

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Petra Dvořáková

Role fibroblastového aktivačního proteinu a jiných proteas
ve vývoji nádorů

The role of fibroblast activation protein and other proteases
in tumour progression

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. května 2016

Petra Dvořáková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za to, že mě přijal do svého výzkumného týmu a vždy mi s ochotou a s přátelským přístupem se vším pomohl, nejen co se bakalářské práce týče. Rovněž děkuji Tomáši Knedlíkovi za cenné rady a pomoc při psaní této práce a také ostatním členům týmu za vytváření pozitivního pracovního prostředí. Velký dík patří mým blízkým, kteří mě podporovali a stáli při mně.

Abstrakt

Proteasy jsou často spojeny s nádorovými onemocněními, ve kterých zastávají funkci předních enzymů zodpovědných za invazivitu nádorových buněk a vznik metastáz. Jejich proteolytická aktivita jim však kromě degradace extracelulární matrix nutné pro invazivitu umožňuje také další cesty ovlivňování progresu nádoru. Tato práce se zabývá studiem procesů, kterými proteasy vývoj nádoru regulují, ať už pozitivně či negativně, a také zmiňuje faktory působící na činnost proteas. Ve spojitosti s invazivitou nádorových buněk je významná část práce věnována roli fibroblastového aktivačního proteinu – serinové proteasy, která je významným terapeutickým cílem pro léčbu epitheliálních nádorů díky specifické expresi ve stromálních fibroblastech a schopnosti štěpit kolagen. Pozornost je v této práci kladena také na dipeptidylpeptidasu IV, blízký homolog fibroblastového aktivačního proteinu, především v souvislosti se selektivním cílením na fibroblastový aktivační protein pomocí inhibitorů a jiných terapeutických nástrojů, jejichž vývoj a použití jsou v práci rovněž nastíněny.

Klíčová slova: proteasy, fibroblastový aktivační protein, dipeptidylpeptidasa IV, nádorová invazivita, angiogeneze, progresu nádoru, nádorová terapie, doručování léčiv

Abstract

Proteases are often associated with cancer and play a role of leading enzymes responsible for tumour cell invasion and metastasis. Proteolytic activity enables proteases to influence tumour progression in many ways, including cleavage of extracellular matrix, which is necessary for invasion. This thesis deals with the study of processes by which proteases regulate tumour development, either positively or negatively, and also mentions factors influencing the activity of the proteases. In connection with invasiveness of tumour cells, a major part of the thesis is dedicated to the role of fibroblast activation protein. This serine protease is expressed in stromal fibroblasts, is able to cleave collagen and has been thus established as a therapeutic target for the treatment of carcinomas. The emphasis is also put on dipeptidyl peptidase IV, a close homologue of fibroblast activation protein, especially in relation with a selective targeting of fibroblast activation protein using the inhibitors and other therapeutic agents, whose development and use are also outlined in this thesis.

Key words: proteases, fibroblast activation protein, dipeptidyl peptidase IV, tumour cell invasion, angiogenesis, tumour progression, cancer therapy, drug delivery

Seznam zkratek

4E-BP1	protein vázající eukaryotický iniciační faktor 4E
α -SMA	α -aktin hladkého svalu
α_2 AP	α_2 -antiplasmin
APCE	enzym štěpící antiplasmin
BNP	mozkový natriuretický peptid
CAF	fibroblast asociovaný s nádory
CXCR4	CXC chemoxinový receptor typu 4
DPPIV	dipeptidylpeptidasa IV
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EGR1	faktor časně růstové odpovědi 1
FAK	fokální adhezivní kinasa
FAP	fibroblastový aktivační protein
FGF	fibroblastový růstový faktor
IL-8	interleukin-8
MMP	matrixová metaloproteasa
NPY	neuropeptid Y
PKB	protein kinasa B
PREP	prolyloligopeptidasa
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDF-1	faktor stromálních buněk
TGF- β	transformující růstový faktor- β
Tks4	tyrosin-kinasový substrát se čtyřmi SH3 doménami
Tks5	tyrosin-kinasový substrát s pěti SH3 doménami
TNF- α	faktor nádorové nekrózy- α
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Proteasy	2
2.1.1	Aktivace proteas	3
2.1.2	Regulace proteolytických dějů	3
3	Proteasy v nádorech	5
3.1	Proteolytické sítě	5
3.2	Role proteas v nádorové invazivitě	6
3.2.1	Invadopodia jako struktury charakteristické pro invazivitu.....	7
3.2.2	Reaktivní formy kyslíku jako podpůrná složka invazivity.....	8
3.3	Proteasy v angiogenezi	9
3.3.1	Proangiogenní role	9
3.3.2	Protiangiogenní role	10
4	Fibroblastový aktivační protein (FAP).....	12
4.1	Charakterizace FAP.....	12
4.1.1	Gen pro FAP a jeho transkripce	12
4.1.2	Struktura FAP.....	13
4.1.3	Enzymová aktivita.....	14
4.2	Fibroblasty asociované s nádory.....	15
4.3	FAP jako klíčový regulátor invazivity.....	18
4.4	FAP jako nádorový supresor?.....	19
4.5	FAP v angiogenezi.....	20
5	Dipeptidylpeptidasa IV (DPPIV)	21
5.1	Interakce DPPIV s FAP	22
6	Nádorová terapie	22
6.1	Terapie pomocí protilátek proti FAP.....	22
6.2	Terapie pomocí inhibitorů enzymové aktivity FAP	22
6.3	Cílené doručování léčiv pomocí FAP.....	24
7	Závěr.....	25
8	Použitá literatura	26

