. La punta de flecha indica la banda específica.

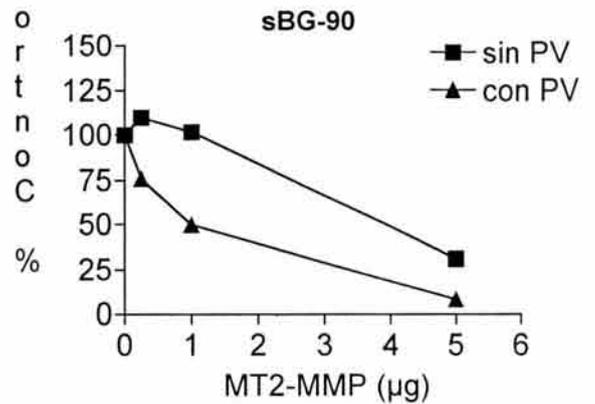
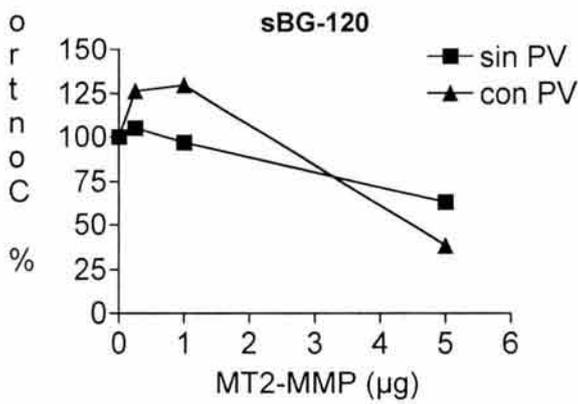
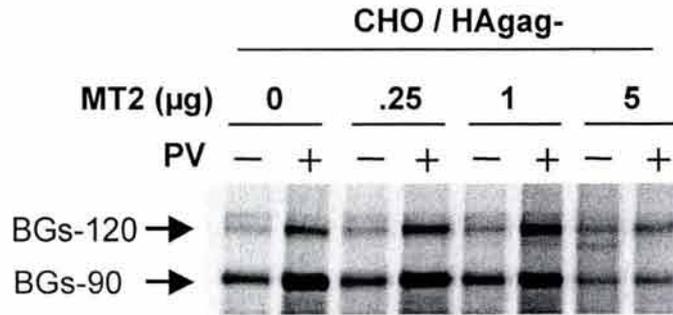


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de MT2-MMP en el "shedding" del betaglicano en células CHO. Las células CHO se transfectaron con 5 μg de la construcción HA_{gag}⁻ y con cantidades crecientes de MT2-MMP. Las células transfectadas se marcaron metabólicamente por 2 horas con Metionina-³⁵S, se incubaron 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron con o sin 100 μM de pervanadato por 30 min. Los medios se inmunoprecipitaron con el anticuerpo contra el ectodominio del betaglicano #822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "phosphorimager". Las bandas se cuantificaron usando el software de ImageQuant y están representadas como el porcentaje de "shedding" de betaglicano en células transfectadas sin MT2-MMP.

una disminución tanto en la producción del BGs-90 como del BGs-120 (Fig. 27B). Estos resultados muestran que la expresión de la MT2-MMP induce una disminución en la producción de los fragmentos de BGs-90 y/o de BGs-120 en las diferentes líneas celulares.

2. La MT2-MMP disminuye el contenido celular del betaglicano membranal y de la MT1-MMP

Una posible explicación al hecho de que la expresión de la MT2-MMP disminuya la producción del betaglicano soluble, es que está afectando la expresión del betaglicano membranal y/o de las metaloproteasas responsables de la generación del BGs-120 y del BGs-90, que en las células L6E9 y CHO sería la MT1-MMP. Para clarificar esto, se determinaron los niveles de expresión de la MT2-MMP endógena en las células COS-1, L6E9 y CHO por northern y western blot. El RNAm que codifica para la MT2-MMP no se detectó por northern blot en ninguna de las tres líneas celulares (dato no mostrado). Por western blot tampoco detectamos la presencia de la proteína (Fig. 28). Con lo cual se concluye que esta metaloproteasa no se expresa en estas células. Para estudiar el efecto que tiene la MT2-MMP sobre los niveles de betaglicano membranal y MT1-MMP, se cotransfectaron células COS-1 con HA γ g⁻ junto con Myc/MT1-MMP y cantidades crecientes de MT2-MMP, y posteriormente sus niveles en lisados celulares se analizaron mediante western blot. El aumento en la expresión de la MT2-MMP disminuyó el contenido celular tanto del betaglicano membranal (Fig. 29A) como de la MT1-MMP (Fig. 29B). Este mismo resultado se observó al transfectar las células COS-1 con MT2-MMP y HA γ g⁻ o MT2-MMP y Myc/MT1-MMP por separado (Fig. 30). También se analizó el efecto de la MT2-MMP en las células CHO, pero en este caso se analizaron los niveles de la MT1-MMP endógena y del betaglicano transfectado. En las células CHO también se encontró una disminución del contenido celular de ambas proteínas (Fig. 31). Es importante resaltar el efecto de la MT2-MMP sobre la MT1-MMP endógena, pues esto indicaría que no se trata de un efecto exclusivo sobre las proteínas transfectadas. Por lo tanto, estos resultados muestran que la sobreexpresión de MT2-MMP disminuye el contenido celular

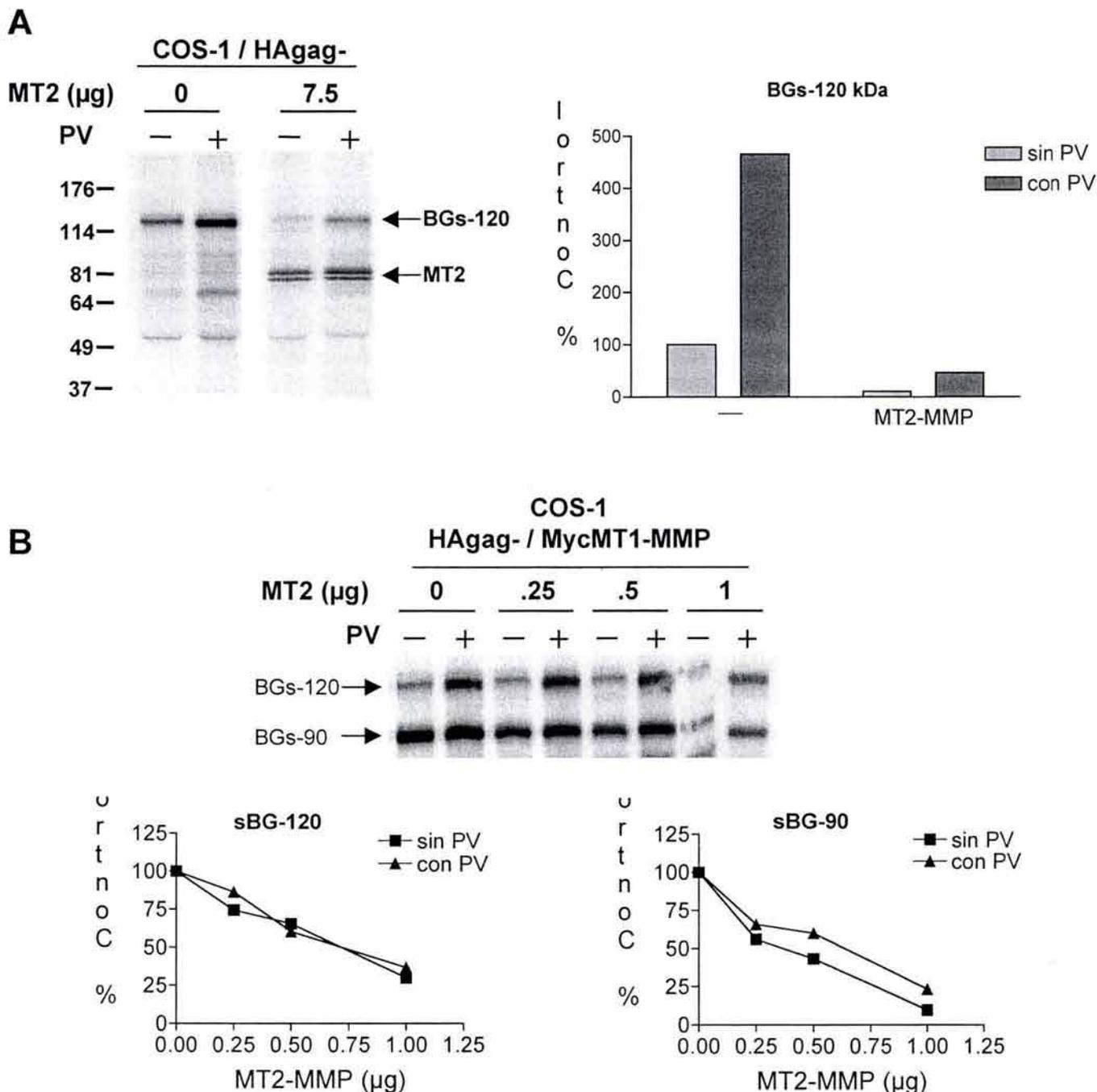


Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de MT2-MMP en el "shedding" del betaglicano en células COS-1. A, las células COS-1 se transfectaron con 5 μg de la construcción HA_{gag}⁻ y con 7.5 μg del plásmido control o del vector para MT2-MMP. B, Las células COS-1 se cotransfectaron transitoriamente con 5 μg de la construcción HA_{gag}⁻, 5 μg de Myc-MT1-MMP y cantidades crecientes de MT2-MMP. Las células transfectadas se marcaron metabólicamente por 2 horas con Metionina-³⁵S, se incubaron 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron con o sin 100 μM de pervanadato por 30 min. Los medios se inmunoprecipitaron con el anticuerpo contra el ectodominio del betaglicano #822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "phosphorimager". Las bandas se cuantificaron usando el software de ImageQuant y están representadas como el porcentaje de "shedding" del betaglicano en células transfectadas sin MT2-MMP.

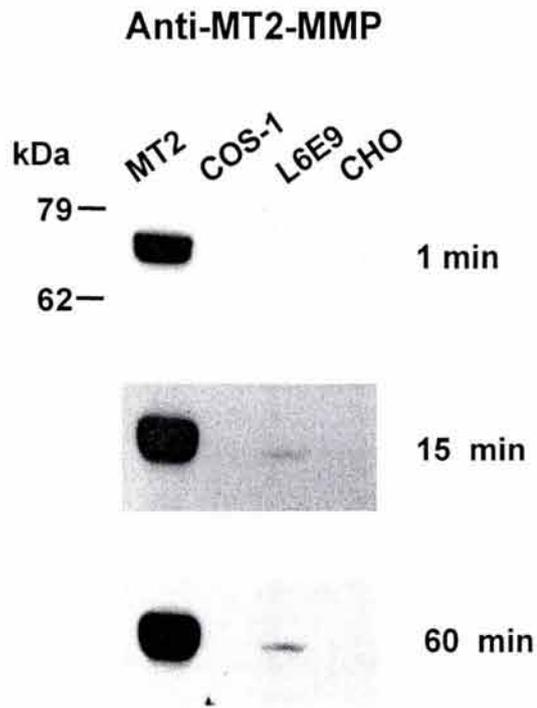


Figura 28. Expresión de MT2-MMP. Análisis de la expresión endógena de la proteína MT2-MMP por western blot de lisados celulares con el anticuerpo monoclonal anti-MT2. El lisado celular de células COS-1 transfectadas transientemente con el cDNA para MT2-MMP se usó como control positivo. El western blot se reveló usando el reactivo de ECL Plus y exponiendo el film por distintos tiempos.

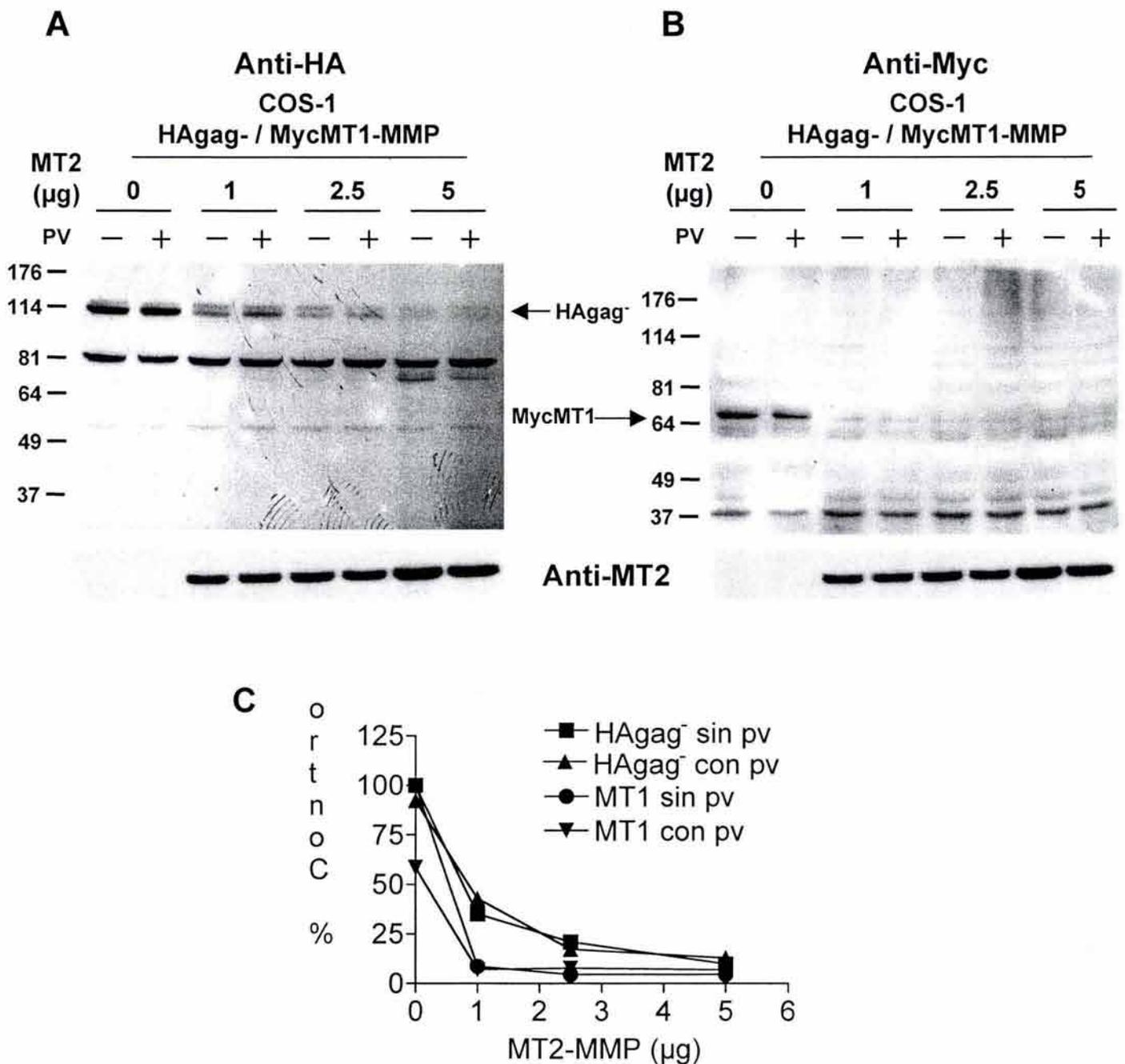


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de MT2-MMP en el contenido celular de MT1-MMP y betaglicano en las células COS-1. Las células COS-1 se cotransfectaron con 5 μ g del vector para MycMT1-MMP, 5 μ g de la construcción HA gag^- y cantidades crecientes del vector para MT2-MMP. 48 horas después de la transfección las células se incubaron por 30 minutos con o sin 100 μ M de pervanadato. Los lisados celulares totales fueron analizados por western blot con anti-HA (A), anti-c-myc (B) o anti-MT2. La localización del betaglicano (HA gag^-) o de MycMT1-MMP está indicada con flechas. C, Las bandas se cuantificaron y están representadas graficamente como el porcentaje del nivel de la proteína observada en las células transfectadas sin MT2-MMP.

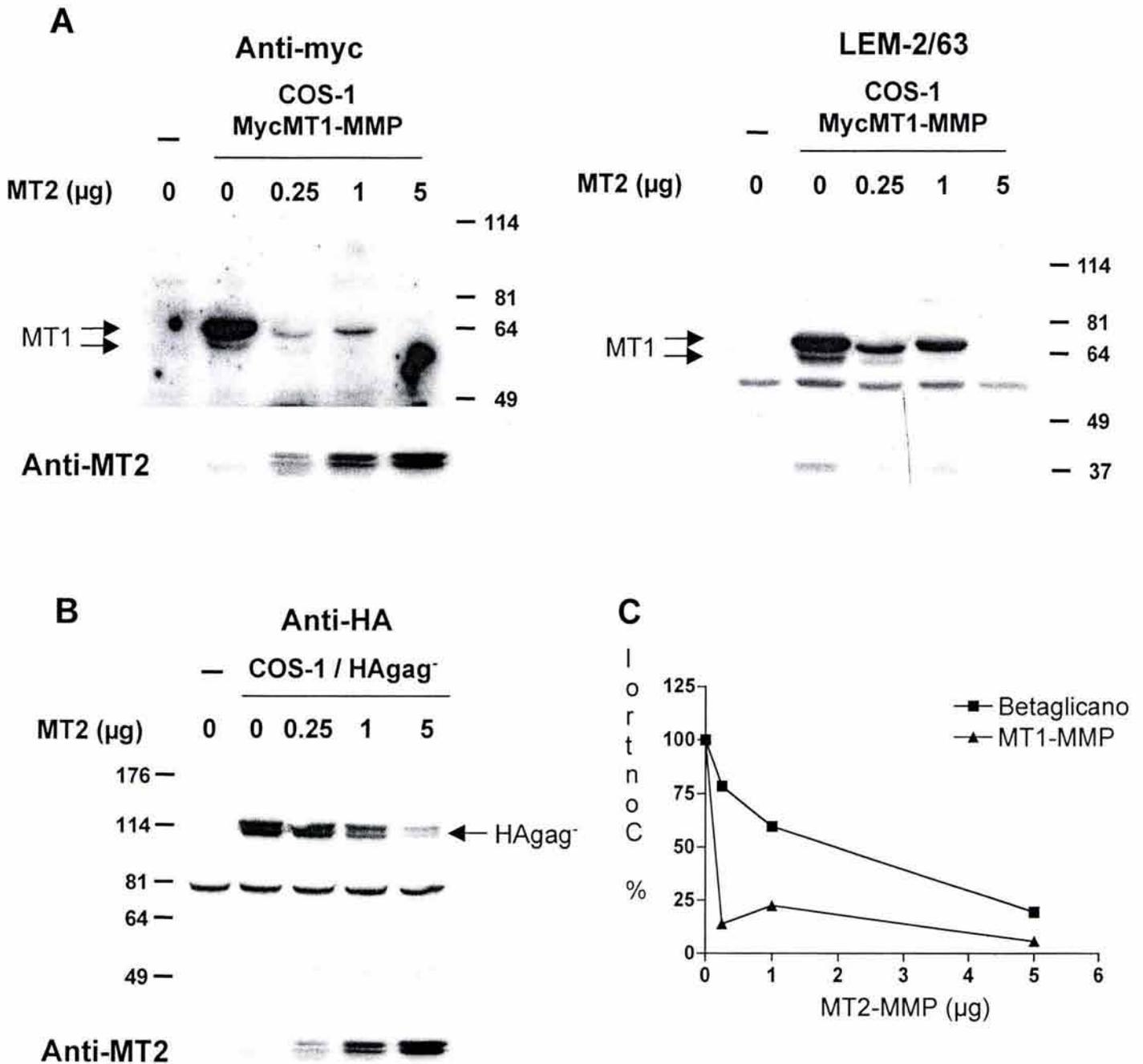


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de MT2-MMP en el contenido celular de MT1-MMP o betaglicano en las células COS-1. Las células COS-1 se cotransfectaron con 5 μ g del vector para Myc-MT1-MMP (A) o 5 μ g de la construcción HA gag^- (B) y cantidades crecientes del vector para MT2-MMP (A y B). Los lisados celulares totales fueron analizados por western blot con los anticuerpos anti-c-myc y anti-MT1 LEM-2/63 (A), anti-HA (B) y anti-MT2. La localización de MycMT1-MMP y de betaglicano (HA gag^-) está indicada con flechas. C, Las bandas se cuantificaron y están representadas gráficamente como el porcentaje del nivel de la proteína observada en las células transfectadas sin MT2-MMP.

del betaglicano membranal, lo cual explica la disminución de la producción del BGs-90 y/o BGs-120 en las distintas líneas celulares. Además, la MT1-MMP, que es responsable de generar BGs-90, también es regulada negativamente por la MT2-MMP. El mecanismo celular por el cual la MT2-MMP disminuye el contenido celular de ambas proteínas no se exploró.

IV. CARACTERIZACIÓN DEL FRAGMENTO de BGs-90

1. El fragmento de BGs-90 une al TGF- β 2.

Con el fin de verificar si el BGs-90 une al TGF- β , se realizaron ensayos de marcado por afinidad. Con este propósito las células L6E9/Myc-gag⁻ se incubaron con o sin pervanadato y posteriormente los medios y las células se marcaron por afinidad con ¹²⁵I-TGF- β 2. Después del marcado por afinidad los medios y lisados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo #822, que reconoce el ectodominio del betaglicano, o con el anticuerpo #821, que reconoce la región citosólica del betaglicano. En los lisados celulares el betaglicano membranal gag⁻ apareció como proteína medular de más de 120 kDa, como ha sido descrito anteriormente (51, 53) (Fig. 32). En los medios de células incubadas con pervanadato e inmunoprecipitadas con el anticuerpo en contra del ectodominio se observó una banda de 100 kDa, la movilidad electroforética de esta banda corresponde a la del BGs-90 unido al TGF- β . Este fragmento no está presente en los medios de células incubadas sin pervanadato o inmunoprecipitadas con la región citosólica (Fig. 32). Estos resultados indican que el fragmento BGs-90 liberado al medio por la estimulación del pervanadato es capaz de unir al TGF- β 2. Por otra parte, realizamos un marcado por afinidad del medio de células COS-1 incubadas con pervanadato y determinamos que el fragmento BGs-120 liberado por estas células también une al TGF- β 2 (Fig. 33). Sin embargo, la unión total de TGF- β del BGs-120 parece ser menor que la del BGsr, pues las bandas se ven de menor intensidad (Fig. 33).