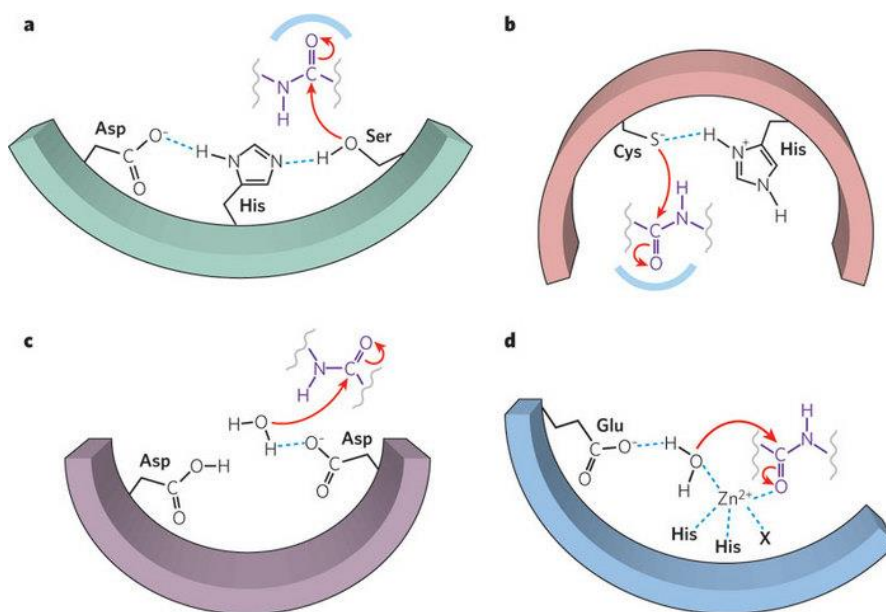
1 Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých státech, většina úmrtí však není způsobena samotným primárním nádorem, ale šířením nádorových buněk do jiných tkání. K tomu, aby mohly nádorové buňky migrovat tkáněmi a vytvářet metastáze v místech vzdálených primárních nádorů, je potřeba zpřístupnit cestu skrz extracelulární matrix tvořenou komplexní sítí proteinů. Na tomto procesu se podílí proteasy, které svou proteolytickou aktivitou degradují tuto proteinovou síť. Nejvýrazněji v tomto procesu vystupují matrixové metaloproteasy, avšak stejná aktivita byla objevena i u proteas jiných tříd, přičemž proteasy obecně působí v různě složitých kaskádách a sítích, charakterizujících široké funkční propojení těchto enzymů. Proteasy přispívají k invazivitě nádorů nejen degradací proteinových složek okolního prostředí nádorových buněk, ale také štěpením signálních molekul jako nejrůznějších růstových faktorů, které jsou často vázány v extracelulární matrix a po jejich uvolnění mohou zahajovat signální dráhy vedoucí například k proliferaci buněk. Tímto způsobem proteasy ovlivňují mimo jiné i tvorbu nových cév potřebnou pro další vývoj a růst nádoru. Obdobnou cestou mohou však proteasy též potlačovat růst nádoru vytvářením inhibitorů angiogeneze ze štěpených složek extracelulární matrix. Proteasy tedy balancují mezi určitými pro- a protiangienními stavy.

Na počátku devadesátých let byla objevena serinová proteasa nazvána podle její exprese na membránách nádorových fibroblastů fibroblastový aktivační protein (FAP). Stromální fibroblasty exprimující FAP byly nalezeny v mnoha karcinomech a po zjištění, že FAP vykazuje endopeptidasovou aktivitu schopnou štěpit kolagen, tedy důležitou složku extracelulární matrix, se FAP stal zájmem vědeckého zkoumání ve snaze porozumět jeho významu v nádorech. Ve většině typů epiteliálních nádorů byla pozorována korelace exprese FAP s nepříznivou prognózou, související s pravděpodobnou rolí FAP nejen v invazivitě, ale také v angiogenezi a růstu karcinomů. FAP sdílí 52% aminokyselinovou sekvenční identitu s dipeptidylpeptidasou IV (DPPIV), svým nejbližším homologem. DPPIV se v lidském těle exprimuje endogenně ve všech orgánech, na rozdíl od FAP, který se s výjimkou α -buněk pankreatu v normálních zdravých tkáních dospělého jedince nevyskytuje. Tato skutečnost má význam v nádorové terapii, kdy se vyvíjí selektivní inhibitory cílící pouze FAP a nikoliv na DPPIV. Zvýšená exprese FAP v karcinomech ho předurčuje nejen ke snaze inhibovat jeho aktivitu, ale také k využití jako prostředku k cílenému doručování toxických látek do buněk nádoru.

2 Proteasy

Proteasy jsou enzymy patřící mezi hydrolasy, tedy enzymy schopné hydrolyzovat chemické vazby – v případě proteas, jak jejich název napovídá, peptidové vazby v proteinech. Přibližně 550 lidských genů kóduje proteasy (Puente et al., 2003), což představuje více než 2 % lidského genomu. Proteasy se dělí na endopeptidasy (štěpící peptidovou vazbu uvnitř sekvence proteinu) a exopeptidasy (odštěpující aminokyseliny od konců proteinu). V rámci exopeptidas se rozlišují aminopeptidasy, štěpící proteiny od jejich N-konce, a karboxypeptidasy, štěpící proteiny od jejich C-konce. Podle mechanismu katalýzy se rozlišuje šest tříd proteas: metaloproteasy, aspartátové, glutamátové, cysteinové, threoninové a serinové proteasy. První tři jmenované třídy používají k nukleofilnímu ataku peptidové vazby molekulu vody, zatímco zbývajícím třem třídám slouží jako nukleofil aminokyselinový zbytek v aktivním místě (cystein, threonin nebo serin – odtud názvy příslušných tříd; Obr. 1). K podrobné klasifikaci a charakterizaci proteas slouží webová databáze MEROPS (Rawlings et al., 2016).



Obr. 1: Zobrazení mechanismu hydrolýzy peptidové vazby čtyř tříd proteas. Serinové proteasy (a) a cysteinové proteasy (b) používají k nukleofilnímu ataku peptidové vazby aminokyselinový zbytek v aktivním místě, aspartátovým proteasám (c) a metaloproteasám (d) slouží jako nukleofil molekula vody. Převzato z review Erez et al., 2009.

Existují i proteasy, které hydrolyzují nejenom klasickou alfa-peptidovou vazbu mezi aminokyselinami, ale i vazbu isopeptidovou, např. mezi ubikvitinem nebo ubikvitin-like proteiny a ϵ -aminoskupinou lysinu proteinu označeného polyubikvitinací k degradaci. Jedná se o tzv. deubikvitinační enzymy, patřící mezi cysteinové proteasy a metaloproteasy (shrnuto v Reyes-Turcu et al., 2009).

Proteasy zahrnují enzymy rozličných konformací a velikostí, od nejjednodušších proteas v řádech desítek kDa (příkladem je proteasa viru HIV fungující jako 20 kDa velký dimer; Navia et al., 1989) až po obrovské multimerní komplexy jako jsou mepriny – největší extracelulární metaloproteasy nebo cytosolické proteasomy o velikostech v řádech MDa (Bertenshaw et al., 2003).

Tak jako je široké spektrum proteinů patřících mezi proteasy, jsou stejně rozmanité jejich konkrétní funkce, od jednoduchých střevních proteas účastnících se trávení až po přísně regulované apoptotické proteasy. Proteasy hrají roli v mnoha dalších fyziologických procesech jako hemokoagulace, proliferace, štěpení prehormonů, remodelace extracelulární matrix a jiné. Jejich aktivita však musí být přesně regulována, aby nedocházelo k nekontrolovanému proteolytickému štěpení a degradaci (shrnutí v López-Otín and Bond, 2008).

2.1.1 Aktivace proteas

K aktivaci proteas dochází různými způsoby. Proteasy jsou nejčastěji syntetizovány jako neaktivní prekurzory nazývané zymogeny, které obsahují inhibiční prodomény stericky blokuující aktivní místo. Teprve po odštěpení této domény jinou proteasou nebo autokatalyticky (jak je známo například u pepsinu) se odhalí funkční aktivní místo schopné vázat substrát (shrnutí v Khan and James, 1998). Naproti tomu u některých zymogenů není aktivní místo nejprve vůbec zformováno a musí dojít k proteolytické přestavbě nebo je vyžadována vazba kofaktoru, aby se proteasa mohla stát funkční – příkladem je interakce koagulačního faktoru VIIa s tkáňovým faktorem (Banner et al., 1996).

Proteolýza však není vždy nutným procesem pro aktivaci. Zde jako příklad slouží proapoptotická kaspasa-9, pro jejíž aktivaci je klíčová dimerizace. Kaspasa-9 se v buňce vyskytuje jako neaktivní monomer a teprve dimerizací se vytvoří funkční aktivní místo (Renatus et al., 2001).

2.1.2 Regulace proteolytických dějů

Poté, co se proteasy stanou funkčními, je jejich aktivita regulována endogenními inhibitory. Počet nalezených inhibitorů je značně menší než počet známých proteas (Rawlings et al., 2010), což vypovídá o nízké selektivitě inhibitorů, tedy že jeden inhibitor může blokovat funkci více proteas, většinou však v rámci jedné třídy proteas. Byly ale objeveny i některé inhibitory schopné inhibice katalyticky rozdílných proteas (Schick et al., 1998). Podle mechanismu inhibice se rozlišují kanonické inhibitory (například serpiny – inhibitory

serinových proteas) vážící se do aktivního místa podobným způsobem jako substráty, či inhibitory obsazující oblasti poblíž aktivního centra (například cystatiny – inhibitory cysteinových proteas). Tkáňové inhibitory metaloproteas (tzv. TIMPs, z angl. tissue inhibitors of metalloproteinases) využívají mechanismus na rozhraní dvou výše zmíněných. Posledním případem jsou alosterické inhibitory, které se váží daleko od aktivního místa – příkladem je X-vázaný inhibitor apoptózy zabraňující tímto způsobem dimerizaci nutné pro vznik funkční kaspasy-9 (Huber et al., 2012; mechanismy inhibice shrnuty v Bode and Huber, 2000).

Kromě inhibitorů je další stupeň regulace aktivity proteas na úrovni jejich lokalizace, která do jisté míry usměrňuje jejich působení jen na určité místo. Rozlišují se proteasy extracelulární, intracelulární a transmembránové. Uvnitř buňky se pak proteasy mohou vyskytovat specificky jen v některých organelách – v mitochondriích, lysosomech (aspartátové a cysteinové proteasy fungující při nízkém pH) nebo v granulech buněk imunitního systému – příkladem striktní lokalizace je katepsin G, který se nachází pouze v tzv. azurofilních granulech neutrofilů (Leonhard et al., 2000; Owen et al., 1995).

Významnou regulací proteas je regulace na úrovni transkripce. Některé proteasy se exprimují v tkáních konstitutivně, u některých je však exprese vázána pouze na určité podmínky, stádium vývoje či patogenní stavy. Kaspasa-3 hraje roli v apoptóze defektních neuronů při vývoji mozku. Geny pro tuto proteasu jsou vysoce transkribovány v embryonálním stádiu a několik prvních postnatálních dnů. Už však týden po narození jsou hladiny exprese kaspasy 3 v kortexu minimální a v dospělém mozku takřka nedetekovatelné. Ke znovuzahájení transkripce genu pro kaspasu-3 a k následné apoptóze neuronů dochází v dospělosti jen po akutním poranění mozkové tkáně, jinak je její exprese silně umlčována, aby nedocházelo k neurodegeneraci (Yakovlev et al., 2001). Při zánětlivých onemocněních jako je revmatoidní artritida se exprimují matrixové metaloproteasy (MMP). Expresi indukují prozánětlivé cytokiny – faktor nádorové nekrózy- α (TNF- α) a interleukiny, produkované makrofágy v místě zánětu (shrnuto v Burrage et al., 2006).

3 Proteasy v nádorech

Proteasy se staly zájmem vědeckého bádání především v souvislosti s patologickými stavy, zvláště pak s onkologickými onemocněními. V mnoha typech nádorů dochází ke zvýšené expresi proteas, které svou proteolytickou aktivitou ovlivňují jak procesy spojené s invazivitou nádorových buněk a rozvojem metastáz, tak i angiogenezi nezbytnou pro růst nádoru. Nadměrná exprese a role v různých stádiích vývoje nádoru vytvořily z proteas efektivní terapeutické cíle pro vyvíjení nejrůznějších inhibitorů zamezujících jejich funkci a potlačujících nepříznivé prognózy nádorových onemocnění.