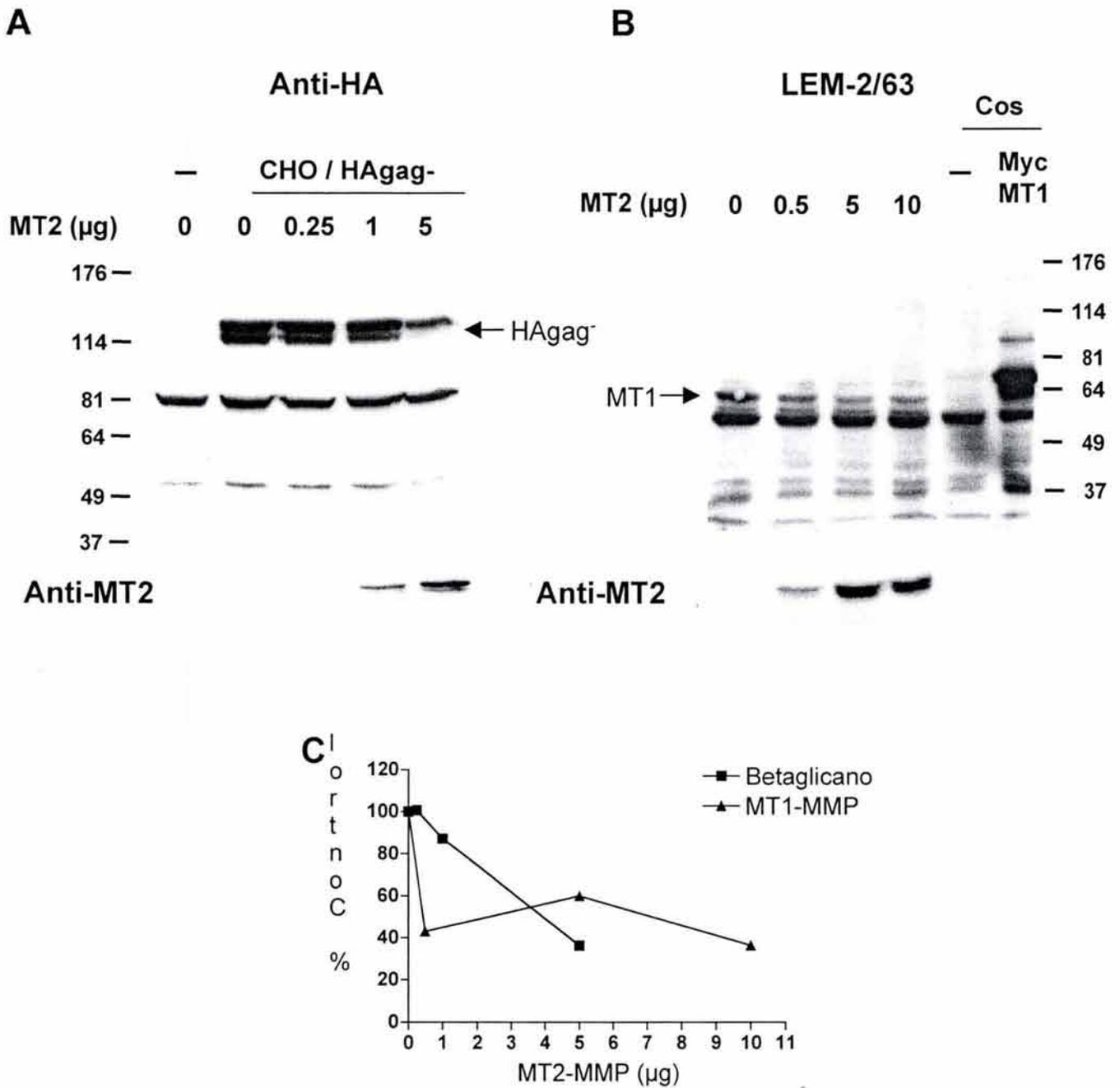


Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de MT2-MMP en el contenido celular de MT1-MMP y betaglicano en las células CHO. Las células CHO se transfectaron con 5μg de la construcción HAgag⁻ (A) y cantidades crecientes del vector para MT2-MMP (A y B). Los lisados celulares totales fueron analizados por western blot con los anticuerpos anti-HA (A), anti-MT1 LEM-2/63 (B) y anti-MT2. B, Los lisados de células COS-1 transfectadas de manera transiente con el vector vacío (-) o el cDNA de MycMT1-MMP (MycMT1) se usaron como control negativo y positivo respectivamente. Con flechas se indica la localización del betaglicano (HAgag⁻) y de MT1-MMP endógena. C, Las bandas se cuantificaron y están representadas gráficamente como el porcentaje del nivel de la proteína observada en las células transfectadas sin MT2-MMP.

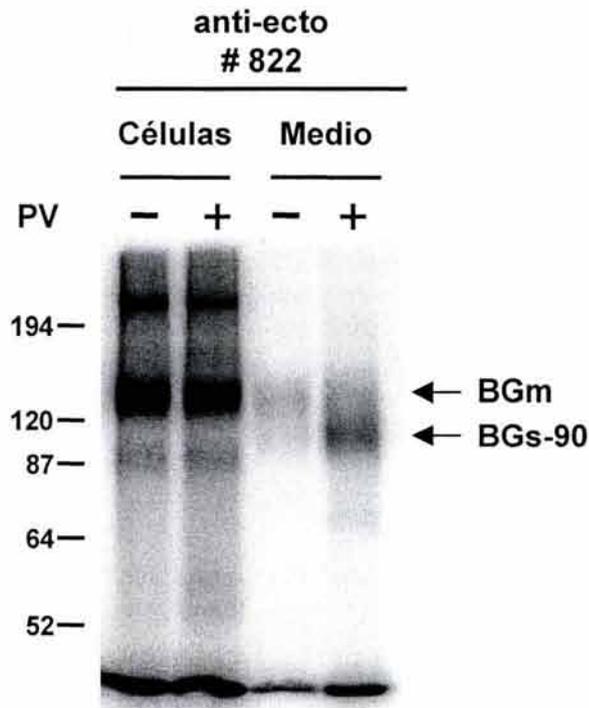
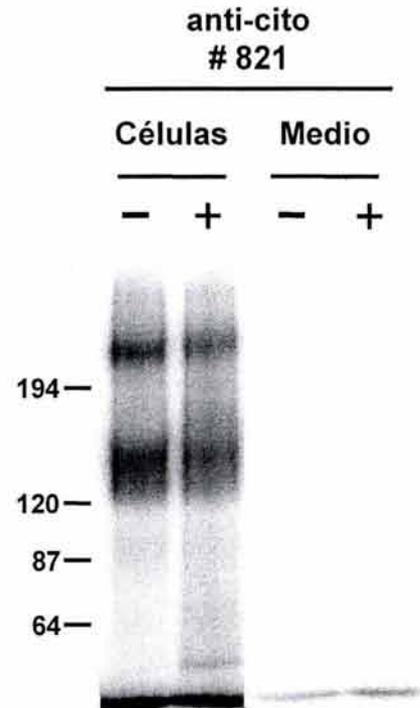
A**B**

Figura 32. El BGs-90 une TGF- β 2. Las células L6E9/ Mycgag⁻ se incubaron sin o con 100 μ M de pervanadato por 30 min en medio con 0.2% de suero. El medio se recuperó y se marcó por afinidad con 250pM de ¹²⁵I-TGF β 2. Las células se marcaron por afinidad con 200pM de ¹²⁵I-TGF β 2. Los lisados celulares y el medio se inmunoprecipitaron con el anticuerpo en contra del ectodominio del betaglicano #822 (A), o el anticuerpo en contra del dominio citosólico del betaglicano #821 (B). Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "Phosphorimager". La localización del betaglicano membranal (BGm) o del betaglicano soluble de 90 kDa (BGs-90) está indicada con flechas.

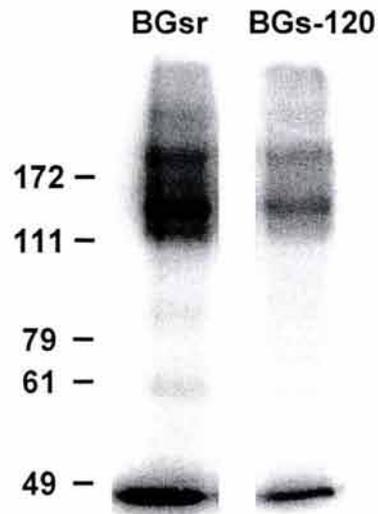


Figura 33. El BGs-120 une TGF- β 2. 10 ng de betaglicano soluble recombinante (BGsr) y 10 ng de BGs-120 se marcaron por afinidad con 100pM de ^{125}I -TGF β 2. La reacción de marcado se inmunoprecipitó con el anticuerpo en contra del ectodominio del betaglicano #822. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se visualizaron con el “Phosphorimager”.

2. El fragmento de BGs-90 une TGF- β 1 y TGF- β 2 con afinidades relativas similares al betaglicano membranal.

El betaglicano soluble recombinante que se produce en baculovirus tiene una mayor afinidad por el TGF- β 2, de manera similar al betaglicano membranal(68). Con el fin de caracterizar las propiedades de unión al TGF- β de BGs-90, se realizaron ensayos de competencia de unión del ligando. Para ello, el medio de células L6E9/Myc-gag⁻ tratadas con pervanadato que contenía 10 ng de BGs-90 se marcó por afinidad en solución con una cantidad constante de 100 pM de ¹²⁵I-TGF- β 2 y cantidades crecientes de competidor TGF- β 1 o TGF- β 2 no radiactivo (Fig. 34). Como referencia y para comparar, también se marcó por afinidad betaglicano soluble recombinante (Fig. 35). La cantidad de ¹²⁵I-TGF- β 2 entrecruzado al BGs-90 o al betaglicano soluble recombinante se cuantificó a partir de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida visualizados en el "Phosphorimager" y cuantificados en el ImageQuant y se graficó el porcentaje de ¹²⁵I-TGF- β 2 unido contra la concentración de competidor no radiactivo. El fragmento BGs-90 presentó mayor afinidad por la isoforma TGF- β 2 que por la TGF- β 1 (Fig. 34B) de manera similar al betaglicano soluble recombinante (Fig. 35B) y al betaglicano membranal (53, 68). Es importante hacer notar que la unión total de TGF- β por el BGs-90 fue menor que la del betaglicano soluble recombinante, puesto que fue necesario exponer los geles 4 veces más para obtener la misma intensidad (Fig. 34 y 35).

V. CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL CORTE DEL BETAGLICANO EN LAS CELULAS COS-7

1. La actividad proteolítica que genera al betaglicano soluble en células COS-7 es una metaloproteasa que no es sensible a TIMP-1 ni a TIMP-2.

En las células COS-7 el pervanadato estimula la producción de un betaglicano soluble que tiene una movilidad electroforética similar a la del BGs-120, que podría ser el mismo que se libera en las células COS-1 Y CHO. Los resultados presentados a continuación son la

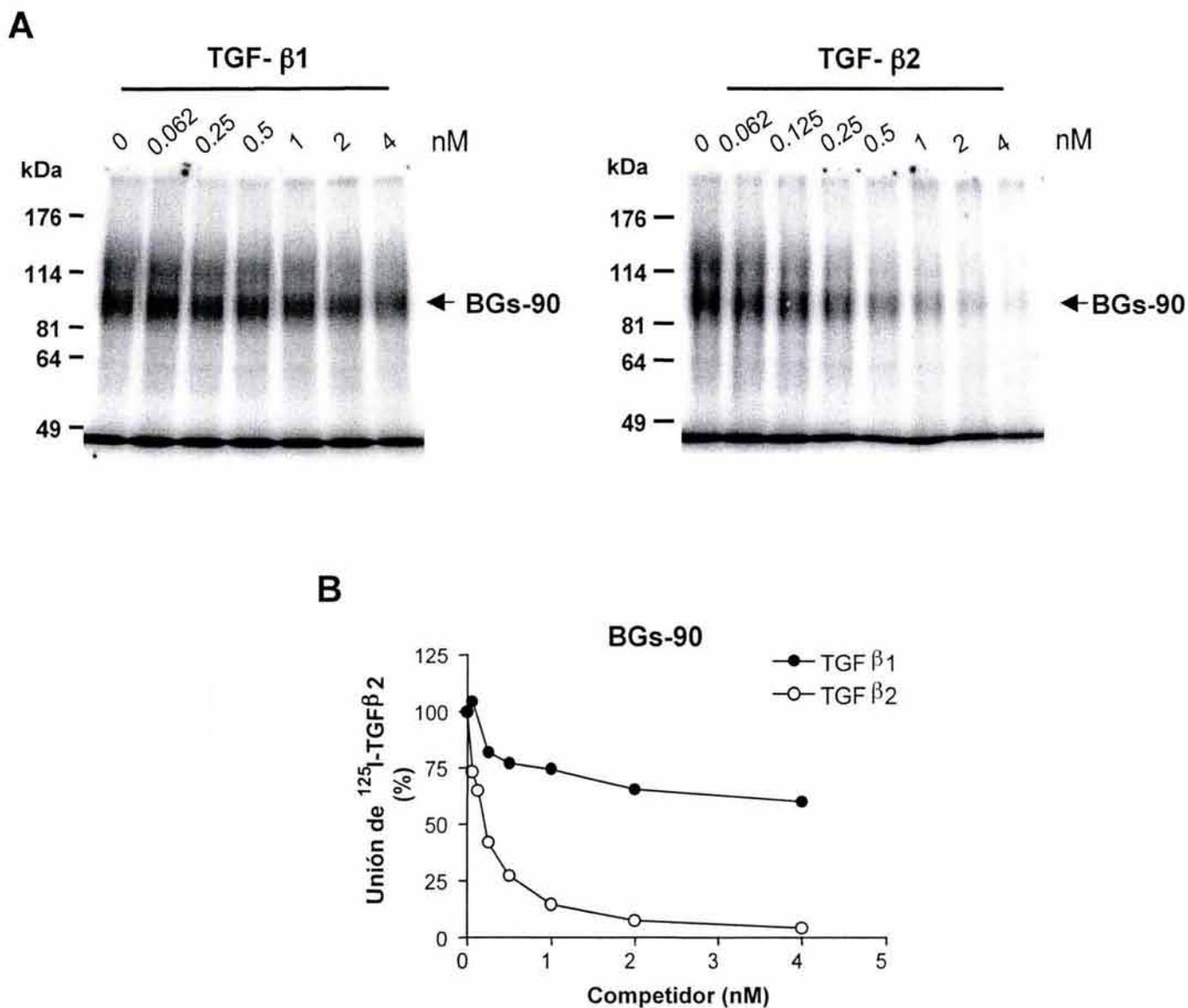


Figura 34. Ensayo de competencia de unión del TGF-β2 al BGs-90. A, El medio de células L6E9/ Mycgag⁻ tratadas con 100μM de pervanadato con 10ng de BGs-90 se marcó por afinidad con 100pM de ¹²⁵I-TGFβ2 en presencia de las concentraciones indicadas de competidor no radiactivo TGF-β1 o TGF-β2. La reacción de marcado se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se visualizaron con el “Phosphorimager”. B, los geles se cuantificaron con el programa de ImageQuant y se graficaron como el porcentaje de ¹²⁵I-TGF-β2 unido contra la concentración de competidor no radiactivo. La localización del betaglicano soluble de 90 kDa (BGs-90) está indicada. Debido a que la unión total del TGF-β fue menor para el BGs-90 que para el betaglicano soluble recombinante, los geles de BGs-90 (esta figura) se expusieron 4 veces más que los geles del betaglicano soluble recombinante (Figura 35).

caracterización preliminar de la actividad proteolítica que generan este fragmento.

Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con la construcción HA-gag⁻, se marcaron metabólicamente y se incubaron con pervanadato en presencia o ausencia de distintos inhibidores de metaloproteasas. El "shedding" del betaglicano activado con pervanadato en las células COS-7 fue bloqueado por el inhibidor de metaloproteasas derivado de ácido hidroxámico BB-94 y por el inhibidor de metaloproteasas derivado de sulfhidrilo, BMS-275291. Sin embargo, el corte no fue bloqueado por el inhibidor tisular TIMP-1 ni por TIMP-2 (Fig. 36). Este resultado indica que el corte es realizado por una metaloproteasa, pues es inhibido por BB-94 y por BMS-275291. La falta de inhibición por TIMP-2 demuestra que la metaloproteasa que corta al betaglicano en estas células no es la misma que corta a BGs-90 en las células L6E9 y CHO, puesto que ésta es inhibida por TIMP-2. Además este resultado indica que una metaloproteasa que no es sensible a TIMP-1 ni a TIMP-2 es necesaria para el corte del betaglicano inducido con pervanadato en las células COS-7.

2. La sobreexpresión de distintas ADAM induce la producción de un nuevo betaglicano soluble en las células COS-7

De las ADAM que se han caracterizado hasta ahora, ADAM-8, ADAM-9, ADAM-12 y ADAM-19 no son inhibidas ni por TIMP-1 ni por TIMP-2 (Ver Tabla 2) (161). La falta de inhibición por estas dos TIMPs del corte del betaglicano en las células COS-7, apunta a que posiblemente alguna de estas ADAM podría ser la responsable de este corte. Para evaluar el papel que pudiera tener ADAM-9, las células COS-7 se cotransfectaron con HA-gag⁻ y con ADAM-9. También se cotransfectaron las células con ADAM-10 y con un miembro de las metaloproteasas con motivos de trombospondina llamada ADAMTS-1. Las células se marcaron metabólicamente y se incubaron por 30 minutos en ausencia o presencia de pervanadato. En el medio de las células incubadas con pervanadato y que sobreexpresan tanto ADAM-9 como ADAM-10 se observó un fragmento nuevo de betaglicano soluble con movilidad electroforética un poco menor al que

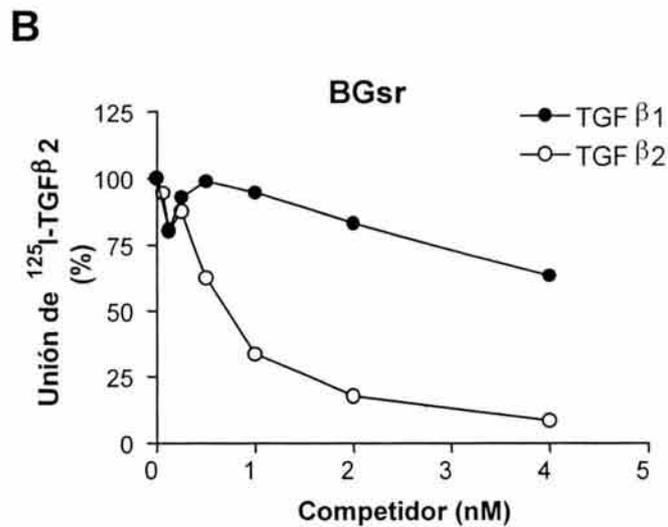
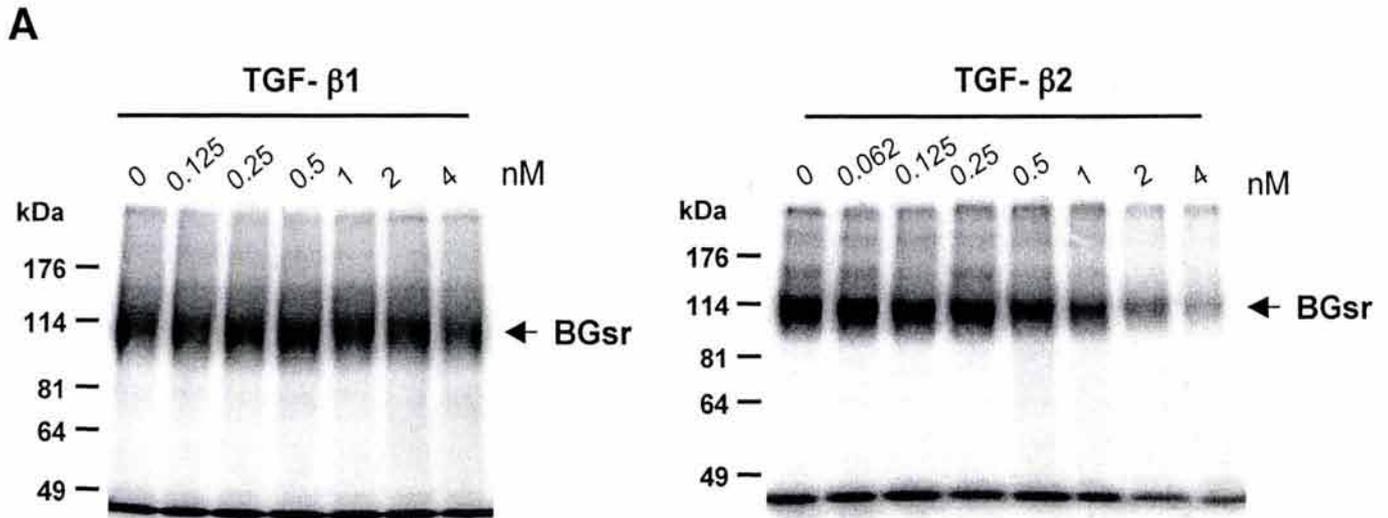


Figura 35. Ensayo de competencia de unión del TGF-β2 al betaglicano soluble recombinante. A, 10 ng de betaglicano soluble recombinante se marcaron por afinidad con 100pM de ^{125}I -TGFβ2 en presencia de las concentraciones indicadas de competidor no radiactivo TGF-β1 o TGF-β2. La reacción de marcado se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se visualizaron con el “Phosphorimager”. B, los geles se cuantificaron con el programa de ImageQuant y se graficaron como el porcentaje de ^{125}I -TGF-β2 unido contra la concentración de competidor no radiactivo. La localización del betaglicano soluble recombinante (BGsr) está indicada.