3.1 Proteolytické sítě

Proteasy nefungují jen jako samostatné jednotky. Právě naopak, velmi často jsou součástí nejrůznějších kaskád či proteolytických drah a vytváří propojené sítě navzájem se regulujících enzymů. Vznik těchto sítí je dán provázaností proteas při jejich aktivaci, kdy jedna proteasa může štěpit inaktivní prekurzory několika dalších nebo jejich inhibitory. Fortelny a kol. navrhli matematický model pro mapování interakcí mezi 1200 proteiny a našli více než 140 000 interakčních událostí mezi páry proteas, jejich substráty a inhibitory, což dokládá, jak složité sítě proteasy vytváří (Fortelny et al., 2014).

Vzájemnou aktivaci proteas představuje následující příklad: prokatepsin B je štěpen na aktivní formu katepsinem D, jehož dalším substrátem je i katepsin L. Aktivovaný katepsin L pak štěpí heparanasu (endoglykosidasa degradující extracelulární matrix). Katepsin B může být navíc aktivován také katepsinem G, urokinasou, tkáňovým aktivátorem plasminogenu (tPA) a elastasou. Katepsin G a elastasa pak mohou být aktivovány katepsinem C. Protože právě katepsin B je vysoce exprimován v mnoha typech nádorů, je na tomto příkladu vidět, jak je obecně důležité studovat proteasy nejen jako samostatné jednotky, ale v kontextu komplexní souhry několika vzájemně se regulujících enzymů. Tento širší pohled má význam zvláště v nádorové terapii založené na inhibici proteas, kdy cílení na více proteas by mohlo být více efektivní než inhibice individuálních proteas (shrnutí v Mason and Joyce, 2011). Na druhou stranu, inhibice konkrétních proteas může mít v důsledku těchto složitých interakčních sítí neočekávané důsledky na děje, které s proteolýzou zdánlivě bezprostředně nesouvisejí. Příkladem je selhání inhibitorů MMP v klinických testech, kde se měly ověřit jejich účinky při terapii pevných nádorů (Hutchinson et al., 1998).

Proteasové sítě jsou také propojeny s nejrůznějšími signálními dráhami, interagují se signálními molekulami (cytokiny, chemokiny, růstové faktory) a proteolyticky regulují jejich aktivitu (shrnutí v Mason and Joyce, 2011). Některé z těchto molekul, produkovaných buňkami nádorového prostředí, stimulují expresi proteas. Příkladem je interleukin-8 (IL-8), zvyšující expresi matrixové metaloproteasy-9 (MMP-9) v nádorech močového měchýře (Inoue et al., 1999). Použití protilátky proti IL-8 v myších modelech vedlo k potlačení růstu nádoru, k markantnímu snížení exprese a aktivity MMP-9 a invazivity nádoru (Mian et al., 2003). Expresi urokinasy ve stromálních buňkách karcinomu vaječníků parakrinně stimulují bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a epidermální růstový faktor (EGF) produkované nádorovými buňkami (Noskova et al., 2009).

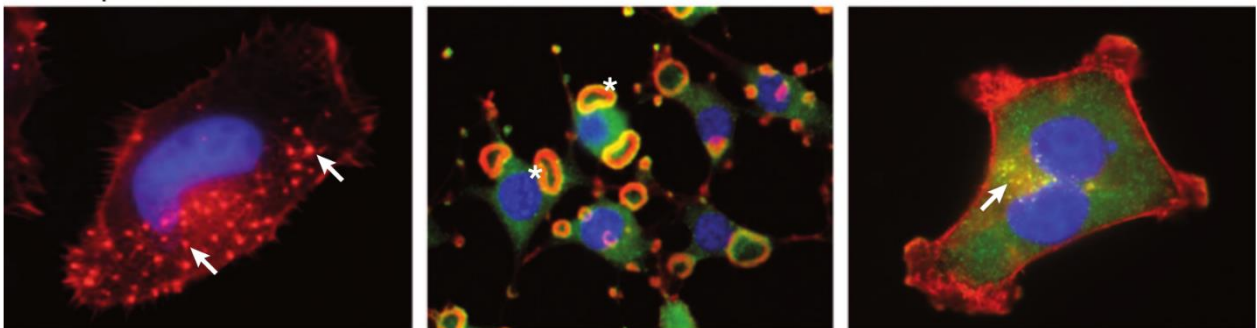
3.2 Role proteas v nádorové invazivitě

První zmínka o možné souvislosti proteas s nádorovým onemocněním pochází z roku 1946 od Alberta Fischera, který publikoval práci o tom, že proteolytická aktivita nádorových buněk by mohla být zodpovědná za degradaci extracelulární matrix (ECM) a následnou invazivitu buněk (Fischer, 1946). Od druhé poloviny 20. století se začaly tyto poznatky hromadit a jako hlavní proteasy zodpovědné za štěpení ECM byly shledány především MMP (Galloway et al., 1983). Postupně bylo zjištěno, že nejen metaloproteasy, ale i serinové proteasy (Park et al., 1999) a katepsiny (Buck et al., 1992) degradují složky ECM a mohou tak hrát roli v invazivitě buněk. Zároveň se ukázalo, že tyto procesy nejsou omezené jen na proteasy na nádorových buňkách, ale že k rozvoji metastáz přispívají také proteasy stromálních buněk (Basset et al., 1990).

Extracelulární matrix představuje komplexní síť proteinů (kolagen), glykoproteinů (laminin, fibronectin) a proteoglykanů (perlekan), které mají důležitou roli v buněčné adhezi a migraci. Zatímco kontrolovaná degradace složek ECM, nutná pro buněčnou migraci, charakterizuje pohyb buněk (např. imunitních) v normálních fyziologických podmínkách, deregulace těchto procesů vede k patologickým stavům, v případě nádorových onemocnění ke vzniku metastáz (shrnutí v Bonnans et al., 2014). Proteasy svou aktivitou přispívají k invazivitě také štěpením molekul mezibuněčných spojů, čímž rozrušují adhezi buněk. Bylo pozorováno, že hlavní složku mezibuněčných spojů – E-kadherin – štěpí cysteinové katepsiny B, L a S. Delece genů pro tyto proteasy vedla ke snížené invazivitě karcinomu pankreatu v myších (Gocheva et al., 2006).

3.2.1 Invadopodia jako struktury charakteristické pro invazivitu

V nádorových buňkách se proteasy shromažďují v oblastech zvaných invadopodia, představující mikrodomény v membráně bohaté na aktin (Obr. 2), které zprostředkovávají kontakt mezi buňkou a jejím prostředím a umožňují jim degradovat ECM (Chen, 1989). Obdobou invadopodií v normálních buňkách jsou podosomy, konstitutivně se vytvářející v makrofázích, dendritických buňkách, endoteliálních buňkách a osteoklastech. Díky koncentraci proteas v těchto strukturách jsou buňky schopny využívat procesy závislé na proteolýze, které se v případě podosomů uplatňují při remodelaci tkání (osteoklasty) nebo imunitních reakcích (makrofágy, dendritické buňky), zatímco u invadopodií jsou příčinou nežádoucí invaze buněk a vzniku metastáz (Veillat et al., 2015).



Obr. 2: Vizualizace invadopodií pomocí konfokální mikroskopie na buňkách karcinomu dlaždicového epitelu hlavy a krku (vlevo), Src-3T3 fibroblastech (uprostřed) a na buňkách karcinomu prsu (vpravo). Invadopodia jsou charakterizována jako struktury bohaté na aktin (červeně). Na jejich tvorbě má významný podíl kortaktin (zeleně) a jeho kolokalizace s aktinem (žlutě) potvrzuje přítomnost těchto struktur na buňkách. Šipky označují invadopodia ve formě bodových útvarů, hvězdičky značí invadopodia uspořádaná do tzv. rozet. Převzato z review Murphy and Courtneidge, 2011.

Formování invadopodií se účastní mnoho faktorů, z nichž ve spojení s proteasami jsou hlavní kortaktin a tyrosin-kinasový substrát se čtyřmi SH3 doménami (Tks4), proteiny důležité ve finální maturaci invadopodií do struktur schopných degradace ECM (Buschman et al., 2009; Clark et al., 2007). Kortaktin se podílí se na regulaci přestavby aktinového cytoskeletu při tvorbě invadopodií. Interaguje s kofilinem, který od něj po fosforylaci kortaktinu disociuje a může tak zahájit vytváření volných konců na aktinových filamentech, k nimž se mohou připojovat nové globulární aktinové monomery pro růst filament (Oser et al., 2009). Bylo však zjištěno, že více než počátečního formování invadopodií se kortaktin účastní maturační fáze, kdy při umlčení exprese kortaktinu dochází ke ztrátě schopnosti invadopodií degradovat ECM. V médiu buněk s umlčenou expresí kortaktinu byla detekována jen velmi slabá exprese sekretovaných MMP-2 a MMP-9, stejně tak výrazně snížená exprese transmembránové

MMP-14 (Clark et al., 2007). Při umlčené expresi Tks4 se sice vytvoří invadopodia, ale nedokážou štěpit ECM kvůli nepřítomnosti MMP-14, což předpovídá funkci Tks4 v rekrutování této proteasy do invadopodií (Buschman et al., 2009).

3.2.2 Reaktivní formy kyslíku jako podpůrná složka invazivity

Reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species), molekuly obsahující kyslíkový radikál, se v buňce vytváří jako vedlejší produkty oxidační fosforylace v mitochondriích nebo v endoplasmatickém retikulu při sbalování proteinů, kdy je pro tvorbu disulfidických vazeb vyžadováno oxidační prostředí (Chen et al., 2003). Dalším zdrojem ROS jsou NADPH-oxidasy buněk imunitního systému využívajících fagocytózu (neutrofilů, makrofágů), kterým ROS slouží jako nástroje k ničení patogenů (shrnutí v DeLeo and Quinn, 1996). Přítomnost ROS je charakteristická také pro nádorové buňky, kde dochází k jejich výrazné produkci při oxidativním stresu, charakterizovaném jako nerovnováha mezi hladinami ROS a antioxidanty, a následně nepříznivě ovlivňují vývoj nádoru (Kumar et al., 2008).

ROS vznikající v nádorech významně přispívají k tvorbě invadopodií, jelikož zvyšují aktivitu Src-kinasy, což vede ke spuštění kaskády dějů, vedoucích k expresi MMP a s nimi související invazivity. Ovlivnění kinasové aktivity se děje prostřednictvím specifické oxidace thiolových skupin dvou cysteinů, která způsobí konformační změnu nutnou k hyperautofosforylaci tyrosinu a tím silnou aktivaci kinasy (Giannoni et al., 2005).

Bylo zjištěno, že tyrosin-kinasový substrát s pěti SH3 doménami (Tks5), důležitý člen vytváření invadopodií, sdílí sekvenční i strukturní podobnost s podjednotkou neutrofilové NADPH oxidasy (p47^{phox}) (Gianni et al., 2009). Diaz a kol. několika experimenty potvrdili, že ROS jsou důležité pro invazivitu a že Tks5 se přímo podílí na generování ROS v nádorech. V buňkách s umlčenou expresí Tks5 pomocí siRNA došlo k významnému poklesu v množství ROS a při inhibici NADPH-oxidasy byla pozorována snížená schopnost buněk degradovat želatinu (Diaz et al., 2009).

Jedna ze studií vlivu ROS na aktivitu MMP-7 předpokládá, že ROS oxidují thiolovou skupinu cysteinu v inhibiční prodoméně zymogenu MMP-7, interagující s atomem zinku v aktivním místě této metaloproteasy. Přerušení této interakce oxidací vede k autoprotolytickému odštěpení prodomény a k aktivaci proteasy (Fu et al., 2001). V buňkách karcinomu prostaty byla prokázána zvýšená produkce ROS související s agresivitou nádoru. Při inhibici NADPH-oxidasy došlo ke snížení množství a aktivity MMP-9 v buňkách a k potlačení invazivity (Kumar et al., 2008). Zdá se, že ROS tedy mohou představovat v nádorech významný prvek v tvorbě invadopodií, aktivaci proteas a v následné invazivitě.