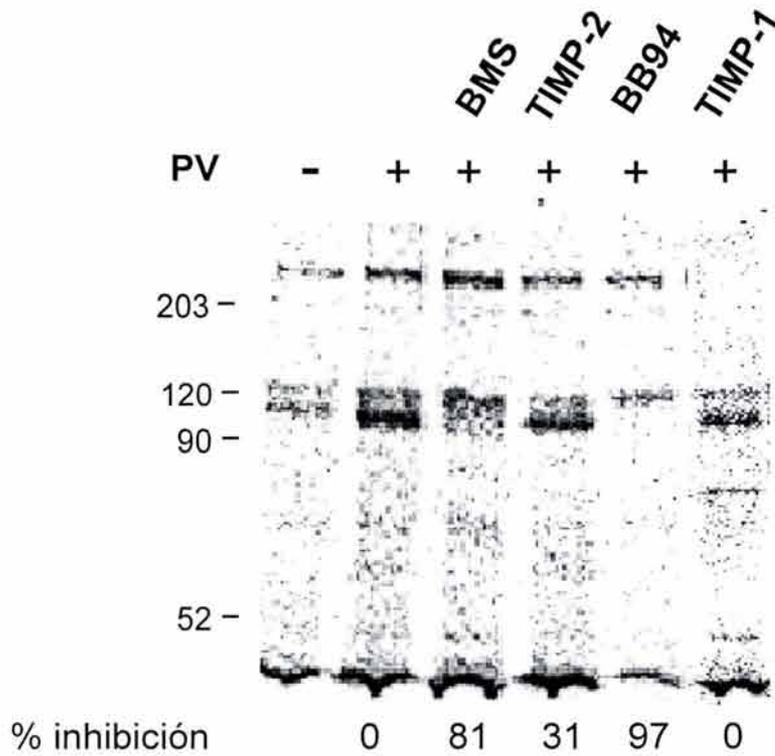


Figura 36. El corte del betaglicano en las células COS-7 no es sensible TIMP-1 ni a TIMP-2. Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con la construcción HA γ g $\bar{}$. 48 horas después de la transfección las células se marcaron metabólicamente por 2 horas y se incubaron por 2 horas en medio completo. Las células marcadas se incubaron con o sin 100 μ M de pervandato por 30 min en ausencia o presencia de 100 μ M BMS, 5 μ M BB-94, 5 μ g/ml de TIMP-1 o TIMP-2 como indicado. Los medios de las células se inmunoprecipitaron con un anticuerpo en contra del epítipo HA. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE, se analizaron en el “Phosphorimager” y se cuantificaron en el ImageQuant. El porcentaje de inhibición corresponde a la inhibición de la liberación del betaglicano al medio en ausencia de inhibidor.

se observó en las células transfectadas con el plásmido control pcDNA3 (comparar * y ** en la Fig. 37). Este resultado sugiere que tanto ADAM-9 como ADAM-10 podrían cortar al betaglicano al ser activadas con pervanadato, lo cual resulta en un betaglicano soluble nuevo.

También se evaluó si alguna de estas 3 metaloproteasas ADAM-9, ADAM-10 o ADAMTS-1 están involucradas en el corte constitutivo del betaglicano. Para ello, las células COS-7 cotransfectadas con HA-gag⁻ y con las distintas metaloproteasas, se marcaron metabólicamente y se incubaron por distintas horas en medio sin suero. Ninguna de las tres metaloproteasas sobreexpresadas está involucrada en el corte constitutivo, puesto que el medio de las células que sobreexpresan a éstas se observó igual que el medio de las células que están transfectadas con el plásmido control pcDNA3 (Fig. 38).

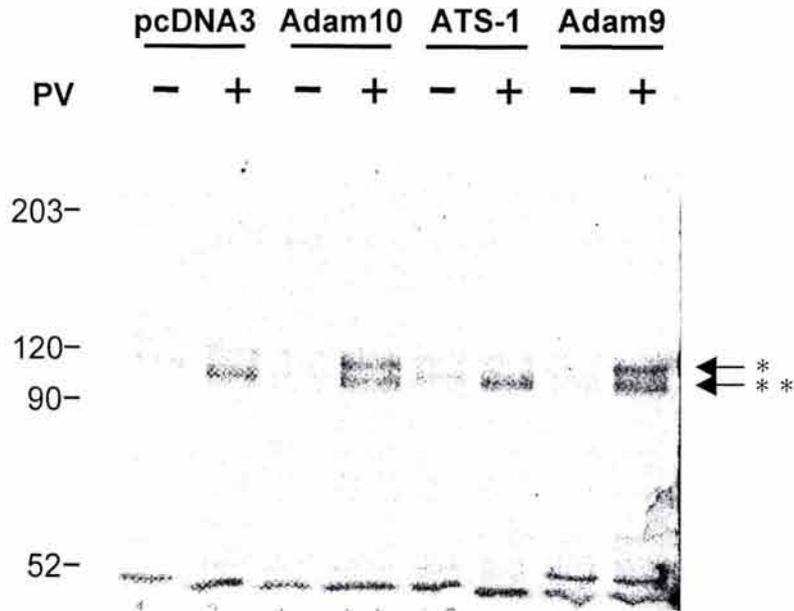


Figura 37. Efecto de la expresión de distintas ADAM en el "shedding" del betaglicano en las células COS-7. Las células COS-7 se co-transfectaron con la construcción HA_{gag}⁻ y con ADAM 9, ADAM 10, ADAMTS-1 (ATS-1) o el plásmido vacío pcDNA3 como control, 48 horas después de la transfección las células se marcaron metabólicamente y se incubaron sin o con 100 μ M de pervandato por 30 min en medio con 0.2% de suero. Después de la incubación los medios se inmunoprecipitaron con un anticuerpo en contra del epítotope HA. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el "Phosphorimager".

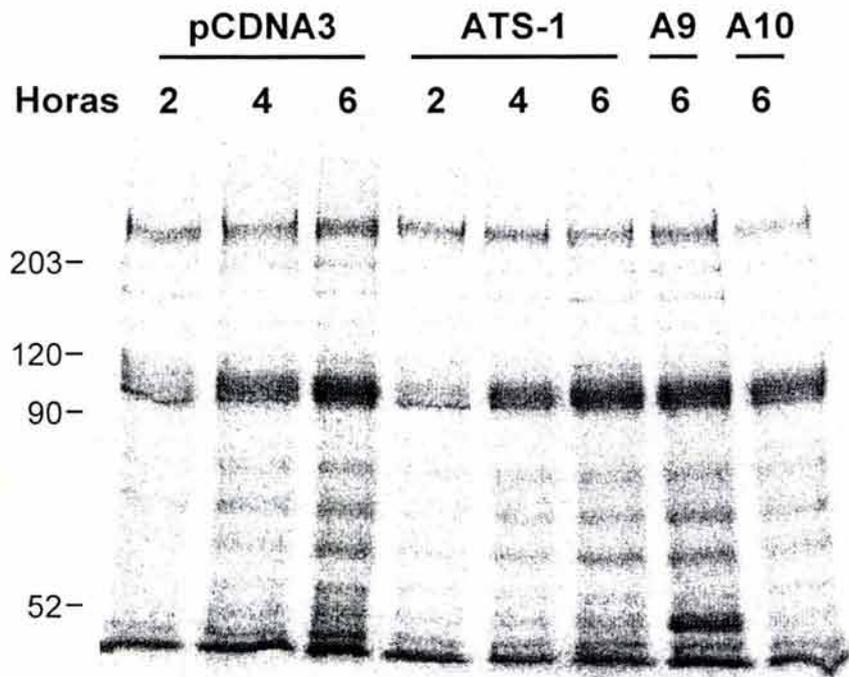


Figura 38. Efecto de la expresión de distintas ADAM en el corte constitutivo del betaglicano en las células COS-7. Las células COS-7 se co-transfectaron con la construcción HA gag^- y con ADAMTS-1 (ATS-1), ADAM 9 (A9), ADAM 10 (A10) o el plásmido vacío pcDNA3 como control, 48 horas después de la transfección las células se marcaron metabólicamente por 2 horas, se incubaron por 2 horas en medio completo y posteriormente se incubaron por distintas horas en medio sin suero. Después de la incubación los medios se inmunoprecipitaron con un anticuerpo en contra del epítopo HA. Los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-PAGE y se analizaron en el “Phosphorimager”.

DISCUSION

El corte del betaglicano es un proceso regulado

Los resultados presentados en este estudio demuestran que el betaglicano soluble puede ser generado por un corte proteolítico de la región extracelular del betaglicano membranal. Sin embargo, este corte es regulado de una manera distinta al corte de la mayor parte de las proteínas transmembranales estudiadas hasta ahora. En contraste con la mayoría de las proteínas transmembranales el corte del ectodominio del betaglicano no es estimulado con el PMA (153), sino que es activado con el pervanadato, un potente inhibidor general de fosfatasa de tirosina. Lo anterior indica que la actividad proteolítica responsable del corte del betaglicano está regulada por la fosforilación en tirosina de algún componente no identificado. En reportes recientes se ha descrito que el corte de otras proteínas transmembranales también puede ser activado por el pervanadato. Estas proteínas incluyen los receptores HER2 y HER4, que pertenecen a la familia de receptores a EGF (129, 159), la pro-anfiregulina (159), que es un precursor de un factor de crecimiento, el proteoglicano sindecan-1 (136), el precursor del péptido β -amiloide (β APP) (139) y TRANCE en las células CHO y fibroblastos (114). Sin embargo, el corte de la mayoría de estas proteínas también puede ser activado con el PMA. El corte del betaglicano es el tercer caso descrito de una proteína cuyo corte sólo es activado con el pervanadato. Los otros dos casos descritos son el receptor HER 2 (129) y TRANCE (114).

Diferentes líneas celulares liberan al medio betaglicano soluble de distinto tamaño

El betaglicano soluble que se había descrito previamente en medios de cultivo celulares corresponde al betaglicano soluble liberado de manera constitutiva por las células 3T3-L1 (66). Debido a que este betaglicano endógeno posee cadenas de glicosaminoglicanos, para poder determinar la masa molecular de la proteína medular tuvieron que digerir estas cadenas con condroitinasa y heparitinasa, y encontraron que tenía entre 100 a 120 kDa (66). En el presente estudio, se utilizó una versión de betaglicano que no tiene cadenas de

glicosaminoglicanos, con lo cual se pudo analizar la proteína medular directamente sin tener que digerirlas. Así, se encontró que con el tratamiento del pervanadato se estimula la liberación de un betaglicano soluble similar al descrito con anterioridad de ~ 120 kDa y que comprende el dominio extracelular completo del betaglicano (BGs-120). Pero además, el tratamiento con el pervanadato estimula la producción de un fragmento de betaglicano soluble nuevo de ~ 90 kDa (BGs-90), que corresponde a sólo parte del ectodominio, y que no había sido descrito con anterioridad. Además, se determinó que el pervanadato activa la producción de estos dos betaglicanos solubles de manera distinta dependiendo de la línea celular. Los mioblastos de rata L6E9 liberan el fragmento BGs-90, mientras que las células COS-1 producen el fragmento BGs-120 y las células CHO producen ambos fragmentos (Fig. 15 y 39). La producción de ambos fragmentos es inhibida por el inhibidor de metaloproteasas de amplio espectro BB-94, lo que sugiere que el betaglicano es sustrato de dos o más metaloproteasas dependientes de zinc. Además en los mioblastos L6E9 el corte constitutivo del betaglicano también ocurre en estos dos sitios y se generan tanto BGs-120 como BGs-90 (Fig. 14 y Fig. 39).

El BGs-90 es producido por la MT1-MMP

El efecto de los inhibidores tisulares TIMPs se ha usado previamente para caracterizar la identidad de una metaloproteasa involucrada en cierto evento de "shedding". Por ejemplo, la metaloproteasa TACE es inhibida por TIMP-3, pero no por TIMP-2 o TIMP-1(119), mientras que la mayoría de las MT-MMPs son inhibidas por TIMP-2, pero no por TIMP-1 o TIMP-3 (106-110, 162). En este trabajo se encontró que la actividad proteolítica activada con el pervanadato y que resulta en la producción del fragmento de BGs-90 en las células L6E9 es inhibida por TIMP-2, pero no por TIMP-1. Este resultado apunta a que TACE no está involucrada en el corte del betaglicano estimulado con el pervanadato y argumenta en favor de miembros de la subfamilia de metaloproteasas MT-MMP. Otro resultado que confirma que TACE no está involucrada en este corte, es que el pervanadato activa el corte del betaglicano en las células mutantes M1, las cuales tienen

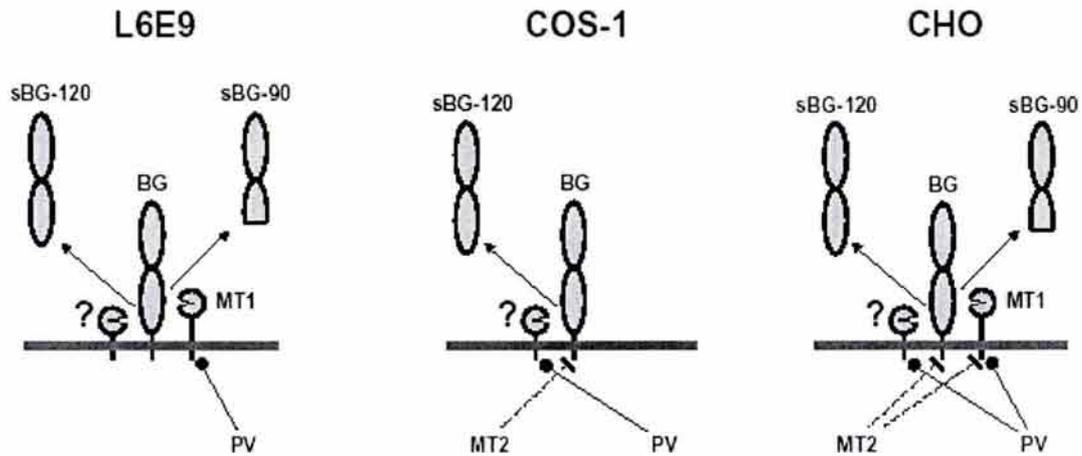


Figura 39. Representación esquemática de las proteasas involucradas en el "shedding" del ectodominio del betaglicano identificadas en este trabajo. El betaglicano anclado a la membrana (BG) puede ser sustrato de diferentes metaloproteasas que cortan su ectodominio y liberan distintas formas de receptor soluble (BGs-90 y BGs-120). Las células L6E9 liberan de manera constitutiva BGs-90 y BGs-120, con la estimulación del pervanadato (PV) incrementan la liberación del BGs-90 por estimulación de su MT1-MMP endógena (MT1). En las células COS-1, que carecen de MT1- y MT3-MMP, el pervanadato estimula a una metaloproteasa desconocida (?) que aumenta el "shedding" del BGs-120. En las células CHO, el pervanadato aumenta el "shedding" tanto de BGs-90 como de BGs-120 por estimulación de la MT1-MMP endógena y de una metaloproteasa desconocida, respectivamente. Por un mecanismo desconocido, la expresión ectópica de MT2-MMP (MT2) hace que disminuya el betaglicano y la MT1-MMP en las células COS-1 y CHO.

mutado un componente específico que previene la activación de TACE y no de otras metaloproteasas (116). Además la mayor parte de los cortes de proteínas activados con el PMA son realizados por TACE (163) y en este estudio hemos demostrado que el corte del betaglicano no es activado con el PMA.

Hasta la fecha se han descrito seis miembros de la subfamilia de MT-MMP (106-111). De entre los seis miembros de MT-MMPs, solamente MT4-MMP no es inhibida por TIMP-2 (110) y MT6-MMP es inhibida tanto TIMP-2 como por TIMP-1 (162), lo cual descarta a MT4- y a MT6- MMP como las proteasas que generan al BGs-90. De acuerdo con esto, observamos que la sobreexpresión de MT4- o MT6-MMPs en las células L6E9 no aumentó la producción de BGs-90. Por otra parte, la sobreexpresión de MT1-MMP y MT3-MMP en las células L6E9 aumentó de manera significativa la producción basal de BGs-90, y MT1-MMP incrementó significativamente la liberación de BGs-90 estimulada con el pervanadato. Este resultado indica que las metaloproteasas MT1 y MT3-MMP, participan en el "shedding" del betaglicano. El experimento realizado con las células COS-1, donde sobreexpresamos a las seis MT-MMP, confirman esta conclusión. Mientras que las células COS-1 parentales producen solamente el fragmento BGs-120, al transfectar con MT1- y MT3-MMP se dejó de producir este fragmento y se produjo el fragmento BGs-90. La transfección con las demás MT-MMP no tuvo ningún efecto. Así, estos datos nos permiten concluir que la proteasa estimulada con el pervanadato que lleva a la producción de BGs-90 es probablemente una MT-MMP, específicamente MT1-y/o MT3-MMP. El análisis por Northern Blot de la expresión de MT1-MMP y MT3-MMP reveló que las células L6E9 y CHO, que generan al BGs-90, expresan a la MT1-MMP, pero no a la MT3-MMP. Por lo tanto en las células L6E9 y CHO la responsable de generar al BGs90 es la MT1-MMP (Fig. 39). Sin embargo, los experimentos de transfección indican que en aquellas líneas celulares donde se coexpresen el betaglicano y la MT3-MMP también se podría generar el BGs-90. Las células COS-1 no expresan a la MT1- ni a la MT3-MMP, lo cual confirma que estas MT-MMPs están involucradas en la producción de BGs-90, puesto que estas células generan al BGs-120 y sólo adquieren la habilidad de producir al BGs-90 al

ser transfectadas con la MT1- o la MT3-MMP (Fig. 23).

Además de su papel en la remodelación de la matriz extracelular, la MT1-MMP está involucrada en el "shedding" de varias proteínas de membrana. Por ejemplo, la sobreexpresión de MT1-MMP en células de la glioma o de fibrosarcoma lleva al "shedding" de la trasglutaminasa tisular (164). La molécula de adhesión CD44 es cortada de la superficie celular directamente por MT1-MMP y MT3-MMP (115). Es decir, pareciera que la MT1- y la MT3-MMP tienen sustratos similares. Al igual que en este trabajo, ellos demostraron que la sobreexpresión de los otros miembros de las MT-MMP no tuvo ningún efecto. De manera interesante, una de las proteasas que cortan a TRANCE es muy similar a la que produce a BGs-90: es activada por pervanadato, pero no por PMA, es inhibida por TIMP-2 y no por TIMP-1, y al igual que para el betaglicano, se ha propuesto a MT1-MMP como la metaloproteasa responsable del corte de TRANCE (114).

La MT2-MMP disminuye los niveles de betaglicano y de MT1-MMP

Una observación sorprendente de este trabajo es el efecto de la MT2-MMP sobre el betaglicano y la MT1-MMP. Los estudios muestran que la MT2-MMP disminuye de manera dosis dependiente el contenido celular del betaglicano y de la MT1-MMP, esta última tanto cotransfectada como endógena. La disminución del betaglicano membranal por la MT2-MMP tiene como efecto indirecto una disminución de betaglicano soluble en el medio (Fig. 26 y 27). Además de ser relevante para el "shedding" del betaglicano, el efecto de MT2-MMP sobre la MT1-MMP tiene implicaciones importantes, puesto que a la MT1-MMP se le ha asociado con invasión, morfogénesis y potencia metastásica de células epiteliales (165, 166). El mecanismo por el cual la MT2-MMP regula a la MT1-MMP y al betaglicano no se exploró en este trabajo y queda por ser determinado experimentalmente.

El BGs-90 une TGF- β 2 con una afinidad relativa similar al betaglicano membranal y al betaglicano soluble recombinante

El ectodominio del betaglicano tiene dos regiones de unión para el TGF- β (51, 53,

54, 68). Una de las regiones está en la mitad amino-terminal (relacionada a endoglina o región E) y la otra en la mitad carboxilo terminal (relacionada a uromodulina o región U) (Fig. 5). El dominio de unión a inhibina reside en la región U (53). Considerando el tamaño aparente de BGs-90 y BGs-120, pensamos que ambos fragmentos solubles debían unir al TGF- β , puesto que retienen al menos una de las regiones de unión al ligando completa (Fig. 15B). Los resultados de los ensayos de marcado por afinidad confirmaron esta idea, puesto que tanto el BGs-90 como el BGs-120 unieron al TGF- β 2 (Fig. 32 y 33). Sin embargo, es importante resaltar que la unión total al TGF- β fue menor para ambos fragmentos que para el betaglicano soluble recombinante (Fig. 34 y 35). Una posible explicación es que el marcado por afinidad del betaglicano soluble recombinante se realiza con la proteína purificada, mientras que los fragmentos no se purifican y otras proteínas presentes en el medio podrían estar interfiriendo con la unión. A pesar de que la unión total fue menor, la afinidad relativa del BGs-90 por las distintas isoformas del TGF- β fue comparable a la del receptor membranal, pues unió mejor al TGF- β 2 que al TGF- β 1 (Fig. 34 y 35), lo cual era de esperarse puesto que el BGs-90 comprende toda la región E del ectodominio del betaglicano, la cual se ha demostrado previamente que tiene una preferencia por las isoformas del TGF- β similar a las del receptor completo (53).