3.3 Proteasy v angiogenezi

Angiogeneze představuje formování nových krevních cév, větvičích se z cév již existujících. Je spojena s fyziologickými procesy v ženském reprodukčním systému (shrnuje v Demir et al., 2010) nebo při hojení ran (shrnuje v Eming et al., 2007). Nicméně do středu zájmu vědeckého bádání se angiogeneze dostala především kvůli její roli v patologických stavech, zvláště pak v nádorových onemocněních. Pevné nádory větší než 2 mm totiž vyžadují ke svému růstu tvorbu nových cév, protože kyslík a živiny se do buněk uvnitř nádoru již nedokáží dostat jen prostou difúzí (Folkman et al., 1971).

Už v roce 1972 Gimbrone a kol. publikovali výsledky experimentu, ve kterém transplantovali nádorové buňky do avaskulární rohovky králíka. Nádorové buňky však iniciovaly růst cév okraje rohovky a to způsobilo růst nádoru. Naopak když bylo fyzicky zabráněno vrůstání cév k transplantátu, růst nádoru byl výrazně potlačen (Gimbrone et al., 1972).

K tomu, aby mohly buňky endotelu migrovat a rozšiřovat krevní řečiště, je potřeba remodelovat extracelulární matrix a vytvořit cestu pro jejich pohyb tkáněmi a novotvorbu cév. Na této činnosti se podílí především MMP, dále pak tzv. ADAM proteasy (z angl. A Disintegrin And Metalloproteinases) a katepsiny (Hiraoka et al., 1998; Trochon et al., 1998; Cavallo-Medved et al., 2009).

3.3.1 Proangiogenní role

Funkce proteas však sahá dál - nejenže degradují extracelulární matrix pro usnadnění migrace endoteliálních buněk, ale samy svou proteolytickou činností přímo iniciují spuštění angiogeneze. Bylo zjištěno, že proteolytickým štěpením MMP-2 kolagenu typu IV se odhalí motiv, jinak skrytý uvnitř helikální struktury kolagenu, který se váže na integriny endoteliálních buněk. Tím spouští angiogenezi a ovlivňuje růst nádoru (Xu et al., 2001).

Existuje mnoho signálních molekul zprostředkovávajících zahájení angiogeneze – vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), transformující růstový faktor- β (TGF- β), TNF- α či angiogeniny. Tyto faktory jsou sekretovány buňkami nádorového prostředí (de Jong et al., 1998; Kishimoto et al., 2005). Některé z těchto faktorů (VEGF, FGF, TGF- β) jsou uloženy a vázány v síti ECM, odkud jsou uvolňovány právě díky proteolytické činnosti proteas (Lee et al., 2005; Yu and Stamenkovic, 2000).

VEGF mezi ostatními faktory vyniká v tom, že specificky stimuluje mitózu právě endoteliálních buněk (Ferrara and Henzel, 1989). Použití specifické protilátky proti VEGF

vedlo k potlačení růstu nádoru v myších, což vypovídá o důležitosti tohoto endoteliálního mitogenu ve vývoji nádoru (Kim et al., 1993). Postupně bylo nalezeno několik isoform VEGF vznikajících alternativním sestříhem mRNA, z nichž isoformy VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ a VEGF₂₀₆ (podle počtu aminokyselin) jsou sekretovány ven z buňky a váží se na složky ECM (Houck et al., 1992; Poltorak et al., 1997). Lee a kol. zkoumali, jestli se MMP podílejí na uvolnění tohoto faktoru ze sítě ECM. Čtyři ze třinácti testovaných MMP (MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-19) vykazovaly schopnost odštěpovat část VEGF obsahující doménu vázající receptor pro VEGF (VEGFR). Všechny štěpené formy VEGF byly schopny zprostředkovat fosforylaci VEGFR a stimulovat tvorbu nových cév v myším modelu (Lee et al., 2005). Proteolytické štěpení sekretovaného neaktivního komplexu TGF- β metaloproteasami MMP-2 a MMP-9, které byly shledány jako možné aktivátory TGF- β , předpokládá jejich účast ve spouštění angiogeneze právě tímto způsobem (Yu and Stamenkovic, 2000).

3.3.2 Protiangiogenní role

Role proteas však není striktně proangiogenní, tedy pouze stimulující progresi nádoru. Proteasy působí také protiangiogenně tím, že generují aktivní formy endogenních inhibitorů angiogeneze. Existuje tedy určitá regulovaná rovnováha mezi proteasami a jejich inhibitory a mezi proteasami a vytvářenými angiogenními inhibitory (Ferreras et al., 2000; Hamano et al., 2003; Lijnen et al., 1998). Mezi inhibitory angiogeneze, u nichž jsou známy konkrétní proteasy jako jejich zdroje, patří např. angiostatin, endostatin či tumstatin.

Angiostatin byl objeven v moči zvířat s nádorem jako 38 kDa velký fragment plasminogenu (prekurzor krevní serinové proteasy plasminu). Experimenty na myších modelech prokázaly, že po aplikaci angiostatinu dochází k výraznému snížení počtu metastáz a k potlačení tvorby nových cév (O'Reilly et al., 1994). Zanedlouho na tento objev navázaly další vědecké skupiny, které určily, jaké proteasy plasminogen štěpí a uvolňují z něj angiostatin. Jednou z nich je makrofágová metaloelastasa MMP-12 (Dong et al., 1997), dále matrilysin (MMP-7), gelatinasa B/koleganasa typu IV (MMP-9) (Patterson and Sang, 1997), stromelysin (MMP-3) (Lijnen et al., 1998), MMP-2 (Moses and O'Reilly, 2003) a poměrně nedávno objevená MMP-19 (Brauer et al., 2011). Kromě metaloproteas se tvorby angiostatinu účastní také katepsin D, sekretovaný buňkami nádoru prostaty (Morikawa et al., 2000). Jako možný mechanismus inhibice angiogeneze se jeví interakce angiostatinu s $\alpha_v\beta_3$ integrinem na povrchu endoteliálních buněk a tím blokace signální kaskády vedoucí k dělení buněk (Tarui et al., 2001). Další možnou cestou je inhibice F₁F₀ ATP-synthasy vazbou angiostatinu (Moser et al., 2001).

Endostatin, 20kDa fragment kolagenu XVIII, byl objeven v buňkách myšího hemangioendoteliomu. Po aplikaci endostatinu myším s vyvinutým nádorem došlo k regresi růstu nádoru (Reilly et al., 1997). Na tvorbě endostatinu se podílí hned několik typů proteas – pankreatická elastasa, katepsiny a z matrixových metaloproteas pak MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13 a MMP-20 (Ferrerias et al., 2000; Heljasvaara et al., 2005). U myši s delecí genu pro MMP-13 byla pozorována korelace s růstem nádoru a počtem metastáz nádoru plic oproti divokému typu (Fukuda et al., 2011). Endostatin se váže na $\alpha_v\beta_5$ integrin, což vyvolá aktivaci Src-kinasy, následně pak narušení fokálních adhezí buněk k matrix a ztrátu aktinových stresových vláken. V důsledku toho buňky nejsou schopné migrovat (Wickström et al., 2002).

Dalším objeveným inhibitelem angiogeneze byl tumstatin, 28kDa fragment kolagenu IV, vykazující schopnost potlačovat neovaskularizaci a růst nádoru prostaty v myších (Maeshima et al., 2000). Tumstatin se váže na endoteliální integrin $\alpha_v\beta_3$, čímž je přerušena fosforylace fokální adhezivní kinasy FAK, která za normálních okolností aktivuje další kinasy (fosfatidylinositol-3-kinasu, protein kinasu B – PKB) a udržuje buňku prostřednictvím této dráhy naživu (Chen and Guan, 1994). Inaktivovaná PKB nemůže následně aktivovat protein zvaný savčí cíl rapamycinu (mTOR, z angl. mammalian target of rapamycin), jehož funkcí je fosforylovat protein vázající eukaryotický iniciační faktor 4E (4E-BP1; z angl. eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1). Nefosforylovaný 4E-BP1 není schopen disociace od eukaryotického iniciačního faktoru 4E, čímž je blokována translace, což vede následně k apoptóze buňky (Maeshima et al., 2002). Na degradaci kolagenu IV a uvolnění tumstatinu se podílí několik metaloproteas, z nichž nejvýrazněji MMP-9. Nádory vyvinuté z buněk karcinomu plic implantovaných do myši s vyřazeným genem pro MMP-9 vykazovaly rychlejší růst ve srovnání s divokým typem myši. Po injikování rekombinantního tumstatinu myším deficientních pro MMP-9 se rychlost růstu snížila na rychlost srovnatelnou v divokých typech (Hamano et al., 2003).

Z uvedených příkladů vyplývá, že role proteas v angiogenezi je spletitá a nelze jednoznačně říct, jestli vývoji nádoru napomáhají nebo jeho progresi prostřednictvím inhibitorů potlačují. Záleží na tom, zda převáží jejich proangiogenní nebo protiangiogenní funkce, a proto se musí k cílení proteas přistupovat se znalostí všech jejich potenciálních rolí. Zkoumání konkrétních inhibitorů, jejichž vznik proteasy umožňují, představuje pro klinické účely další ze způsobů možných terapií.

4 Fibroblastový aktivační protein (FAP)

Fibroblastový aktivační protein (FAP) se dostal téměř okamžitě po svém objevu do středu zájmu vědeckého bádání na poli nádorové terapie. Především proto, že se vyskytuje ve stromálních fibroblastech více než 90 % epiteliálních nádorů (např. karcinom plic, prsu, kolorektální, vaječnicků), zatímco v normálních fibroblastech se neexprimuje (Garin-Chesa et al., 1990). Stejně tak v jiných dospělých tkáních je v přirozeném fyziologickém stavu jeho výskyt prakticky nulový, podle nejnovějších poznatků omezen pouze na α -buňky pankreatu (Busek et al., 2015). Kromě nádorových onemocnění je jeho exprese spojena s patologickými stavy jako cirhóza (FAP byl detekován v jaterních stelárních buňkách pacientů s cirhosou), revmatoidní artritida, zánět a hojení poraněných tkání (Bauer et al., 2006; Garin-Chesa et al., 1990; Levy et al., 1999). Všechna tato onemocnění, v souvislosti se specifickou expresí tohoto proteinu, činí z FAP slibný cíl protinádorové léčby.

4.1 Charakterizace FAP

FAP je serinová proteasa, patřící mezi prolyloligopeptidasy (peptidasová podrodina S9B), společně se svým blízkým homologem dipeptidylpeptidasou IV (DPPIV) (Rawlings et al., 2016).

Byl objeven na přelomu 80. a 90. let nezávisle na sobě dvěma vědeckými skupinami. Jedna z nich charakterizovala FAP jako antigen stromálních fibroblastů, sarkomů a mesenchymální tkáně plodu, na který se vážala protilátka F-19. Později tento antigen nazvali fibroblastový aktivační protein, právě na základě jeho vysoké exprese v nádorových fibroblastech (Rettig et al., 1988). Druhá skupina identifikovala FAP jako membránovou želatinasu v buňkách lidského melanomu, která by mohla být zodpovědná za invazivitu těchto buněk, protože zároveň nebyla nalezena v kontrolní buněčné linii neschopné degradace želatiny. Pro FAP navrhli název seprasa (odvozený ze „surface expressed protease“) (Monksy et al., 1994). Analýzou sekvence bylo následně zjištěno, že FAP a seprasa jsou identické proteiny a sdílí také 52% sekvenční homologii s DPPIV (Piñeiro-Sánchez et al., 1997).