El hecho de que BGs-90 y BGs-120 unan al TGF- β sugiere que podrían tener alguna función fisiológica. La función del receptor soluble puede ser distinta a la función del receptor anclado a la membrana. Algunas de las funciones de los receptores solubles incluye el secuestrar al ligando, aumentar la vida media del ligando o bien servir de reservorio (72). Sin embargo, pensamos que la función más probable de estos fragmentos sea la de inhibir al TGF- β de la misma forma que lo hace el betaglicano soluble recombinante (68). La mejor manera de determinarlo experimentalmente será conocer el sitio exacto de corte de ambos fragmentos, producirlos de manera recombinante, purificarlos y probar su efecto inhibitorio.

BGs-120 es producido por una metaloproteasa distinta a la que genera a BGs-90

En lo que se refiere a la caracterización del corte de BGs-120 en las células COS-1 es

muy poco lo que se puede concluir hasta el momento. Lo único que podemos decir es que la proteasa que genera a BGs-120 es distinta a la que corta a BGs-90, puesto que las células COS-1 no expresan a la metaloproteasa que genera a BGs-90, específicamente la MT1-MMP, además cuando las células se transfectan con MT1- o MT3-MMP el corte que produce BGs-120 desaparece y sólo se genera a BGs-90.

En cuanto al corte del betaglicano en las células COS-7 el pervanadato activa la liberación de un betaglicano soluble que parece corresponder al BGs120 o que por lo menos también comprende todo el ectodominio del betaglicano. Este corte no fue inhibido ni por TIMP-1 ni por TIMP-2, pero sí fue bloqueado por los inhibidores de metaloproteasas BB-94 y BMS-275291 (Fig. 36). La falta de inhibición por TIMP-1 y -2 indica que ninguno de los miembros de las MMP o MT-MMP es la metaloproteasa que produce a este betaglicano soluble, puesto que todos son inhibidos por alguno o ambos TIMPs. De los miembros de metaloproteasa-disintegrina que se han caracterizado hasta ahora, ADAM-8, ADAM-9, ADAM-12 y ADAM-19 no son inhibidos ni por TIMP-1 ni por TIMP-2 (161). La falta de inhibición por TIMP-1 y TIMP-2 apuntan a que posiblemente alguna de estas ADAM podría ser la responsable de este corte. Por otra parte, el inhibidor BMS-275291 bloquea a las metaloproteasas solubles de la matriz MMP-1, -2, -7 y -9, mientras que no bloquea el "shedding" de varias proteínas cuyo corte es realizado por TACE (124). La inhibición por BMS-275291 sugeriría que alguna de las MMP a las que bloquea podría estar involucrada, sin embargo una vez más la falta de inhibición por TIMP-1 descarta esta posibilidad, puesto que todas las MMP son inhibidas por TIMP-1 y -2 (112). Debido a que TACE no es inhibida por el BMS-275291, la inhibición del corte por este compuesto sugiere que TACE no está involucrada, sin embargo aún no se ha estudiado si el BMS-275291 inhibe a otros miembros de las ADAM.

La falta de inhibición del corte del betaglicano por TIMP-1 o TIMP-2 en las células COS-7 nos llevó a evaluar el papel que pudiera tener alguna de las ADAM que no son inhibidas por estos TIMPs. De éstas, sólo pudimos sobreexpresar a la ADAM-9 y los resultados presentados son aún preliminares. Estos datos sugieren que tanto ADAM-9

como ADAM-10 son capaces de cortar al betaglicano, con lo cual se genera un betaglicano soluble nuevo que también comprende todo el ectodominio.

El hecho de que el betaglicano sea cortado por al menos dos proteasas diferentes no es inesperado. Varios reportes han demostrado la posibilidad de que diferentes actividades proteolíticas corten el mismo sustrato. Por ejemplo, la proteína TRANCE puede ser cortada por dos diferentes metaloproteasas: la metaloproteasa MT1-MMP en los fibroblastos y las células CHO, y otra metaloproteasa no identificada en células COS-7 (114). La metaloproteasa en los fibroblastos y células CHO es estimulada por pervanadato, pero no por PMA y es inhibida por TIMP-2 pero no por TIMP-1, mientras que la metaloproteasa en las células COS-7 es refractaria al pervanadato y no es inhibida por TIMP-1 o -2 (114). Otro ejemplo es el del pro-TNF- α , el cual es cortado por diferentes proteasas en distintas células y condiciones. Se sabe que TACE es la principal proteasa que corta al pro-TNF- α en muchos tipos celulares (82, 86, 142), pero la MMP-7 o matrilisina (101), la ADAM 10 (167) y la MT4-MMP (110) también pueden cortar al pro-TNF- α . Por otra parte, se ha demostrado de manera reciente que el pro-TGF- α puede ser cortado por TACE y por una metaloproteasa distinta aún no identificada (91).

CONCLUSIONES

- El corte del ectodominio del betaglicano es un proceso regulado que puede ser estimulado con pervanadato en varias líneas celulares.
- El ectodominio del betaglicano puede ser cortado en distintos sitios y generar betaglicano soluble de distintos tamaños dependiendo el tipo celular. Con la activación del pervanadato los mioblastos L6E9 generan un betaglicano de 90 kDa (BGs-90), las células COS un betaglicano de 120 kDa (BGs-120) y las células CHO generan ambos fragmentos.
- El corte que genera al BGs-90 es realizado por las metaloproteasas MT1-MMP y/o MT3-MMP.
- El corte activado con pervanadato que genera al BGs-90 en los mioblastos L6E9 y en las células CHO es realizado por la metaloproteasa MT1-MMP.
- El corte del betaglicano activado con pervanadato que genera al BGs-120 en las células COS es realizado por una metaloproteasa distinta a la que genera al BGs-90, pero queda por ser identificada.
- El BGs-90 tiene una afinidad relativa por las isoformas del TGF- β 1 y TGF- β 2 similar al betaglicano soluble recombinante y al betaglicano membranal, siendo ésta TGF- β 2 > TGF- β 1.
- La capacidad del BGs-90 de unir TGF- β sugiere que podría tener alguna función fisiológica, siendo la más probable el bloquear el acceso del TGF- β a los receptores de señalamiento y con eso modular las acciones de este factor.

PERSPECTIVAS

Se caracterizará a la proteasa que genera al BGs-120 con una aproximación similar a la que se utilizó para caracterizar a la proteasa que genera al BGs-90. Así mismo, se caracterizarán más a fondo ambos cortes, entre los objetivos generales a alcanzar están:

- Determinar si las proteasas que se identificaron como las responsables de generar al BGs-90 y al BGs-120 son capaces de cortar al betaglicano en un ensayo *in vitro*.
- Determinar los sitios exactos de corte.
- Conociendo el sitio de corte expresar las proteínas solubles BGs-90 y BGs-120 de manera recombinante y caracterizar su capacidad para bloquear la unión del TGF- β a sus receptores de señalamiento.
- Determinar las condiciones fisiológicas en las que hay un aumento de uno o ambos cortes.
- Caracterizar los estímulos fisiológicos que activa los cortes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Massague, J., Blain, S.W., and Lo, R.S. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295-309.
2. Shi, Y., and Massague, J. 2003. Mechanisms of TGFbeta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
3. Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
4. Kingsley, D.M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146.
5. Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618-10624.
6. Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I., and Rifkin, D.B. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51:1376-1382.
7. Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., and Bouck, N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93:1159-1170.
8. Murphy-Ullrich, J.E., and Poczatek, M. 2000. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:59-69.
9. O'Connor-McCourt, M.D., and Wakefield, L.M. 1987. Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 262:14090-14099.
10. Yamaguchi, Y., Mann, D.M., and Ruoslahti, E. 1990. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-284.
11. Clark, D.A., and Coker, R. 1998. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30:293-298.
12. Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774.
13. Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124:2659-2670.
14. Kaartinen, V., Voncken, J.W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11:415-421.

15. Roberts, A.B.a.W., L.M. 2003. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8621-8623.
16. Leof, E.B., Proper, J.A., Goustin, A.S., Shipley, G.D., DiCorleto, P.E., and Moses, H.L. 1986. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2453-2457.
17. Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M., and Grotendorst, G.R. 1993. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637-645.
18. Assoian, R.K., Frolik, C.A., Roberts, A.B., Miller, D.M., and Sporn, M.B. 1984. Transforming growth factor-beta controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. *Cell* 36:35-41.
19. Letterio, J.J., and Roberts, A.B. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16:137-161.
20. Ignatz, R.A., and Massague, J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345.
21. Wrana, J.L., Maeno, M., Hawrylyshyn, B., Yao, K.L., Domenicucci, C., and Sodek, J. 1988. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 106:915-924.
22. Laiho, M., Saksela, O., and Keski-Oja, J. 1986. Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 164:399-407.
23. Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P., and Heath, J.K. 1987. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J* 6:1899-1904.
24. Roberts, A.B., and Sporn, M.B. 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8:1-9.
25. Border, W.A., and Noble, N.A. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292.
26. Blobel, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-1358.
27. Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K.K., and Massague, J. 1990. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 265:20533-20538.
28. Gougos, A., and Letarte, M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265:8361-8364.

29. Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J.L., Lane, W.S., and Massague, J. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67:785-795.
30. Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.
31. Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J., and Massague, J. 2001. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell* 8:671-682.
32. Chen, Y.G., Liu, F., and Massague, J. 1997. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *Embo J* 16:3866-3876.
33. Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., and Massague, J. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014.
34. Luo, K., and Lodish, H.F. 1997. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *Embo J* 16:1970-1981.
35. Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P.A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J.L. 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215-1224.
36. Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., and Gelbart, W.M. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139:1347-1358.
37. Zhang, Y., Feng, X., We, R., and Derynck, R. 1996. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- beta response. *Nature* 383:168-172.
38. Massague, J., and Wotton, D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 19:1745-1754.
39. Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95:779-791.
40. Xu, L., Chen, Y.G., and Massague, J. 2000. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2:559-562.
41. Chen, X., Rubock, M.J., and Whitman, M. 1996. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 383:691-696.
42. Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
43. Hata, A., Lagna, G., Massague, J., and Hemmati-Brivanlou, A. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12:186-197.
44. Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W.,

- Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., et al. 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89:1165-1173.
45. Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M., et al. 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133:1109-1121.
46. St-Jacques, S., Forte, M., Lye, S.J., and Letarte, M. 1994. Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 51:405-413.
47. McAllister, K.A., Baldwin, M.A., Thukkani, A.K., Gallione, C.J., Berg, J.N., Porteous, M.E., Guttmacher, A.E., and Marchuk, D.A. 1995. Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum Mol Genet* 4:1983-1985.
48. Shovlin, C.L. 1997. Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost* 78:145-150.
49. Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030.
50. Barbara, N.P., Wrana, J.L., and Letarte, M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- beta superfamily. *J Biol Chem* 274:584-594.
51. Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., and Massague, J. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124:557-568.
52. Andres, J.L., DeFalcis, D., Noda, M., and Massague, J. 1992. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 267:5927-5930.
53. Esparza-Lopez, J., Montiel, J.L., Vilchis-Landeros, M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. 2001. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor- {beta} superfamily. Specialized binding sites for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* 276:555-565.
54. Pepin, M.C., Beauchemin, M., Collins, C., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M.D. 1995. Mutagenesis analysis of the membrane-proximal ligand binding site of the TGF-beta receptor type III extracellular domain. *FEBS Lett* 377:368-372.
55. Massague, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.

56. Segarini, P.R., Roberts, A.B., Rosen, D.M., and Seyedin, S.M. 1987. Membrane binding characteristics of two forms of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 262:14655-14662.
57. Cheifetz, S., and Massague, J. 1991. Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem* 266:20767-20772.
58. Lopez-Casillas, F., Wrana, J.L., and Massague, J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444.
59. Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Bassols, A., and Massague, J. 1987. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329:539-541.
60. Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Smal, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M., and Zhu, H.-J. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor β Type III receptor-deficient embryos. *Molecular and Cellular Biology* 23:4371-4385.
61. Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., and Vale, W. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404:411-414.
62. Wiater, E., and Vale, W. 2003. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 278:7934-7941.
63. Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M., and Wells, R.G. 2002. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 277:823-829.
64. Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., and Barnett, J.V. 1999. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283:2080-2082.
65. Boyer, A.S., and Runyan, R.B. 2001. TGFbeta Type III and TGFbeta Type II receptors have distinct activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev Dyn* 221:454-459.
66. Andres, J.L., Stanley, K., Cheifetz, S., and Massague, J. 1989. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 109:3137-3145.
67. Zhang, M., Zola, H., Read, L., and Penttila, I. 2001. Identification of soluble transforming growth factor-beta receptor III (sTbetaII) in rat milk. *Immunol Cell Biol* 79:291-297.
68. Vilchis-Landeros, M.M., J, L.M., Mendoza, V., Mendoza-Hernandez, G., and Lopez-Casillas, F. 2001. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* 355:215-222.
69. Vilchis-Landeros, M.M., and Lopez-Casillas, F. 2003.

70. Bandyopadhyay, A., Lopez-Casillas, F., Malik, S.N., Montiel, J.L., Mendoza, V., Yang, J., and Sun, L.Z. 2002. Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Res* 62:4690-4695.
71. Fernandez-Botran, R., Chilton, P.M., and Ma, Y. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv Immunol* 63:269-336.
72. Hooper, N.M., Karran, E.H., and Turner, A.J. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem J* 321:265-279.
73. Heaney, M.L., and Golde, D.W. 1998. Soluble receptors in human disease. *J Leukoc Biol* 64:135-146.
74. Schlondorff, J., and Blobel, C.P. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112:3603-3617.
75. Arribas, J., and Borroto, A. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 102:4627-4638.
76. Mohler, K.M., Sleath, P.R., Fitzner, J.N., Cerretti, D.P., Alderson, M., Kerwar, S.S., Torrance, D.S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., et al. 1994. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 370:218-220.
77. McGeehan, G.M., Becherer, J.D., Bast, R.C., Jr., Boyer, C.M., Champion, B., Connolly, K.M., Conway, J.G., Furdon, P., Karp, S., Kidao, S., et al. 1994. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 370:558-561.
78. Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J.L., et al. 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370:555-557.
79. Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494.
80. Black, R.A., and White, J.M. 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 10:654-659.
81. Primakoff, P., and Myles, D.G. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16:83-87.
82. Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
83. Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736.
84. Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al. 1998. An

- essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
85. Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767.
 86. Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J., and Black, R.A. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275:14608-14614.
 87. Althoff, K., Mullberg, J., Aasland, D., Voltz, N., Kallen, K., Grotzinger, J., and Rose-John, S. 2001. Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem J* 353:663-672.
 88. Rio, C., Buxbaum, J.D., Peschon, J.J., and Corfas, G. 2000. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* 275:10379-10387.
 89. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5:207-216.
 90. Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., et al. 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J* 17:7260-7272.
 91. Merlos-Suarez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J., and Arribas, J. 2001. Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha- converting enzyme. *J Biol Chem* 276:48510-48517.
 92. Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. 1999. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283:91-94.
 93. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927.
 94. Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knauper, V., Docherty, A.J., and Murphy, G. 2000. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 473:275-279.
 95. Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., and Altevogt, D.P. 2003. ADAM10-mediated

- cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J* 17:292-294.
96. Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., et al. 2002. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8:35-40.
 97. Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., and Fujisawa-Sehara, A. 2001. Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem* 276:9352-9358.
 98. Kaushal, G.P., and Shah, S.V. 2000. The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *J Clin Invest* 105:1335-1337.
 99. Werb, Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91:439-442.
 100. Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., and Blobel, C.P. 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274:3531-3540.
 101. Haro, H., Crawford, H.C., Fingleton, B., Shinomiya, K., Spengler, D.M., and Matrisian, L.M. 2000. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 105:143-150.
 102. Matsuno, H., Yudoh, K., Watanabe, Y., Nakazawa, F., Aono, H., and Kimura, T. 2001. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheumatol* 28:22-28.
 103. Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M., and Matrisian, L.M. 1999. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9:1441-1447.
 104. Levi, E., Fridman, R., Miao, H.Q., Ma, Y.S., Yayon, A., and Vlodavsky, I. 1996. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci US A* 93:7069-7074.
 105. Suzuki, M., Raab, G., Moses, M.A., Fernandez, C.A., and Klagsbrun, M. 1997. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 272:31730-31737.
 106. Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., and Seiki, M. 1995. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT- MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 270:23013-23020.
 107. Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B., and Murphy, G. 1996. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves

- the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271:17119-17123.
108. Butler, G.S., Will, H., Atkinson, S.J., and Murphy, G. 1997. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem* 244:653-657.
 109. Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G., and Lopez-Otin, C. 1999. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 59:2570-2576.
 110. English, W.R., Puente, X.S., Freije, J.M., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., Lopez-Otin, C., and Murphy, G. 2000. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* 275:14046-14055.
 111. Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A.A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J., and Lopez-Otin, C. 2000. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* 60:877-882.
 112. Brew, K., Dinakarandian, D., and Nagase, H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283.
 113. d'Ortho, M.P., Will, H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpl, R., Zardi, L., and Murphy, G. 1997. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250:751-757.
 114. Schlondorff, J., Lum, L., and Blobel, C.P. 2001. Biochemical and pharmacological criteria define two shedding activities for TRANCE/OPGL that are distinct from the tumor necrosis factor alpha convertase. *J Biol Chem* 276:14665-14674.
 115. Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153:893-904.
 116. Borroto, A., Ruiz-Paz, S., Villanueva De La Torre, T., Borrell-Pages, M., Merlos-Suarez, A., Pandiella, A., Blobel, C.P., Baselga, J., and Arribas, J. 2003. Impaired trafficking and activation of TACE in cell mutants defective in protein ectodomain shedding. *J Biol Chem* 278:24242-24249.
 117. Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., and Fahrenholz, F. 2001. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *Faseb J* 15:1837-1839.
 118. Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S.J., Creemers, J., Seidah, N., and Checler, F. 2001. Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro- hormone

- convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem* 76:1532-1539.
119. Amour, A., Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., et al. 1998. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435:39-44.
 120. Whittaker, M., Floyd, C.D., Brown, P., and Gearing, A.J. 1999. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev* 99:2735-2776.
 121. Eccles, S.A., Box, G.M., Court, W.J., Bone, E.A., Thomas, W., and Brown, P.D. 1996. Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). *Cancer Res* 56:2815-2822.
 122. Wang, X., Fu, X., Brown, P.D., Crimmin, M.J., and Hoffman, R.M. 1994. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 54:4726-4728.
 123. Crowe, P.D., Walter, B.N., Mohler, K.M., Otten-Evans, C., Black, R.A., and Ware, C.F. 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J Exp Med* 181:1205-1210.
 124. Naglich, J.G., Jure-Kunkel, M., Gupta, E., Fargnoli, J., Henderson, A.J., Lewin, A.C., Talbott, R., Baxter, A., Bird, J., Savopoulos, R., et al. 2001. Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res* 61:8480-8485.
 125. Fan, H., and Derynck, R. 1999. Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *Embo J* 18:6962-6972.
 126. Pandiella, A., and Massague, J. 1991. Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem* 266:5769-5773.
 127. Mills, J., and Reiner, P.B. 1999. Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem* 72:443-460.
 128. Park, P.W., Pier, G.B., Hinkes, M.T., and Bernfield, M. 2001. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411:98-102.
 129. Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J.C., Arribas, J., and Baselga, J. 1999. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 59:1196-1201.
 130. Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechttersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K., and Altevogt, P. 2000. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* 275:15490-

- 15497.
131. Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E., and Klagsbrun, M. 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem* 274:28828-28835.
 132. Fitzgerald, M.L., Wang, Z., Park, P.W., Murphy, G., and Bernfield, M. 2000. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 148:811-824.
 133. Nath, D., Williamson, N.J., Jarvis, R., and Murphy, G. 2001. Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 114:1213-1220.
 134. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888.
 135. Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T.K., Rose-John, S., and Massague, J. 1996. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 271:11376-11382.
 136. Reiland, J., Ott, V.L., Lebakken, C.S., Yeaman, C., McCarthy, J., and Rapraeger, A.C. 1996. Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1. *Biochem J* 319:39-47.
 137. Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M., and Ramachandran, C. 1997. Mechanism of Inhibition Of Protein-Tyrosine Phosphatases by Vanadate and Pervanadate. *Journal of Biological Chemistry* 272:843-851.
 138. Persson, C., Sjoblom, T., Groen, A., Kapper, K., Engstrom, U., Hellman, U., Heldin, C.H., den Hertog, J., and Ostman, A. 2004. Preferential oxidation of the second phosphatase domain of receptor-like PTP alpha revealed by an antibody against oxidizing protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1886-1891.
 139. Slack, B.E., Breu, J., Petryniak, M.A., Srivastava, K., and Wurtman, R.J. 1995. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of amyloid precursor protein secretion by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 270:8337-8344.
 140. Kiessling, L.L., and Gordon, E.J. 1998. Transforming the cell surface through proteolysis. *Chem Biol* 5:R49-62.
 141. Arribas, J., and Massague, J. 1995. Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism. *J Cell Biol* 128:433-441.
 142. Merlos-Suarez, A., Fernandez-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., and Arribas, J. 1998. Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled

- by a component that does not affect notch processing. *J Biol Chem* 273:24955-24962.
143. Jones, S.A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., and Fuller, G.M. 2001. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Faseb J* 15:43-58.
 144. Dong, J., Opresko, L.K., Dempsey, P.J., Lauffenburger, D.A., Coffey, R.J., and Wiley, H.S. 1999. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6235-6240.
 145. Borrell-Pages, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., and Arribas, J. 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *Embo J* 22:1114-1124.
 146. Walcheck, B., Kahn, J., Fisher, J.M., Wang, B.B., Fisk, R.S., Payan, D.G., Feehan, C., Betageri, R., Darlak, K., Spatola, A.F., et al. 1996. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 380:720-723.
 147. Werb, Z., and Yan, Y. 1998. A cellular striptease act. *Science* 282:1279-1280.
 148. Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V., et al. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155:661-673.
 149. Shimizu, Y., Minemura, M., Tsukishiro, T., Kashii, Y., Miyamoto, M., Nishimori, H., Higuchi, K., and Watanabe, A. 1995. Serum concentration of intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma is a marker of the disease progression and prognosis. *Hepatology* 22:525-531.
 150. Park, P.W., Reizes, O., and Bernfield, M. 2000. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem* 275:29923-29926.
 151. Steiner, H., and Haass, C. 2000. Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:217-224.
 152. Vassar, R., and Citron, M. 2000. Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* 27:419-422.
 153. Arribas, J., Lopez-Casillas, F., and Massague, J. 1997. Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor- alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem* 272:17160-17165.
 154. Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product. *Mol Cell Biol* 5:3610-3616.
 155. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 156. Urena, J.M., Merlos-Suarez, A., Baselga, J., and Arribas, J. 1999. The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid determines the subcellular

- localization of proTGF-(alpha) and membrane type matrix metalloprotease (MT1-MMP). *J Cell Sci* 112:773-784.
157. Kingston, R.E., Chen, C.A., and Okayama, H. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, New York.
 158. Seed, B., and Aruffo, A. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3365-3369.
 159. Vecchi, M., Baulida, J., and Carpenter, G. 1996. Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem* 271:18989-18995.
 160. Cheifetz, S., Like, B., and Massague, J. 1986. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 261:9972-9978.
 161. Amour, A., Knight, C.G., English, W.R., Webster, A., Slocombe, P.M., Knauper, V., Docherty, A.J., Becherer, J.D., Blobel, C.P., and Murphy, G. 2002. The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett* 524:154-158.
 162. English, W.R., Velasco, G., Stracke, J.O., Knauper, V., and Murphy, G. 2001. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett* 491:137-142.
 163. Blobel, C.P. 2000. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 12:606-612.
 164. Belkin, A.M., Akimov, S.S., Zaritskaya, L.S., Ratnikov, B.I., Deryugina, E.I., and Strongin, A.Y. 2001. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* 276:18415-18422.
 165. Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I., and Weiss, S.J. 2000. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 149:1309-1323.
 166. Hotary, K.B., Allen, E.D., Brooks, P.C., Datta, N.S., Long, M.W., and Weiss, S.J. 2003. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *cell* 114:33-45.
 167. Lunn, C.A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P.J., Narula, S.K., and Lundell, D. 1997. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett* 400:333-335.
 168. Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2:371-375.
 169. Lemjabbar, H., and Basbaum, C. 2002. Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat Med* 8:41-46.
 170. Koizumi, A., Hashimoto, S., Kobayashi, T., Imai, K., Yachi, A., and Horie, T.

1995. Elevation of serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) levels in bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 101:468-473.
171. Hartung, H.P., Michels, M., Reiners, K., Seeldrayers, P., Archelos, J.J., and Toyka, K.V. 1993. Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology* 43:2331-2335.
172. Littler, A.J., Buckley, C.D., Wordsworth, P., Collins, I., Martinson, J., and Simmons, D.L. 1997. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 36:164-169.
173. Lai, C.K., Wong, K.C., Chan, C.H., Ho, S.S., Chung, S.Y., Haskard, D.O., and Lai, K.N. 1993. Circulating adhesion molecules in tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 94:522-526.
174. Sipsas, N., Sfrikakis, P.P., Sfrikakis, P., Choremi, H., and Kordossis, T. 1994. Serum concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 and progress towards disease in patients infected with HIV. *J Infect* 29:271-282.
175. Banks, R.E., Gearing, A.J., Hemingway, I.K., Norfolk, D.R., Perren, T.J., and Selby, P.J. 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 68:122-124.

**The Shedding of Betaglycan is Regulated by Pervanadate and Mediated
by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1**

Gabriela Velasco-Loyden, Joaquín Arribas and Fernando López Casillas

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

The Shedding of Betaglycan Is Regulated by Pervanadate and Mediated by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1*

Received for publication, June 19, 2003, and in revised form, November 17, 2003
Published, JBC Papers in Press, December 12, 2003, DOI 10.1074/jbc.M306499200

Gabriela Velasco-Loyden†§, Joaquín Arribas¶||, and Fernando López-Casillas†**

From the †Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, Apartado Postal 70-246, Mexico City, Distrito Federal 04510, México, and the ¶Laboratori de Recerca Oncològica, Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain

Betaglycan is a membrane-anchored proteoglycan that binds transforming growth factor- β (TGF- β) via its core protein. A soluble form of betaglycan can be released by proteolytic cleavage (also known as shedding) of the membrane-bound form, yielding soluble betaglycan. The mechanism leading to the generation of soluble betaglycan is poorly understood. Because the membrane and soluble forms of betaglycan have opposite effects regulating the availability of TGF- β , it is important to characterize the shedding of betaglycan further. Here we present evidence showing that in certain cell types, pervanadate, a general tyrosine phosphatase inhibitor, induces the release of the previously described fragment that encompasses almost the entire extracellular domain of betaglycan (sBG-120). In addition, treatment with pervanadate unveils the existence of a novel 90-kDa fragment (sBG-90). Noticeably, the cleavage that generates sBG-90 is mediated by a tissue inhibitor of metalloprotease-2-sensitive protease. Overexpression of all membrane type matrix metalloproteases (MT-MMPs) described to date indicates that MT1-MMP and MT3-MMP are endowed with ability to generate sBG-90. Furthermore, the patterns of expression of different MT-MMPs in the cell lines used in this study suggest that MT1-MMP is the protease involved in the shedding of sBG-90. Overexpression of MT1-MMP in COS-1 cells, which do not express detectable levels of this metalloprotease, confirms the feasibility of this hypothesis. Unexpectedly, during the course of these experiments, we observed that MT2-MMP decreases the levels of MT1-MMP and betaglycan. Finally, binding competition experiments indicate that, similar to the wild type membrane betaglycan, sBG-90 binds the TGF- β 2 isoform with greater affinity than TGF- β 1, suggesting that once released, it could affect the cellular availability of TGF- β .

Transforming growth factor- β (TGF- β)¹ is the prototype of a superfamily of growth factors involved in the control of cell proliferation, differentiation, development, and extracellular matrix production (1, 2). TGF- β controls many physiological processes, and disturbances in its regulation or signaling can lead to disease (3, 4). TGF- β signals into the cell through two cell surface serine/threonine kinase receptors, the TGF- β type I and type II receptors. Signaling is initiated when TGF- β promotes the association of type I and type II receptors. Receptor I is then phosphorylated and activated by the constitutively active kinase of receptor II. The activated receptor I kinase then phosphorylates certain members of the Smads, a novel family of transcriptional regulatory proteins which transduce the TGF- β signal to the nucleus (5, 6).

TGF- β has two coreceptors, betaglycan and endoglin, which regulate TGF- β access to its signaling receptors. Betaglycan and endoglin are transmembrane glycoproteins with large extracellular regions that bind TGF- β and very similar cytoplasmic regions without any identifiable signaling motif (7–9). Betaglycan, also known as type III receptor, is a membrane proteoglycan whose glycosaminoglycan chains consist of heparan and chondroitin sulfate. In general, membrane betaglycan is considered a positive regulator of TGF- β because it increases the affinity of the binding of TGF- β to receptor II, enhancing cell responsiveness to TGF- β (10, 11). This effect is particularly significant for TGF- β 2, the isoform for which betaglycan has higher affinity, and appears to be mediated by a "presentation complex" formed by betaglycan, TGF- β and the type II receptor (10). Betaglycan also regulates the actions of activins, inhibins, and BMPs, other members of the TGF- β superfamily. Specifically, upon binding of inhibin A, betaglycan can associate with the type II receptors for activin or BMP. Because of their presence in such nonsignaling complexes, the availability of these type II receptors is reduced, becoming limited to associating with their corresponding type I receptors and thereby preventing activin or BMP actions (12, 13). Thus, betaglycan can establish diverse ligand-dependent interactions with type II receptors for at least three members of the TGF- β superfamily. On the one hand, the complex formed with TGF- β and its type II receptor enhances TGF- β actions. Importantly, this

* This work was supported in part by an International Research Scholar grant from the Howard Hughes Medical Institute (to F. L.-C.), and by Grants 37749N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (to F. L.-C.), P1021003 from the Fondo de Investigación Sanitaria (to J. A.), and SAF2000-0203 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (to J. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of Predoctoral Fellowship 93694 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, support from the Dirección General de Estudios de Posgrado, and a traveling fellowship from the *Journal of Cell Science* in 2002.

|| European Molecular Biology Organization young investigator.

** To whom correspondence should be addressed. E-mail: fcasilla@ifc.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: TGF- β , transforming growth factor- β ; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; BB-94, batimastat; CHO, Chinese hamster ovary; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; gag, glycosaminoglycan; HA, hemagglutinin; MT-MMP, membrane type matrix metalloprotease; PBS, phosphate-buffered saline; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; sBG, soluble betaglycan; TACE, tumor necrosis factor- α -converting enzyme; TAPI-2, N-(DL-(2-9(hydroxyaminocarbonyl)methyl)-4-methylpentanoyl)-L-3-terbutyl-L-alanine, 2-aminoethylamide; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteases; TNF, tumor necrosis factor- α ; TRANCE, TNF-related activation-induced cytokine; BMP, bone morphogenetic protein.

latter function explains key features of the betaglycan-null mice phenotype (14). On the other hand, those formed with inhibin A and the corresponding type II receptors antagonize the effects of activin or BMP. As a matter of fact, up to date, betaglycan stands as the only identified inhibin A receptor capable of mediating its characteristic activin antagonism (15, 16). Although the glycosaminoglycan chains are not required for all of these functions (10, 17), they may modulate them. It has been reported that in some cell lines the nature of the glycosaminoglycan attached to membrane betaglycan core protein may sterically prevent its association with the TGF- β type II receptor, turning it into an inhibitor of TGF- β (18). Betaglycan is also required for the epithelial-mesenchymal transition of cardiac endothelial cells which leads to heart valve formation. For this reason, in addition of being a TGF- β coreceptor, a more direct function of betaglycan in TGF- β signaling has been proposed (19).

A natural soluble form of betaglycan can be found in serum, extracellular matrices, and the conditioned medium of several cell lines (20). In contrast to membrane betaglycan, soluble betaglycan inhibits TGF- β binding to cell surface receptors *in vitro* (21, 22). Thus, betaglycan could be a dual modulator of TGF- β activities: as a membrane protein it is an enhancer of TGF- β actions, and as a soluble protein it is an inhibitor (21, 22). This latter property has been exploited therapeutically to block TGF- β actions in a carcinogenesis animal model using a recombinant soluble betaglycan (23). Several studies have proposed that the natural soluble form of betaglycan is generated by a proteolytic cleavage of the membrane-bound form (10, 20, 21). However, despite its functional importance, the proteolytic cleavage of betaglycan has been poorly characterized.

The proteolytic cleavage of the extracellular domain is not particular for betaglycan; many transmembrane proteins undergo a similar process, frequently referred to as "ectodomain shedding." The shedding of a large number of membrane proteins is a regulated process that can be enhanced by PMA, a phorbol ester activator of protein kinase C and other signal transduction pathways, and is mediated by zinc metalloproteases (for reviews, see Refs. 24–26). The disintegrin and metalloprotease ADAM 17, also known as TACE (Tumor necrosis factor α -Converting Enzyme), has been implicated in the vast majority of protein kinase C-activated shedding events analyzed to date (27–29). In a previous report we showed that, in contrast to the majority of proteins, the shedding of betaglycan is not stimulated by PMA and remains unaffected in a mutant cell line defective in the shedding of a wide variety of proteins (30). In this study, we analyzed the shedding of betaglycan in different cell lines, and unexpectedly, we found a novel form of the soluble receptor. The shedding of betaglycan can be stimulated by pervanadate and is mediated by a metalloprotease that is inhibited by TIMP-2 but not by TIMP-1. Transfection experiments indicate that MT1-MMP and/or MT3-MMP, or a similar metalloprotease, is responsible for the shedding of betaglycan.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Sodium orthovanadate, hydrogen peroxide, PMA, bovine serum albumin, molecular biochemicals, buffers, salts, detergents, and protease inhibitors were from Sigma. Restriction endonucleases were purchased from Roche Applied Science. Recombinant human TIMP-1 and recombinant human TIMP-2 were purchased from Fuji Chemical Industries Ltd. (Takaoka, Japan). TAPI-2 was kindly provided by Immunex (Seattle, WA) and BB-94 by British Biotech Pharmaceuticals, Ltd. (Oxford, UK). Pervanadate was freshly prepared prior to each experiment by mixing 1 M sodium vanadate and 1 M hydrogen peroxide. The polyclonal antibodies against the extracellular domain 822 and the cytoplasmic domain 821 of betaglycan have been described previously (10). Anti-human MT1-MMP monoclonal antibody LEM-2/63 was a generous gift from Dr. Alicia Arroyo (Madrid, Spain). Anti-mouse MT2-

MMP (clone 16-222G5) and anti-human MT3-MMP (clone 117-10C6) monoclonal antibodies were from Fuji Chemical Industries Ltd. The anti-c-Myc monoclonal antibodies (9E10) have been described elsewhere (31). Anti-HA monoclonal antibodies (12CA5) were from Babco (Richmond, CA). Protein A- and protein G-Sepharose were from Amersham Biosciences. TGF- β 2 was a generous gift of Dr. Nico Cerletti from Ciba-Geigy AG (Basel, Switzerland). TGF- β 1 was from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Cell Culture—All cells used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). L6E9 cells stably expressing Myc gag^- were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 20% fetal bovine serum (Invitrogen) in the presence of 400 μ g/ml Geneticin (Invitrogen). Wild type CHO cells and M1 mutant cells stably expressing HABG were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum in presence of 400 μ g/ml Geneticin. CHO and COS-1 cells were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum.

cDNAs and Transfections—The Myc gag^- betaglycan mutant, described previously (21), was subcloned in the pcDNA3 and stably transfected in L6E9 cells as described before (17). This gag^- betaglycan construct is a double point betaglycan mutant of the serines that are the glycosaminoglycan chains acceptor amino acids (S535A/S546A) and expresses betaglycan only as core protein, greatly simplifying the analysis of the betaglycan shedding products. Wild type CHO cells and M1 mutant CHO cells defective in pro-HATGF- α shedding have been described elsewhere (32). Wild type CHO cells and M1 mutant cells were stably transfected with HABG construction subcloned in the pCEP4 vector using the calcium phosphate precipitate method (33). The HAG gag^- and HAG gag^- FLAG were constructed from the wild type rat betaglycan cDNA tagged at the amino terminus with the HA epitope. Both constructions were created replacing in the wild type betaglycan cDNA a fragment of a previously described gag^- mutant in the XhoI and BglII sites (21). The FLAG epitope was inserted at the carboxyl terminus for the HAG gag^- FLAG and for the HABGFLAG constructions by PCR. All DNA manipulations were verified by nucleotide sequencing using standard techniques (34). For transient expression in COS-1 and CHO cells the HAG gag^- and the HAG gag^- FLAG constructions were subcloned in the pCMV5 vector (35). The cDNA encoding hamster MT1-MMP tagged at the amino terminus with the Myc epitope has been described before (36). The human MT2-MMP, human MT3-MMP, and HA-tagged mouse MT4-MMP, human MT5-MMP, and human MT6-MMP cDNAs were kindly provided by Dr. López-Otin (37–39). Transient L6E9 and CHO transfection was done with LipofectAMINE (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Transient COS-1 transfection was done with the diethylaminoethyl-dextran method (40). Cells were assayed at 48 h post-transfection.

Northern Blot Analysis—Total RNA was isolated from cell cultures using TriZol (Invitrogen), and 10 μ g from each cell line was electrophoresed in 0.9% agarose/formaldehyde gels and transferred to nylon membranes Hybond-N (Amersham Biosciences). The cDNA probes used were hamster MT1-MMP, corresponding to a 2,669-bp XbaI/HindIII fragment of the plasmid pCD MycMT1 (36); human MT2-MMP, comprising a 1,996-bp EcoRI/PstI fragment from the plasmid pSG MT2-MMP; and human MT3-MMP, of a 1,330-bp EcoRI fragment from the plasmid pSG MT3-MMP. The cDNA probe for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was from rat. Labeling of cDNA probes was done using the Random Primer Labeling Kit (Roche Applied Science) and [α - 32 P]dCTP (Amersham Biosciences) according to the manufacturers' instructions. Hybridization was performed overnight at 65 °C in 0.5 M phosphate (pH 7.2), 7% SDS, 10 mM EDTA. Bands were visualized using a PhosphorImager (Amersham Biosciences).

Immunoprecipitation—Approximately 7×10^5 L6E9 cells stably expressing Myc gag^- were incubated for different periods of time in the absence or presence of 100 μ M pervanadate in medium supplemented with 0.2% fetal bovine serum. Cells were lysed in lysis buffer (PBS containing 1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, and protease inhibitors). Medium or cell lysates were immunoprecipitated with anti-betaglycan ectodomain antibody 822. Immune complexes were collected with protein A-Sepharose.

Western Blotting—For Western blotting, immune complexes or aliquots from medium or cell lysates were electrophoresed in polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were probed using 1/2000 of the anti-betaglycan ectodomain 822, anti-c-Myc, or anti-HA. Anti-MT1-MMP LEM 2/63 was used directly. Anti-MT2-MMP was used at 1/200 for transfected MT2-MMP and at 10 μ g/ml for endogenous MT2-MMP. Anti-MT3-MMP was used at 10 μ g/ml. Immunoblots were revealed using ECL (Amersham Biosciences) and autoradiography. Only where indicated was the ECL Plus kit (Amersham Biosciences) used.

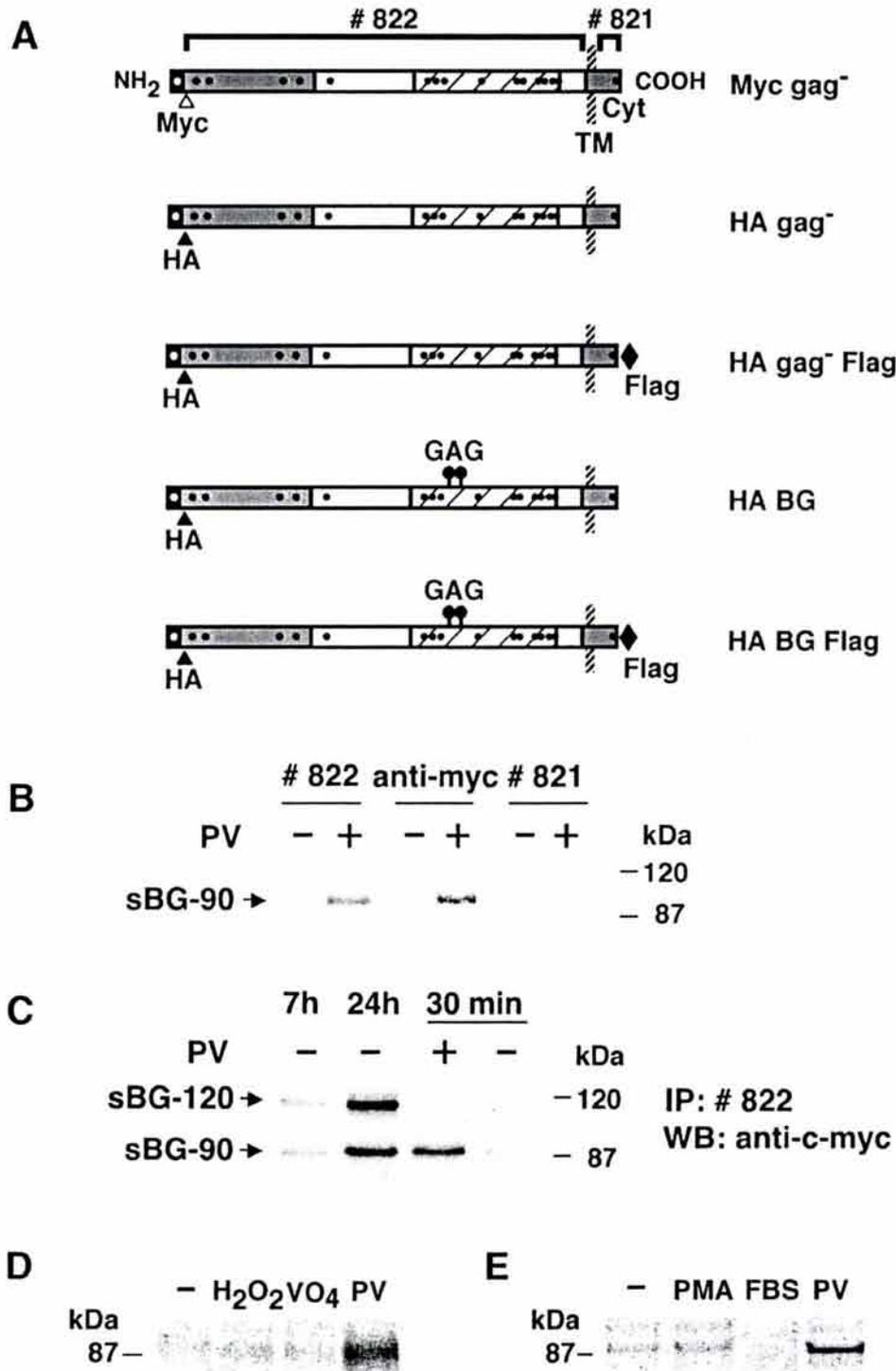


FIG. 1. Betaglycan ectodomain shedding is stimulated by pervanadate. *A*, schematic representation of the constructions employed in this study. Signal peptide (black box), position of cysteines (dots), c-Myc (Δ), HA (\blacktriangle), FLAG (\blacklozenge) epitope tags, the transmembrane domain (TM), the cytoplasmic domain (Cyt), and regions of sequence similarity to endoglin and uromodulin (shaded boxes) are indicated. Regions recognized by different antibodies are also indicated. Antibody 822 is an anti-betaglycan ectodomain antiserum, and antibody 821 is an anti-betaglycan cytoplasmic antiserum. *B*, L6E9/Mycgag⁻ cells were metabolically labeled for 2 h with [³⁵S]methionine, the label was chased in complete medium for 2 h, and the cells were incubated for the last 30 min in the absence or presence of 100 μ M pervanadate (PV). Medium was immunoprecipitated with anti-betaglycan ectodomain antibody 822, anti-betaglycan cytoplasmic region antibody 821, or anti-c-Myc 9E10 monoclonal antibody. Immune complexes were collected with protein A- or G-Sepharose and were separated by SDS-PAGE and visualized by PhosphorImager scanning of the gels. *C*, L6E9/Mycgag⁻ cells were incubated for different periods of time in the absence or presence of 100 μ M pervanadate. Medium was immunoprecipitated (IP) with antibody 822, and the immunoprecipitate was separated in SDS-PAGE and subjected to Western blot (WB) analysis with anti-c-Myc monoclonal antibody. *D* and *E*, L6E9/Mycgag⁻ cells were metabolically labeled as in *B*, but the last 30 min cells were incubated in the absence or presence of 100 μ M H₂O₂, 100 μ M VO₄, or 100 μ M pervanadate (*D*) or in the absence or presence of 1 μ M PMA, 20% fetal bovine serum (FBS), or 100 μ M pervanadate (*E*). Medium was immunoprecipitated with anti-betaglycan ectodomain antibody 822 and protein A-Sepharose. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by PhosphorImager scanning of the gels. The locations of sBG-90 and sBG-120 are indicated.

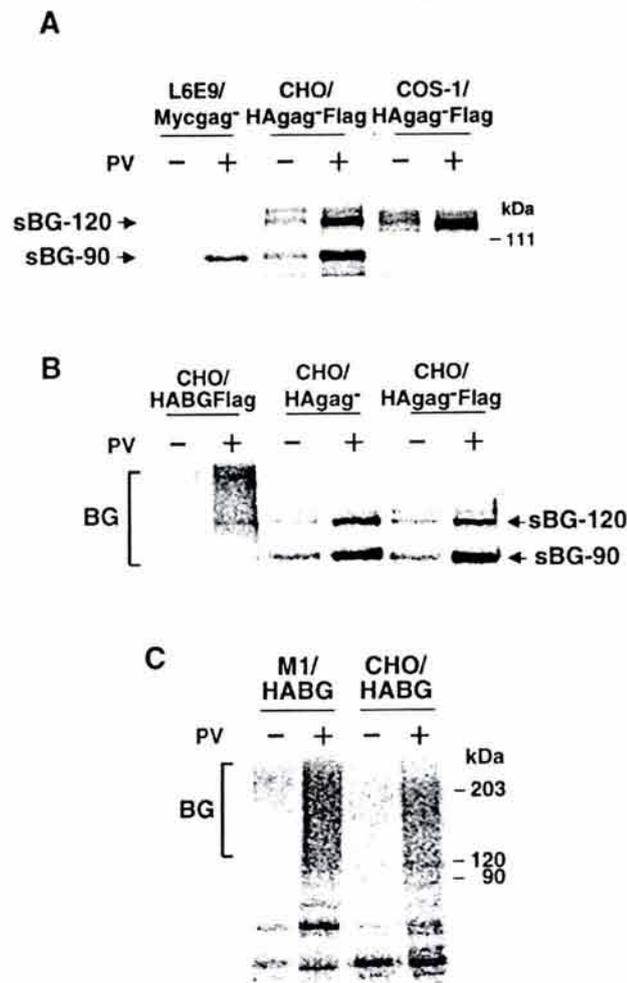


FIG. 2. Different cell lines produce different betaglycan fragments. The following cells were metabolically labeled, chased for 2 h in complete medium, and incubated for the last 30 min in the absence or presence of 100 μ M pervanadate (PV). **A**, L6E9/Mycgag⁻ cells and CHO or COS-1 cells transiently transfected with the HAagag⁻FLAG construction. **B**, CHO cells transiently transfected with HABGFLAG, HAagag⁻, or HAagag⁻FLAG. Labeled betaglycan in the medium was immunoprecipitated with an antibody against the ectodomain of betaglycan (822) and protein A-Sepharose. **C**, M1 mutant and wild type CHO cells stably transfected with HABG. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by PhosphorImager. The locations of sBG-90, sBG-120, and the proteoglycan form of soluble betaglycan (BG) are indicated.

Metabolic Labeling and Immunoprecipitation—Approximately 7×10^5 cells were labeled for 2 h with 250 μ Ci/ml 35 S-Pro Mix (Amersham Biosciences) in DMEM without L-methionine and L-cysteine (Sigma). The label was chased for 2 h in DMEM containing with 10% fetal bovine serum (complete medium). Then the cells were incubated in the presence of different compounds, as indicated, for 30 min in DMEM containing 0.2% fetal bovine serum. The medium was collected and centrifuged at 14,000 rpm for 2 min to remove debris. The cells were washed twice with cold PBS and lysed in PBS containing 1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Cell lysates and medium were immunoprecipitated with different antibodies. Immune complexes were collected with protein A-Sepharose (for antibodies 822 and 821) or protein G-Sepharose (for anti-c-Myc and anti-HA antibodies), washed three times with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% SDS, separated in SDS-PAGE, and bands visualized using a PhosphorImager. Densitometric analysis was carried out using ImageQuant software.

Affinity Labeling and Competition Experiments—TGF- β 2 was radio-labeled with 125 I using chloramine T (41). Baculoviral recombinant

TABLE I
Effects of protease inhibitors on the pervanadate-stimulated shedding of betaglycan in L6E9/Mycgag cells

The results are expressed as percentages of inhibition of betaglycan shed by cells in the absence of the inhibitor.

Inhibitor	Specificity	Concentration	Percentage of inhibition
BB-94	Metalloproteases	5 μ M	92
Aprotinin	Serine proteases	2 μ g/ml	0
Leupeptin	Serine and cysteine proteases	2 μ g/ml	12
Pepstatin A	Aspartic proteases	1 μ g/ml	15
Antipain	Serine and cysteine proteases	2 μ g/ml	6

soluble betaglycan was purified as described before (22). Amounts of soluble betaglycan sBG-90 were determined by Western blot. Briefly, medium from pervanadate-treated L6E9 cells stably expressing Myc-gag⁻ was concentrated in an Amicon Ultrafiltration chamber (Millipore) and dialyzed against PBS. Aliquots from medium were separated in SDS-PAGE, subjected to Western blotting, and sBG-90 was quantified comparing with different amounts of recombinant soluble betaglycan as standards (data not shown). For competition experiments, recombinant soluble betaglycan and medium with sBG-90 (10 ng/assay) were affinity labeled with 100 pM 125 I-TGF- β 2 in the presence of different concentration of unlabeled TGF- β 1 or TGF- β 2 for 3 h in PBS supplemented with 0.05% Triton X-100. Cross-linking was done by the addition of 0.1 mg/ml disuccinimidyl suberate (Pierce). Labeling reactions were quenched after 15 min with Tris/HCl, pH 7.5, at a final concentration of 10 mM. The reaction mixture was immunoprecipitated with anti-c-Myc monoclonal antibody and protein G-Sepharose. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by a PhosphorImager.

RESULTS

Pervanadate Activates the Shedding of Betaglycan—Ectodomain shedding is frequently a regulated process. However, the shedding of betaglycan is insensitive to phorbol esters, calcium ionophores, or serum factors, three agents that activate the shedding of most proteins analyzed to date (30, 32, 42). Recently, we have shown that the shedding of the tyrosine kinase receptor HER-2, which is also insensitive to these treatments, can be activated by pervanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor (43). Therefore, we analyzed the effect of pervanadate on the shedding of the betaglycan. Because of the presence of glycosaminoglycan chains, wild type betaglycan migrates in SDS-PAGE as a broad band of 180–250 kDa, making it difficult to analyze the soluble products of the shedding reaction. Thus, to facilitate this assay, we stably transfected L6E9 myoblasts with a c-Myc-tagged rat membrane betaglycan devoid of glycosaminoglycan chains (L6E9/Mycgag⁻ cells) (Fig. 1A). A short treatment of L6E9/Mycgag⁻ cells with pervanadate induces the liberation of a 90-kDa fragment, which is immunoprecipitated by the polyclonal antibody 822 (directed against the betaglycan extracellular region) and by the monoclonal antibody directed against the c-Myc epitope engineered at the amino terminus (Fig. 1B). As expected, this soluble 90-kDa product (hereafter referred to as sBG-90) is not immunoprecipitated by the polyclonal antibody 821 directed against the cytoplasmic tail of betaglycan (Fig. 1B). The size of sBG-90 differs from the one reported previously (110–120 kDa) for the soluble betaglycan species produced spontaneously by 3T3-L1 cells (20).

To determine whether L6E9/Mycgag⁻ cells also secrete the 110–120-kDa form, we analyzed the basal shedding of betaglycan in these cells. Fig. 1C shows that in the absence of any treatment, a 120-kDa betaglycan fragment (hereafter referred to as sBG-120) is slowly shed to the medium, being barely visible at 7 h but clearly detectable by 24 h. This slow process very much resembles the “constitutive” shedding that has been invoked to explain the existence of the naturally occurring forms of soluble betaglycan (30). Interestingly, Fig. 1C shows

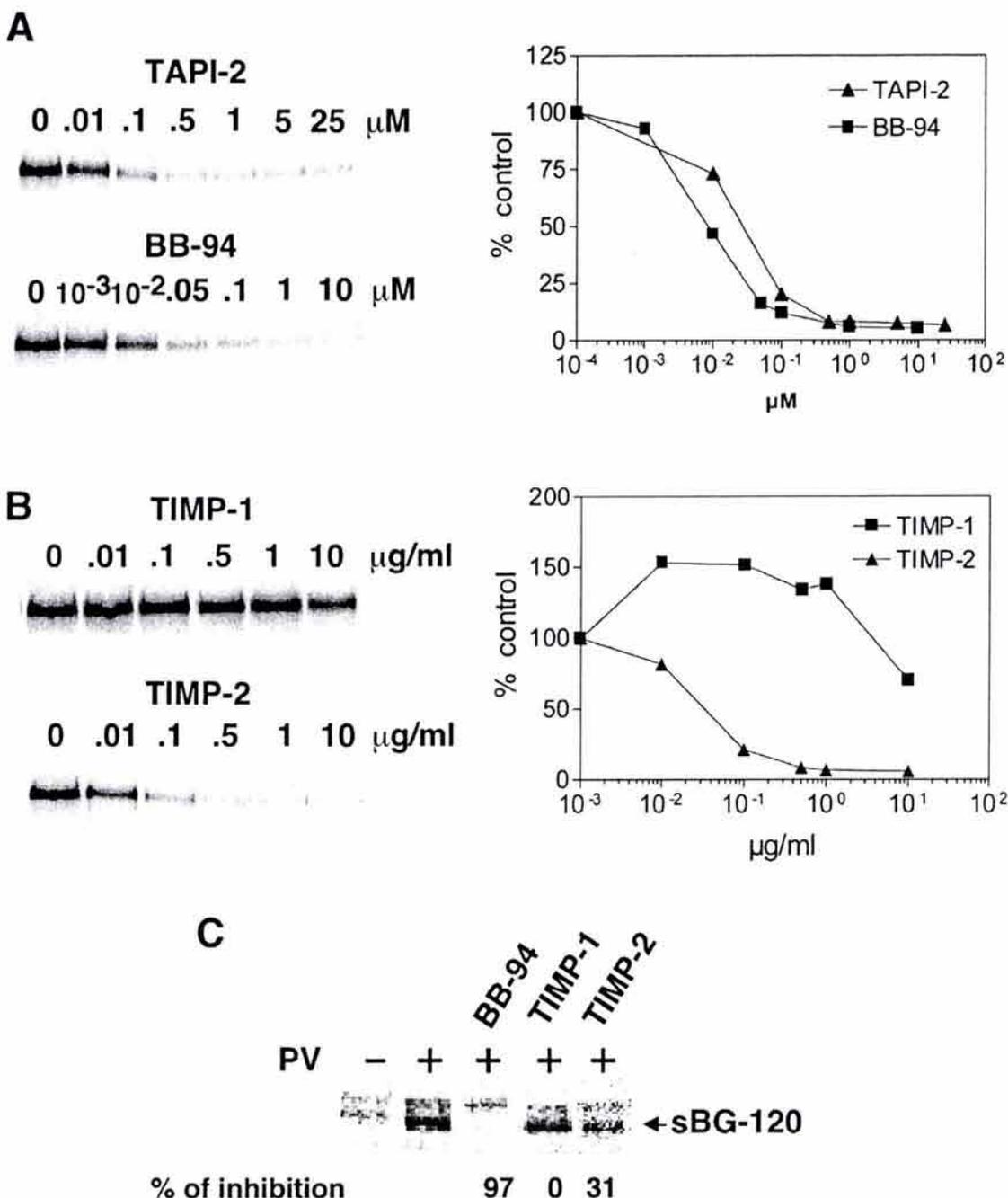


FIG. 3. Effect of metalloprotease inhibitors on the shedding of sBG-90 and sBG-120. L6E9/Mycgag⁻ cells or COS-1 cells transiently transfected with the HA₉₀ construct were metabolically labeled for 2 h with [³⁵S]methionine and chased in complete medium for 2 h. The L6E9/Mycgag⁻ cells (A and B) were incubated for 30 min with 100 μM pervanadate in the presence of the indicated concentrations of hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitor BB-94 or TAPI-2 or the naturally occurring inhibitor TIMP-1 or TIMP-2. Transfected COS-1 cells (C) were incubated with or without 100 μM pervanadate in the presence of 5 μM BB-94 or 5 $\mu\text{g/ml}$ TIMP-1 or TIMP-2 as indicated. Medium was immunoprecipitated with anti-betaglycan ectodomain antibody 822 (A and B) or with anti-HA (C) and protein A-Sepharose, separated in SDS-PAGE, and visualized by PhosphorImager scanning of the gels. Soluble betaglycan was quantified using the ImageQuant software and is represented as a percentage of betaglycan shed by cells in absence of inhibitor.

that sBG-90 is also generated by this constitutive mechanism. Thus, these data suggest that, at least two cleavages at different sites of its ectodomain may generate two different soluble forms of the receptor, sBG-120 and the shorter sBG-90 form.

The effect of pervanadate on the shedding of sBG-90 is specific because vanadate or H_2O_2 was without effect (Fig. 1D). Thus, these data indicate that the production of sBG-90 may be regulated by phosphorylation/dephosphorylation. On the other

hand, as reported previously for the 110–120-kDa fragment (30), the release of sBG-90 is not regulated by PMA or fetal bovine serum (Fig. 1E).

Different Cell Lines Produce Different Soluble Betaglycan Fragments—To determine whether the generation of sBG-90 is a particular property of L6E9 myoblasts, we analyzed the shedding of betaglycan in different cell lines. Therefore, we transiently transfected the HA₉₀-FLAG construct (Fig. 1A) in

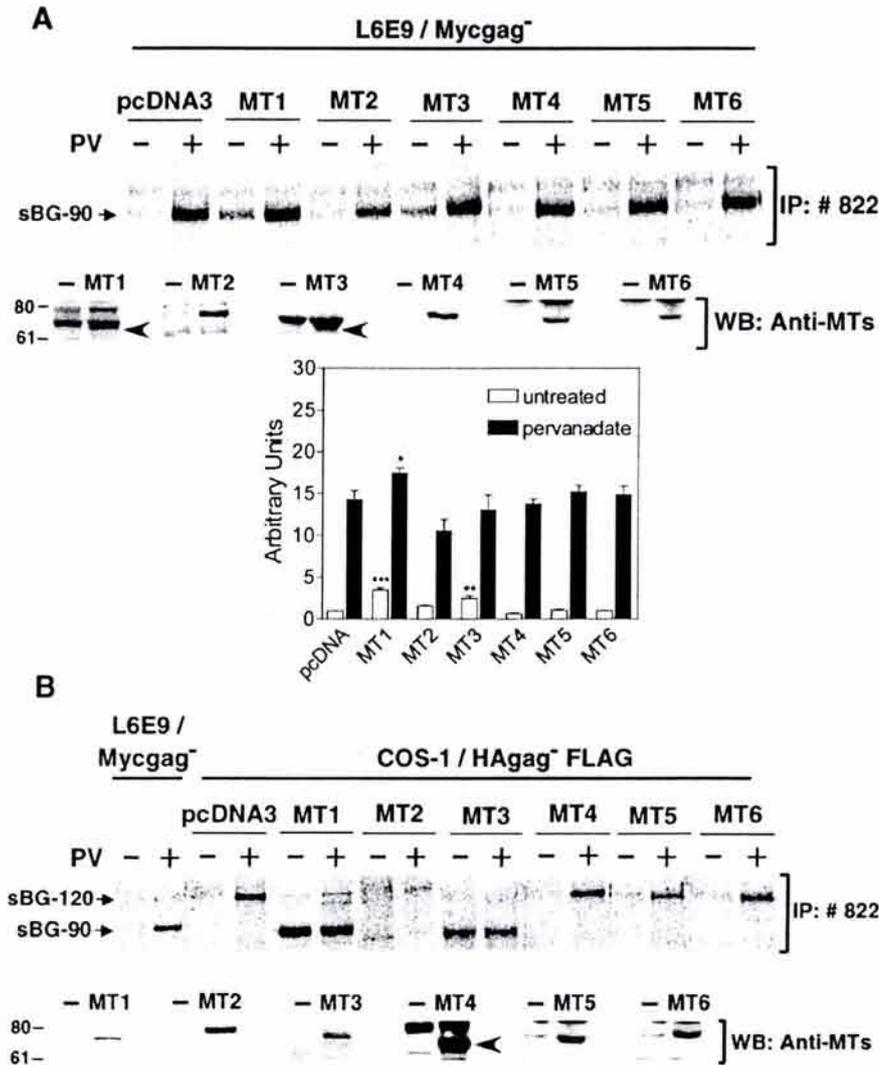


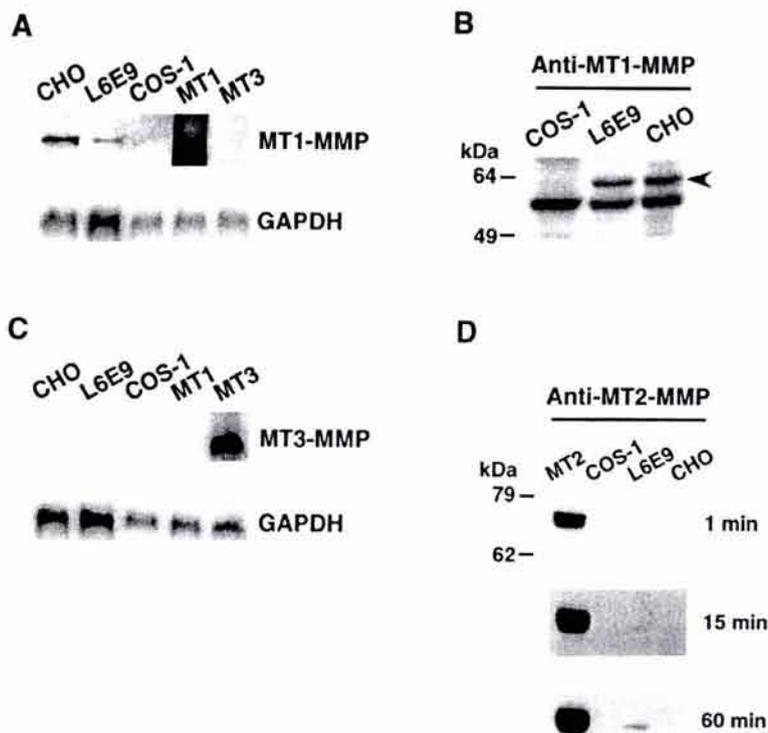
FIG. 4. Effect of the overexpression of different MT-MMPs on the shedding of betaglycan ectodomain. *A*, L6E9/Mycgag⁻ cells were transiently transfected with the empty expression vector (pcDNA3) or the indicated MT-MMP vector. Transfected cells were metabolically labeled for 2 h with [³⁵S]methionine, chased in complete medium for 2 h, and then incubated for 30 min in the absence or presence of 100 μM pervanadate. Medium was immunoprecipitated (IP) with anti-betaglycan ectodomain antibody 822 and protein A-Sepharose. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by PhosphorImager scanning of the gels. Soluble betaglycan was quantified using the ImageQuant software and is represented as a percentage of betaglycan shed by cells transfected with the empty expression vector (pcDNA3) in absence of pervanadate and is the average ± S.E. of quadruplicate determinations. Significance with the two-tailed Student's *t* test $\alpha = 0.05$; ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.0069$; *, $p < 0.041$ versus control cells. WB, Western blot. *B*, COS-1 cells were transiently cotransfected with the HA₉gag⁻ FLAG construction and with each of the MT-MMP vectors or with the control vector (pcDNA3). Two days post-transfection COS-1 cells and L6E9/Mycgag⁻ cells were treated as in *A*. Medium was immunoprecipitated with anti-betaglycan ectodomain antibody 822 and protein A-Sepharose. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and visualized by PhosphorImager. The locations of sBG-90 and sBG-120 are indicated. Western blot analysis was done to verify expression of the transfected MT-MMPs. Cell lysates from control-transfected cells (-) and the indicated MT-MMP-transfected cells were probed, as indicated, with their corresponding antibody: MT1, anti-c-Myc; MT2, anti-MT2-MMP 162-22G5 monoclonal antibody; MT3, anti-MT3-MMP 117-10C6 monoclonal antibody; MT4, MT5, and MT6, anti-HA monoclonal antibody. The black arrowhead indicates specific bands.

CHO and COS-1 cells and compared the products of the betaglycan shedding reaction by these cells with those generated by L6E9/Mycgag⁻ cells after pervanadate treatment. As shown in Fig. 2A, pervanadate also increased betaglycan ectodomain shedding in CHO and COS-1 cells. However, CHO cells released, in a pervanadate-activated manner, the two forms of soluble betaglycan ectodomain, sBG-90 and sBG-120 (Fig. 2A). In contrast, COS-1 cells stimulated with pervanadate only released the sBG-120 product (Fig. 2A). Thus, the generation of sBG-90 and sBG-120 is cell type-dependent, but the shedding of both fragments can be stimulated by pervanadate. Fig. 2A also shows that minor forms of soluble betaglycan are produced by CHO (~sBG-130) and COS-1 cells (~sBG-130 and ~sBG-

100). However, because their production is not stimulated by pervanadate, we did not characterize them any further.

Some authors have suggested that the cytoplasmic tail is involved in the maturation of membrane betaglycan (44). Because the experiments in Fig. 2A were performed with a carboxyl end FLAG-tagged betaglycan construct, it was important to determine whether or not this tag had any effect in the shedding of the receptor. For that purpose, we compared the pervanadate-stimulated shedding of betaglycan constructs with or without the FLAG tag (Fig. 1A). As shown in Fig. 2B, the presence or absence of this 8-residue tag at the carboxyl end of the receptor did not affect the shedding process. In addition, this experiment showed that the shedding of the proteoglycan

FIG. 5. MT1-MMP, MT2-MMP, and MT3-MMP expression. Total RNA (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) from CHO, L6E9/Mycgag⁻, and COS-1 cells was subjected to Northern blot analysis with ³²P-labeled MT1-MMP (A) or MT3-MMP (C) cDNA probe. Total RNA from COS-1 cells transiently transfected with MycMT1-MMP or MT3-MMP cDNA was used as positive control. Membranes were stripped and probed with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). B, Western blot analysis of MT1-MMP protein in cell lysates with anti-MT1-MMP LEM 2/63 monoclonal antibody. The black arrowhead indicates the specific band. D, Western blot analysis of MT2-MMP protein in cell lysates with anti-MT2-MMP 162-22G5 monoclonal antibody. Cell lysate from COS-1 cells transiently transfected with MT2-MMP cDNA was used as a positive control. Blots were revealed with ECL Plus kit and exposed to x-ray films for different times as indicated.



form of betaglycan is also stimulated by pervanadate, indicating that the presence of glycosaminoglycan chains does not interfere with this activation.

Pervanadate-inducible Betaglycan Shedding Is Not Mediated by TACE—We have reported previously that the constitutive shedding of betaglycan is not affected in a mutant cell line (M1 cells) defective in the shedding of a variety of other proteins (30). It has been shown recently that this mutant cell line has a specific defect that prevents the activation of TACE, but not other metalloproteases (45). Therefore, to determine whether active TACE participates in the shedding of betaglycan induced by pervanadate, we analyze the effect of pervanadate on the M1 mutant and on the wild type CHO cells that were stably transfected with HA-tagged betaglycan (HABG construct, see Fig. 1). The levels of the soluble form of betaglycan generated by M1 cells treated with pervanadate were indistinguishable from those generated by wild type cells under the same conditions (Fig. 2C), indicating that TACE does not mediate the pervanadate-stimulated shedding of betaglycan.

The Shedding of sBG-90 Is Sensitive to TIMP-2—The vast majority of shedding events analyzed to date is executed by zinc-dependent metalloproteases. To characterize the shedding activity stimulated by pervanadate, we tested the effect of different protease inhibitors. As expected, whereas the hydroxamates BB-94 and TAPI-2 prevented the production of sBG-90 (Table I and Fig. 3A), compounds that block serine, cysteine or aspartic proteases had little or no effect (Table I). This result indicates that a zinc-dependent metalloprotease is necessary for the shedding of sBG-90. Hydroxamates are known to inhibit the matrixins (MMPs) as well as reprotolysins (ADAMs, metalloprotease disintegrins). To define further the proteolytic activity responsible for the production of sBG-90, we analyzed the effect of two members of the family of the tissue inhibitors of metalloproteases, TIMP-1 and TIMP-2, which are specific for certain MMPs and metalloprotease disintegrins (46). Fig. 3B shows that low concentrations of TIMP-2 blocked the shedding of sBG-90, whereas TIMP-1 had little or no effect, indicating

that a metalloprotease sensitive to TIMP-2 is necessary for the shedding of sBG-90 in L6E9/Mycgag⁻ cells.

Similar experiments with COS-1 cells transfected with the HAGag⁻ construct (Fig. 3C) indicated that the pervanadate-stimulated shedding of sBG-120 is blocked by BB-94 and unaffected by TIMP-1. Interestingly, TIMP-2, at concentrations that completely inhibited the cleavage of sBG-90, did not have a significant effect on the cleavage of sBG-120 (Fig. 3C), indicating that different proteases are involved in the shedding of the different forms of soluble betaglycan.

Overexpression of MT1- or MT3-MMPs Augments the Shedding of sBG-90—The activity of several metalloprotease-disintegrins putatively involved in ectodomain shedding, such as TACE, is not inhibited by TIMP-2 (46), further supporting that the generation of sBG-90 is not dependent on these metalloproteases. In contrast, other metalloproteases putatively involved in ectodomain shedding, such as certain MT-MMPs, are inhibited by TIMP-2 (37). To date, six MT-MMPs have been described (37–39, 47–49). To analyze the putative role of MT-MMPs on the shedding of sBG-90, we analyzed the effect of the overexpression of these metalloproteases on the production of sBG-90 by L6E9 cells. As shown in Fig. 4A, overexpression of MT1- or MT3-MMP in L6E9/Mycgag⁻ cells clearly induced the production of sBG-90 by untreated cells, whereas MT2, MT4-, MT5-, and MT6- had no effect. In addition, MT1- had a modest but reproducible effect, increasing the production of sBG-90 in cells treated with pervanadate. These results indicate that MT1-, MT3-MMPs or a similar metalloprotease, could be responsible for the production of sBG-90 in L6E9 cells. On the other hand, overexpression of MT2-MMP partially inhibited the production of sBG-90 induced by pervanadate. A similar effect was observed in CHO cells transiently transfected with betaglycan and MT2-MMP (data not shown and see Fig. 7), opening the possibility that MT2-MMP influences the expression of betaglycan or, alternatively, that of the endogenous protease responsible for the shedding of sBG-90.

To confirm and extend these results we performed a similar

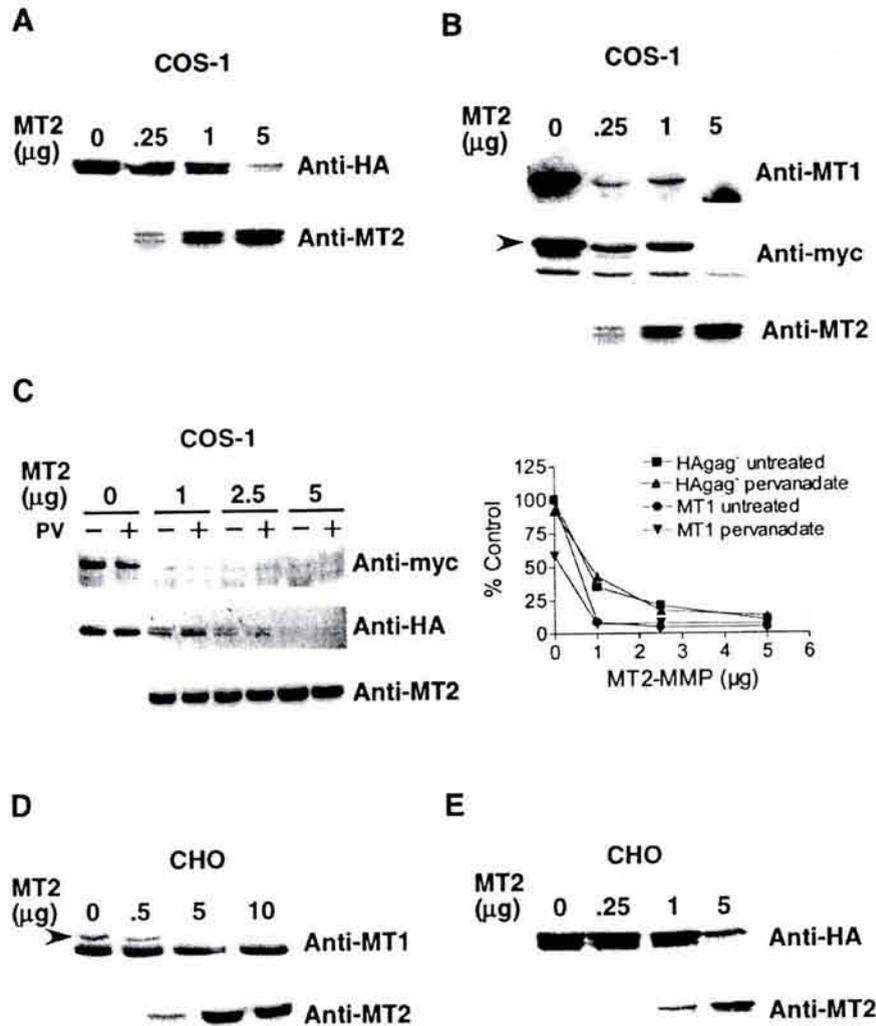


FIG. 6. Effect of the overexpression of MT2-MMP on MT1-MMP and betaglycan. COS-1 (A) or CHO cells (E) were transiently cotransfected with 5 μg of HA agag^- construction and increasing amounts of MT2-MMP vector. Total cell lysate was analyzed by Western blot with anti-HA and anti-MT2-MMP monoclonal antibodies as indicated. COS-1 (B) cells were transiently cotransfected with 5 μg of Myc-MT1-MMP vector and increasing amounts of MT2-MMP vector, whereas CHO cells (D) were transfected only with increasing amounts of MT2-MMP. Equal amounts of total cell lysate were analyzed by Western blot with anti-c-Myc, anti-MT1-MMP LEM 2/63, and anti-MT2-MMP monoclonal antibodies as indicated. C, COS-1 cells were cotransfected with 5 μg of Myc-MT1-MMP, 5 μg of HA agag^- construction, and increasing amounts of MT2-MMP vector. Cells were incubated for 30 min in the absence (-) or presence (+) of 100 μM pervanadate (PV). Equal amounts of total cell lysate were subjected to Western blot analysis with anti-c-Myc, anti-HA, or anti-MT2-MMP monoclonal antibodies. The black arrowhead in B and D indicates specific bands. Bands were quantified and graphically presented as a percentage of the level of the indicated protein observed in cells transfected without MT2-MMP and treated without pervanadate.

experiment using COS-1 cells, which, in contrast to L6E9 cells, produce predominantly sBG-120 upon the treatment with pervanadate. Thus, we transiently coexpressed in COS-1 cells the HA agag^- FLAG construct together with each one of the MT-MMPs or with the empty expression vector and analyzed the appearance of the sBG fragments in the presence or absence of pervanadate. As in the case of L6E9/Myc agag^- cells, although overexpression of MT4-, MT5-, and MT6-MMP had little or no effect, overexpression of MT1- and MT3-MMP induced the production of sBG-90 in untreated and treated cells (Fig. 4B). This induction was concomitant with a profound decrease in the production of sBG-120, indicating a competition between MT1-, MT3-MMP and the protease responsible for the generation of sBG-120. Identical results were observed when COS-1 cells were transfected with a HA agag^- construct devoid of the FLAG epitope at the carboxyl terminus (data not shown), suggesting that the cytosolic tail does not participate decisively in this process. As observed in the case of sBG-90 (Fig. 4A), the over-

expression of MT2-MMP had an inhibitory effect on the pervanadate-induced production of sBG-120 in COS-1 cells (Fig. 4B), which suggests that this metalloprotease could affect the expression of betaglycan and/or of the protease responsible for the generation of sBG-120. Importantly, in the experiments shown in Fig. 4, the presence of each one of the transfected MT-MMPs was confirmed by Western blot analysis of cell lysates, indicating that the lack of effect of some metalloproteases was not the result of failed expression. Thus, the results obtained by cotransfection in COS-1 cells confirmed those obtained with L6E9/Myc agag^- cells and pointed to MT1- and MT3-MMP, or similar metalloproteases, as responsible for the production of sBG-90. On the other hand, overexpression of MT2-MMP consistently results in a decrease in the production of soluble betaglycan.

MT1-MMP Is Responsible for the Shedding of sBG-90 in L6E9 and CHO Cells—To define further the metalloprotease responsible for the shedding of sBG-90 we evaluated the ex-

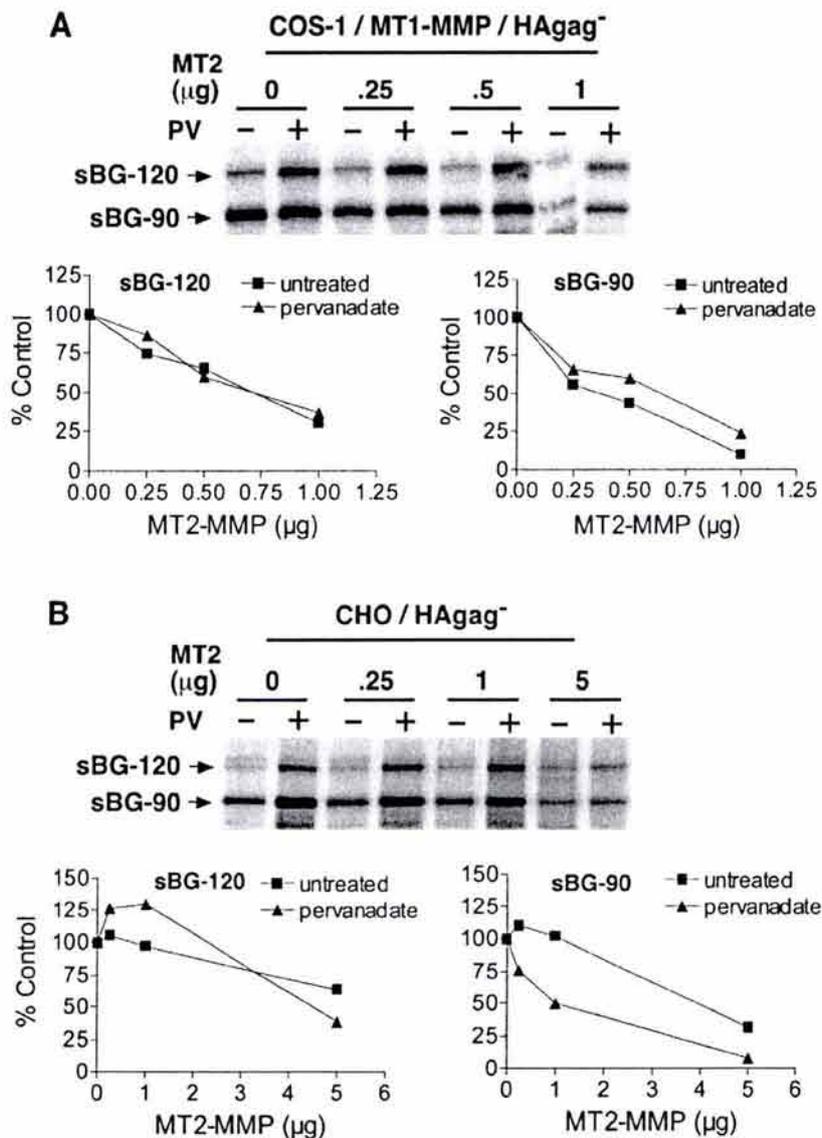


FIG. 7. Effect of the overexpression of MT2-MMP on the shedding of betaglycan. *A*, COS-1 cells were transiently cotransfected with 5 μg of Myc-MT1-MMP, 5 μg of HA_{gag}⁻ construction, and increasing amounts of MT2-MMP vector. Cells were metabolically labeled for 2 h with [³⁵S]methionine, the label was chased in complete medium for 2 h, and the cells were incubated for the last 30 min in the absence or presence of 100 μM pervanadate (PV). Medium was immunoprecipitated with anti-betaglycan ectodomain antibody 822. *B*, CHO cells were transiently cotransfected with 5 μg of HA_{gag}⁻ construction and increasing amounts of MT2-MMP vector. Cells were metabolically labeled and medium immunoprecipitated as in *A*. sBG-120 and sBG-90 were quantified using the ImageQuant software and are presented graphically as the percentage of betaglycan shed by cells transfected without MT2-MMP.

pression of endogenous MT1- and MT3-MMPs in CHO, COS-1, and L6E9 cells. Northern blot analysis revealed that although CHO and L6E9 cells had detectable amounts of MT1-MMP mRNA, COS-1 cells, as reported before (50), did not express this MT-MMP (Fig. 5A). Cell lysates subjected to Western blot analysis confirmed the results obtained by Northern blot (Fig. 5B). On the other hand, MT3-MMP mRNA was undetectable in CHO, COS-1, and L6E9 cells (Fig. 5C). Thus, there is an excellent correlation between the presence of MT1-MMP and the ability to shed sBG-90 in the cell lines studied. This fact, along with the lack of detectable levels of MT3-MMP mRNA, suggests that, at least in L6E9 and CHO cells, the metalloprotease responsible for the generation of sBG-90 is MT1-MMP.

MT2-MMP Decreases MT1-MMP and Betaglycan—One surprising result from the above studies was the observation that overexpression of MT2-MMP decreases the production of sBG-90 by L6E9 cells and abolishes the production of sBG-120 in cotransfection experiments in COS-1 cells (Fig. 4). A possible explanation for these findings is that MT2-MMP affects the expression of betaglycan and/or the protease responsible for the generation of sBG-90, likely MT1-MMP in L6E9 cells. To clarify these points, as a first approach, we determined the level of

expression of MT2-MMP in COS-1, L6E9, and CHO cells with a well characterized antibody. The Western blot in Fig. 5D indicated that MT2-MMP is practically absent in these cell lines. Northern blot analysis (not shown) showed that MT2-MMP mRNA was undetectable in the same lines. This prompted us to determine whether or not increasing amounts of MT2-MMP had any effect on the levels of MT1-MMP and/or betaglycan. For that purpose, we carried out cotransfection experiments. Coexpression in COS-1 cells of increasing amounts of MT2-MMP with HA_{gag}⁻ or Myc/MT1-MMP, separately (Fig. 6, *A* and *B*, respectively), or together (Fig. 6C), had a detrimental effect on the levels of MT1-MMP and betaglycan. Western blot analysis of total cell lysates reproducibly demonstrated that HA_{gag}⁻ decreases as MT2 increases (Fig. 6A). Similarly, as revealed by an antibody against its epitope tag (c-Myc), as well as an antibody directed against its catalytic region (LEM 2/63), the levels of transfected Myc/MT1-MMP were decreased by MT2-MMP in a dose-dependent manner (Fig. 6B). Importantly, in CHO cells the same effects were observed on the levels of endogenous MT1-MMP (Fig. 6D) and transfected HA_{gag}⁻ (Fig. 6E) showing that the observed effects, at least in the case of MT1-MMP, are not exclusive of the

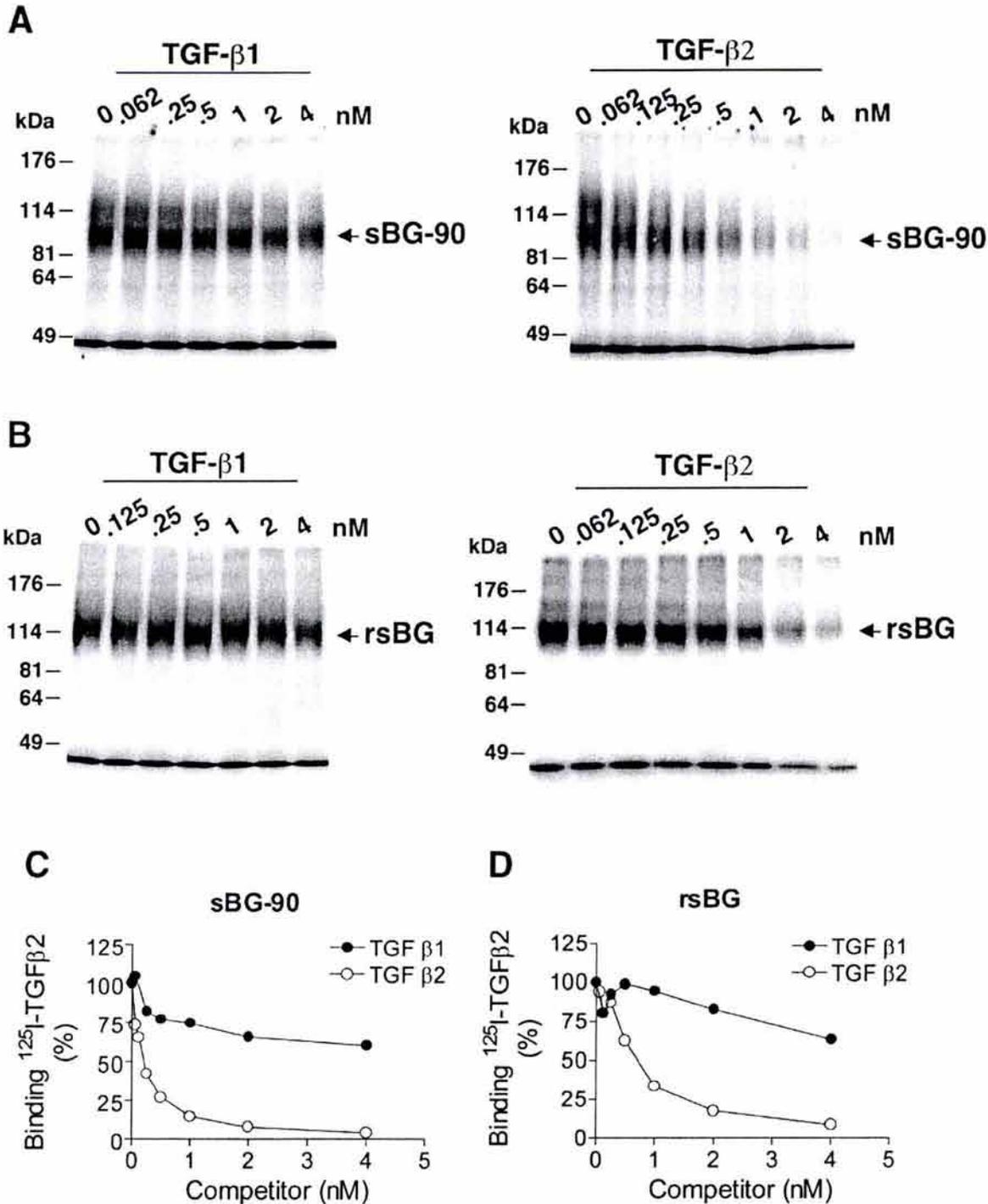


FIG. 8. TGF- β isoform-specific competition for the TGF- β 2 binding of sBG-90 and recombinant soluble betaglycan. Medium from L6E9/Myogag⁻ cells incubated with 100 μM pervanadate (A) or recombinant soluble betaglycan (B) (10 ng/assay in both) were affinity labeled in solution with 100 pM ^{125}I -TGF- β 2 in the presence of the indicated concentration of competing unlabeled TGF- β 1 or TGF- β 2. The labeling reactions were immunoprecipitated with anti-c-Myc monoclonal antibody and protein G-Sepharose. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, quantified from the PhosphorImager scans of the gels, and plotted as the percent of ^{125}I -TGF- β 2 binding against the concentration of unlabeled competitor (C and D). The locations of sBG-90 and recombinant soluble betaglycan (rsBG) are indicated. Because the total level of binding was lesser for the sBG-90 fragment, its gels (A) were exposed 4 times longer than the gels containing the rsBG (B).

transfected proteins. Consistent with the above results, the shedding of both forms of soluble betaglycan sBG-90 and sBG-120 was decreased in a concentration-dependent manner by MT2-MMP expressed in COS-1 (Fig. 7A) and CHO cells (Fig. 7B). Collectively, these results show that overexpression of

MT2-MMP induces a down-modulation of ectopically expressed betaglycan, explaining the decrease in the production of sBG-120 and sBG-90 observed in different cell lines. In addition, MT1-MMP, likely responsible for the generation of sBG-90, is also down-modulated by MT2-MMP.

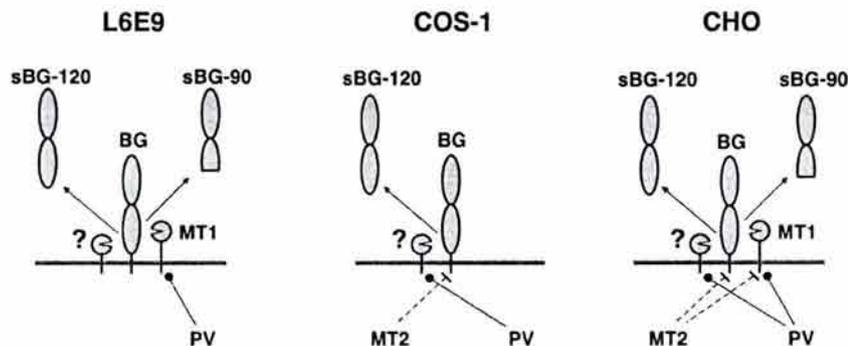


FIG. 9. Schematic representation of the proteases involved in the shedding of betaglycan ectodomain identified in the present work. Membrane-bound betaglycan (BG) may be the substrate of different zinc metalloproteases leading to cleavage of its ectodomain and to release of different forms of the soluble receptor (sBG-90 and sBG-120). L6E9 cells constitutively shed sBG-90 and sBG-120 and upon stimulation with pervanadate (PV) increase their shedding of sBG-90, apparently by stimulation of their endogenous MT1-MMP (MT1). In COS-1 cells, which lack MT1- and MT3-MMP, pervanadate stimulates an unknown metalloprotease (?) that leads to the augmented shedding of sBG-120. In CHO cells, pervanadate, acting via endogenous MT1-MMP and unknown metalloprotease, augments the shedding of both sBG-90 and sBG-120, respectively. By an unknown mechanism, the ectopic expression of MT2-MMP (MT2) decreases betaglycan and MT1-MMP in COS-1 and CHO cells.

sBG-90 Binds TGF- β 1 and TGF- β 2 with Relative Affinities Similar to the Wild Type Membrane Receptor—To characterize the TGF- β binding properties of sBG-90, we performed ligand binding competition assays. For this purpose medium from L6E9/Mycgag⁻ cells treated with pervanadate were affinity labeled in solution with a constant amount of ¹²⁵I-TGF- β 2 and an increasing concentration (from 0 to 4 nM) of competing unlabeled TGF- β 1 or TGF- β 2 (Fig. 8A). As a reference for comparison, we also tested the baculoviral recombinant soluble betaglycan (Fig. 8B), which binds TGF- β similar to the wild type membrane receptor (22). Binding of ¹²⁵I-TGF- β 2 to sBG-90 (Fig. 8C) was effectively competed by cold TGF- β 2 but not by the TGF- β 1 isoform. This pattern of competition, which was exhibited by recombinant soluble betaglycan (Fig. 8D), is characteristic of wild type betaglycan (17). Therefore, this result opens the possibility that sBG-90 is a specific modulator of TGF- β and or any of its other known ligands.

DISCUSSION

Here we show that betaglycan shedding can be stimulated by pervanadate, a general inhibitor of tyrosine phosphatases, and results in the production of two distinct fragments with the ability to bind TGF- β . Pervanadate activates the shedding of several cell surface proteins, some of them, such as HER4 (51), proamphiregulin (51), syndecan-1 (52), and amyloid- β protein precursor (53), are also shed in response to PMA, a well known activator of TACE. In contrast, the shedding of betaglycan (this study), HER 2 receptor (43), and TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) in CHO and fibroblast cells (54) can be stimulated by pervanadate but not by PMA, indicating that TACE is not involved in these shedding events.

Upon treatment with pervanadate, different cell lines produce different forms of soluble betaglycan. L6E9 myoblasts secrete a ~90-kDa fragment (sBG-90), COS-1 cells a ~120-kDa fragment (sBG-120), and CHO cells produce both of them (Fig. 9). The fact that the production of both of these forms is inhibited by the hydroxamate BB-94 suggests that betaglycan is the substrate of one or more zinc-dependent metalloproteases. The effect of the TIMPs has been used previously to characterize the identity of the metalloprotease(s) involved in a given shedding event. For example, TACE is inhibited by TIMP-3, but not by TIMP-2 or TIMP-1 (55), and the majority of the MT-MMPs are inhibited by TIMP-2, but not by TIMP-1 or TIMP-3 (37, 38, 47–49, 56). Our data demonstrate that the pervanadate-activated proteolytic activity that results in the production of the sBG-90 fragment in L6E9 cells is inhibited by TIMP-2 but not by TIMP-1. This result, along with that obtained with mutant

cells defective in TACE activity (M1 cells), confirms that TACE is not involved in the pervanadate-stimulated release of betaglycan and argue in favor of members of MT-MMPs. To date six members of the subfamily of MT-MMP have been described (37–39, 47–49). It has been shown that among the six MT-MMPs, only MT4-MMP is not inhibited by TIMP-2 (37), and MT6-MMP is inhibited by TIMP-2 as well as TIMP-1 (56), ruling out MT4- and MT6-MMP as the pervanadate-stimulated sBG-90 sheddase. Accordingly, we observed that overexpression of these MT-MMPs did not increase sBG-90 production. On the other hand, overexpression of MT1-MMP and MT3-MMP in L6E9 cells significantly increased the basal production of sBG-90, and MT1-MMP significantly enhanced its pervanadate-stimulated release, indicating that these metalloproteases participate in the shedding of betaglycan. The experiment performed with COS-1 cells overexpressing MT1- and MT3-MMP strongly supports this conclusion. Parental COS-1 cells do not express MT1- or MT3-MMP and therefore constitute functional knock-outs for these proteases (Fig. 5). In agreement with the proposal that these MT-MMPs are involved in the production of sBG-90, COS-1 cells produce sBG 120 preferentially. Furthermore, upon transfection with MT1- and MT3-MMP, COS-1 acquires the ability to generate sBG-90 (Fig. 4B). The loss of the regulated release of sBG-90 when MT1- and MT3-MMP are transfected in L6E9 and COS-1 cells may be caused by the overexpression of these proteases, which may overcome the regulatory mechanisms that normally operate upon the endogenous enzymes. Therefore, these data allow us to conclude that MT1- and/or MT3-MMP has the ability to produce sBG-90 upon stimulation with pervanadate. However, the fact that L6E9 and CHO cells, which are able to shed sBG-90, lack expression of MT3-MMP, strongly suggests that, at least in these cell lines, the metalloprotease responsible for the generation of this form of soluble betaglycan is MT1-MMP (Fig. 9). Nonetheless, our transfection experiments indicate that cell lineages expressing MT3-MMP are also able to generate sBG-90.

In addition to its role in the breakdown of components of the extracellular matrix and activation of other MMPs, MT1-MMP is linked directly to the shedding of several unrelated membrane proteins (57). Overexpression of MT1-MMP by glioma and fibrosarcoma cells led to proteolytic cleavage of cell surface tissue transglutaminase (58). Soluble recombinant MT1-MMP is able to cleave pro-TNF- α to its mature form *in vitro* (59). Interestingly, one of the shedding activities described for TRANCE is similar to the one reported here. The pervanadate-stimulated shedding of TRANCE is inhibited by TIMP-2, but

not by TIMP-1, and MT1-MMP has been proposed as the metalloprotease responsible (54). It has been reported that the cell adhesion molecule CD44 (60) and syndecan-1 (61) are directly shed by MT1-MMP and MT3-MMP. In these studies it was also demonstrated that coexpression of the others members of MT-MMP was without effect. Thus, it is not unexpected that MT1-MMP and MT3-MMP may have similar substrates, as we have observed here for betaglycan.

Regarding the identity of the protease that mediates the production of sBG-120 all we can conclude at this moment is that it is different from those generating sBG-90. Two findings support this conclusion: its lack of inhibition by TIMP-1 and TIMP-2, and the fact that its activity is overcome when cells are transfected with MT1- or MT3-MMPs. Further studies will be necessary to determine which protease mediates the per-vanadate-stimulated production of sBG-120 (Fig. 9).

The fact that betaglycan ectodomain is shed by different proteases is not unprecedented; several reports have demonstrated the possibility of different shedding activities capable of cleaving the same substrate. For example, TRANCE can be released by two different metalloproteases: one in fibroblasts and CHO cells, and another in COS-7 cells (54). The metalloprotease in fibroblasts and CHO cells is stimulated with per-vanadate but not by PMA and inhibited by TIMP-2 but not TIMP-1, whereas the metalloprotease in COS-7 cells is refractory to per-vanadate and is not inhibited by TIMP-1 or -2 (54). Pro-TNF- α is cleaved by different proteases in different cells and conditions. TACE has been described as the principal pro-TNF- α sheddase in many cell types (29, 62, 63), but MMP-7 (matrilysin) (64), ADAM 10 (65), and MT4-MMP (37) can also cleave pro-TNF- α . On the other hand, the existence of a metalloprotease activity alternative to TACE with the ability to shed pro-TGF- α has been demonstrated recently (66).

Deletion mutagenesis analyses have revealed two TGF- β binding regions in the betaglycan ectodomain (17, 21, 22, 67). One region is at the amino-terminal half (related to endoglin, Fig. 1A) and the other at the carboxyl-terminal half (related to uromodulin, Fig. 1A). The recently described inhibin A binding region resides at the carboxyl-terminal half of betaglycan ectodomain (17). Based on their apparent sizes, we could have foretold that both sBG-90 and sBG-120 would have TGF- β binding activity (which they do; Fig. 8 and data not shown) because they retain at least one entire ligand binding domain. The data presented in Fig. 8 indicate that although the total binding of sBG-90 is lower than that of recombinant soluble betaglycan, its relative TGF- β isoform affinities are comparable with those shown by the wild type receptor. This is not surprising because sBG-90 is predicted to contain the complete ligand binding site related to endoglin which, as we have shown before, has a TGF- β isoform preference similar to that of the wild type receptor (17). Some potential roles for soluble receptors include increasing the half-life of the ligand or acting as an inhibitor for ligand binding to the cell membrane-anchored receptor (26). Whether or not sBG-90 and/or sBG-120 has such functional roles or behave as soluble recombinant betaglycan, inhibiting TGF- β binding to cell surface receptors (21, 22), remains to be determined experimentally.

A remarkable observation from the present studies is the effect of MT2-MMP on the levels of betaglycan and MT1-MMP (Fig. 9). Although at this moment the mechanism involved is unknown, the data shown in Fig. 6 demonstrate that MT2-MMP decreases the cellular content of betaglycan and MT1-MMP in a dose-dependent manner. This effect is not likely the result of a decreased level of expression of the plasmids encoding MT1-MMP or betaglycan in cells cotransfected with differ-

ent combinations of plasmids because it is not observed in cells overexpressing MT1-, MT3-, MT4-, MT5-, or MT6-MMP. This notion is supported further by the fact that endogenous MT1-MMP is also decreased by overexpression of MT2-MMP. In addition to being relevant for the shedding of betaglycan, this effect of MT2-MMP may have wider consequences because it implies that MT2-MMP is capable of down-regulating MT1-MMP. To our knowledge, there are four reports that show concomitant expression of these two metalloproteases, in glioblastoma tissues (68), in pancreatic tumor cell lines (60), in primary cultures of smooth muscle cells from aorta (69), and in placenta tissues (70). Nonetheless, in view of the paramount importance that MT1- and MT2-MMPs have in the invasiveness, morphogenesis, and metastatic potential of epithelial cells (71, 72), this observation deserves further investigation.

Acknowledgments—We are very grateful to Dr. Alicia Arroyo for the generous gift of anti-MT1-MMP antibodies, to Dr. J. A. García-Sáinz for helpful suggestions and comments, and to Patricia Juárez Camacho and Valentín Mendoza for encouraging discussions and superb technical assistance.

REFERENCES

- Roberts, A. B., and Sporn, M. B. (1993) *Growth Factors* 8, 1-9
- Kingsley, D. M. (1994) *Genes Dev.* 8, 133-146
- Blobe, G. C., Schieman, W. P., and Lodish, H. F. (2000) *N. Engl. J. Med.* 342, 1350-1358
- Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000) *Cell* 103, 295-309
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994) *Nature* 370, 341-347
- Massague, J. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., and Massague, J. (1991) *Cell* 67, 785-795
- Wang, X. F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F., and Weinberg, R. A. (1991) *Cell* 67, 797-805
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 19027-19030
- López-Casillas, F., Wrana, J. L., and Massague, J. (1993) *Cell* 73, 1435-1444
- Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Centrella, M., McCarthy, T. L., and Madri, J. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13567-13572
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M., and Vale, W. (2000) *Nature* 404, 411-414
- Wiater, E., and Vale, W. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 7934-7941
- Stenvers, K. L., Tursky, M. L., Harder, K. W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R. A., Sizeland, A. M., and Zhu, H. J. (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23, 4371-4385
- Chapman, S. C., Bernard, D. J., Jelen, J., and Woodruff, T. K. (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* 196, 79-93
- Gray, P. C., Bilezikjian, L. M., and Vale, W. (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* 188, 254-260
- Esparza-López, J., Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., and López-Casillas, F. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 14588-14596
- Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M., and Wells, R. G. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 823-829
- Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B., and Barnett, J. V. (1999) *Science* 283, 2080-2082
- Andres, J. L., Stanley, K., Cheifetz, S., and Massague, J. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 3137-3145
- López-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L., and Massague, J. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 557-568
- Vilchis-Landeros, M. M., Montiel, J. L., Mendoza, V., Mendoza-Hernandez, G., and López-Casillas, F. (2001) *Biochem. J.* 355, 215-222
- Bandyopadhyay, A., López-Casillas, F., Malik, S. N., Montiel, J. L., Mendoza, V., Yang, J., and Sun, L. Z. (2002) *Cancer Res.* 62, 4690-4695
- Arribas, J., and Borroto, A. (2002) *Chem. Rev.* 102, 4627-4638
- Schlondorff, J., and Blobel, C. P. (1999) *J. Cell Sci.* 112, 3603-3617
- Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997) *Biochem. J.* 321, 265-279
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., and Black, R. A. (1998) *Science* 282, 1281-1284
- Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J., and Corfas, G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 10379-10387
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., and Black, R. A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 14608-14614
- Arribas, J., López-Casillas, F., and Massague, J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 17160-17165
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616
- Arribas, J., and Massague, J. (1995) *J. Cell Biol.* 128, 433-441
- Kingston, R. E., Chen, C. A., and Okayama, H. (1990) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Chanda, V. B., ed) pp. 9.1.1-9.1.9, John Wiley & Sons, Inc., New York

34. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
35. Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H., and Russell, D. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8222–8229
36. Urena, J. M., Merlos-Suarez, A., Baselga, J., and Arribas, J. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 773–784
37. English, W. R., Puente, X. S., Freije, J. M., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., López-Otin, C., and Murphy, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14046–14055
38. Llano, E., Pendas, A. M., Freije, J. P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G., and López-Otin, C. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2570–2576
39. Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A. A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J., and López-Otin, C. (2000) *Cancer Res.* **60**, 877–882
40. Seed, B., and Aruffo, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3365–3369
41. Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K. K., and Massague, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20533–20538
42. Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T. K., Rose-John, S., and Massague, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11376–11382
43. Codony-Servat, J., Albanell, J., López-Talavera, J. C., Arribas, J., and Baselga, J. (1999) *Cancer Res.* **59**, 1196–1201
44. Globe, G. C., Schiemann, W. P., Pepin, M. C., Beauchemin, M., Moustakas, A., Lodish, H. F., and O'Connor-McCourt, M. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 24627–24637
45. Borroto, A., Ruiz-Paz, S., Villanueva de la Torre, T., Borrell-Pages, M., Merlos-Suarez, A., Pandiella, A., Blobel, C. P., Baselga, J., and Arribas, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25933–25939
46. Amour, A., Knight, C. G., English, W. R., Webster, A., Slocombe, P. M., Knauper, V., Docherty, A. J., Becherer, J. D., Blobel, C. P., and Murphy, G. (2002) *FEBS Lett.* **524**, 154–158
47. Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., and Seiki, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 23013–23020
48. Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., and Murphy, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17119–17123
49. Butler, G. S., Will, H., Atkinson, S. J., and Murphy, G. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 653–657
50. Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1994) *Nature* **370**, 61–65
51. Vecchi, M., Baulida, J., and Carpenter, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18989–18995
52. Reiland, J., Ott, V. L., Lebakken, C. S., Yeaman, C., McCarthy, J., and Rapraeger, A. C. (1996) *Biochem. J.* **319**, 39–47
53. Slack, B. E., Breu, J., Petryniak, M. A., Srivastava, K., and Wurtman, R. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8337–8344
54. Schlondorff, J., Lum, L., and Blobel, C. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14665–14674
55. Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A. J., and Murphy, G. (1998) *FEBS Lett.* **435**, 39–44
56. English, W. R., Velasco, G., Stracke, J. O., Knauper, V., and Murphy, G. (2001) *FEBS Lett.* **491**, 137–142
57. Zucker, S., Pei, D., Cao, J., and López-Otin, C. (2003) *Curr. Top. Dev. Biol.* **54**, 1–74
58. Belkin, A. M., Akimov, S. S., Zaritskaya, L. S., Ratnikov, B. I., Deryugina, E. I., and Strongin, A. Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 18415–18422
59. d'Ortho, M. P., Will, H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpl, R., Zardi, L., and Murphy, G. (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 751–757
60. Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 893–904
61. Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 40764–40770
62. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997) *Nature* **385**, 729–733
63. Merlos-Suarez, A., Fernandez-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., and Arribas, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24955–24962
64. Haro, H., Crawford, H. C., Fingleton, B., Shinomiya, K., Spengler, D. M., and Matrisian, L. M. (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 143–150
65. Lunn, C. A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P. J., Narula, S. K., and Lundell, D. (1997) *FEBS Lett.* **400**, 333–335
66. Merlos-Suarez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J., and Arribas, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48510–48517
67. Pepin, M. C., Beauchemin, M., Collins, C., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M. D. (1995) *FEBS Lett.* **377**, 368–372
68. Nakada, M., Nakamura, H., Ikeda, E., Fujimoto, N., Yamashita, J., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1999) *Am. J. Pathol.* **154**, 417–428
69. Shofuda, K., Yasumitsu, H., Nishihashi, A., Miki, K., and Miyazaki, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9749–9754
70. Bjorn, S. F., Hastrup, N., Larsen, J. F., Lund, L. R., and Pyke, C. (2000) *Placenta* **21**, 170–176
71. Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I., and Weiss, S. J. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 1309–1323
72. Hotary, K. B., Allen, E. D., Brooks, P. C., Datta, N. S., Long, M. W., and Weiss, S. J. (2003) *Cell* **114**, 33–45