4.1.1 Gen pro FAP a jeho transkripce

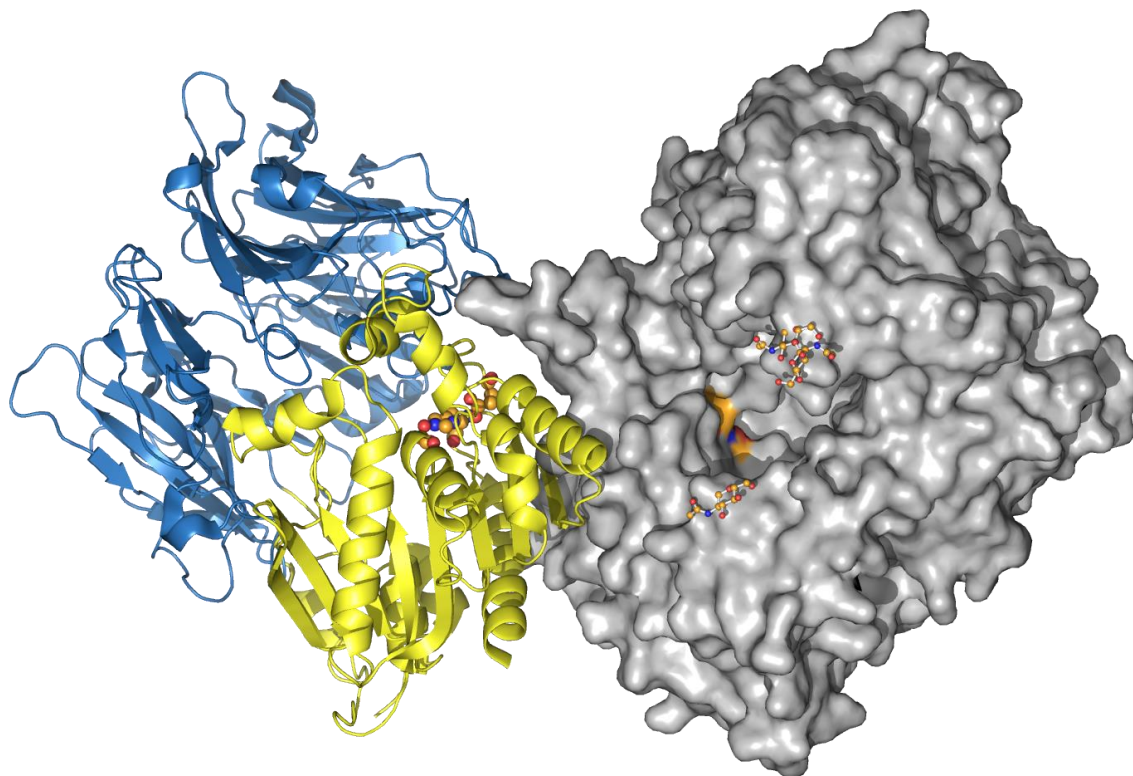
Lidský gen pro FAP se nachází na chromosomu 2, přesná lokalizace je 2q23. Obsahuje 26 exonů a má velikost 73 kb, přičemž některé introny zaujímají více než 14 kb. Svou organizací je lidský gen pro FAP identický s myším genem, který se také nachází na chromosomu 2 a obsahuje 26 exonů se stejně rozmístěnými exon-intronovými rozhraními. Aminokyseliny tvořící katalytickou triádu – serin, aspartát a histidin – jsou podobně jako

u jiných serinových proteas kódovány každá zvlášť jiným exonem (Ser624 exonem 22, Asp702 exonem 24 a His734 exonem 26). Gen pro FAP je mimo myš vysoce konzervovaný napříč několika dalšími organismy. Velmi podobná architektura a lokalizace genu pro FAP a genu pro DPPIV napovídá, že mohly vzniknout duplikací genu jejich předka (Mathew et al., 1995; Niedermeyer et al., 1998).

Nedávno publikovaná studie se věnovala charakterizaci promotoru pro FAP a hledání transkripčního regulátoru. Použitím bioinformatického softwaru byla na základě sekvence promotoru predikována čtyři možná vazebná místa pro transkripční faktory (EGR1, E2F1, Sp1, HOXA4). Mutací těchto oblastí došlo ke snížení promotorové aktivity jen v případě mutace vazebného místa pro faktor časně růstové odpovědi 1 (EGR1; z angl. early growth response protein 1) a stejně tak pouze umlčením exprese EGR1 pomocí siRNA se snížila exprese FAP. Tímto byla otevřena potenciální nová cesta terapie nádorů cílením na transkripční faktor EGR1 (Zhang et al., 2010).

4.1.2 Struktura FAP

FAP je integrální membránový protein typu II, tedy procházející membránou jen jednou a s N-koncem umístěným v cytoplazmě. Pro vznik katalyticky aktivního 170kDa homodimeru je nutná dimerizace dvou 97kDa monomerních podjednotek (Piñeiro-Sánchez et al., 1997). Lidský FAP je tvořen 760 aminokyselinami, z nichž pouze 6 tvoří cytoplasmatickou část, 18 část membránovou a 736 aminokyselin pak objemnou C-terminální extracelulární doménu. Extracelulární doména obsahuje dvě topologicky odlišné domény: doménu připomínající vrtuli (β -propeller) složenou z osmi jednotek tří- nebo čtyřřetězcových β -listů a α/β -hydrolasovou doménu tvořenou většinou paralelními β -listy, které jsou propojeny α -helixy (Obr. 3, str. 14). V α/β -hydrolasové doméně, na rozhraní s doménou připomínající vrtuli se nachází katalytická triáda (Ser624, Asp702, His734), v níž Ser624 definuje FAP jako serinovou proteasu. β -propeller doména zastává funkci selektivního filtru propouštějící substráty do aktivního místa (Aertgeerts et al., 2005). Navíc jedna studie ukázala, že na této doméně se vyskytují epitopy pro T buňky, které se dají využít pro imunoterapii nádorů založené na prolomení imunitní tolerance vůči nádorům (Yi et al., 2011). Vyřešená struktura FAP odhalila pět glykosylačních míst na asparaginových zbytcích 49, 92, 227, 314 a 679. Tři z nich se nachází v β -propeller doméně a dvě jsou lokalizována v α/β -hydrolasové doméně (Aertgeerts et al., 2005).



Obr. 3: Struktura dimerního fibroblastového aktivačního proteinu (FAP) (Aertgeerts et al., 2005). Jeden monomer je zobrazen ve stužkovém modelu s α/β -hydrolasovou doménou (žlutě) a s doménou připomínající vrtuli (β -propeller doménou; modře), druhý monomer pak v modelu zobrazujícím povrch proteinu. Odlišnými barvami je vyznačena katalytická triáda (Ser624, Asp702, His734) a dva viditelné cukerné zbytky. Struktura byla zobrazena pomocí softwaru PyMOL (pdb kód 1Z68).

4.1.3 Enzymová aktivita

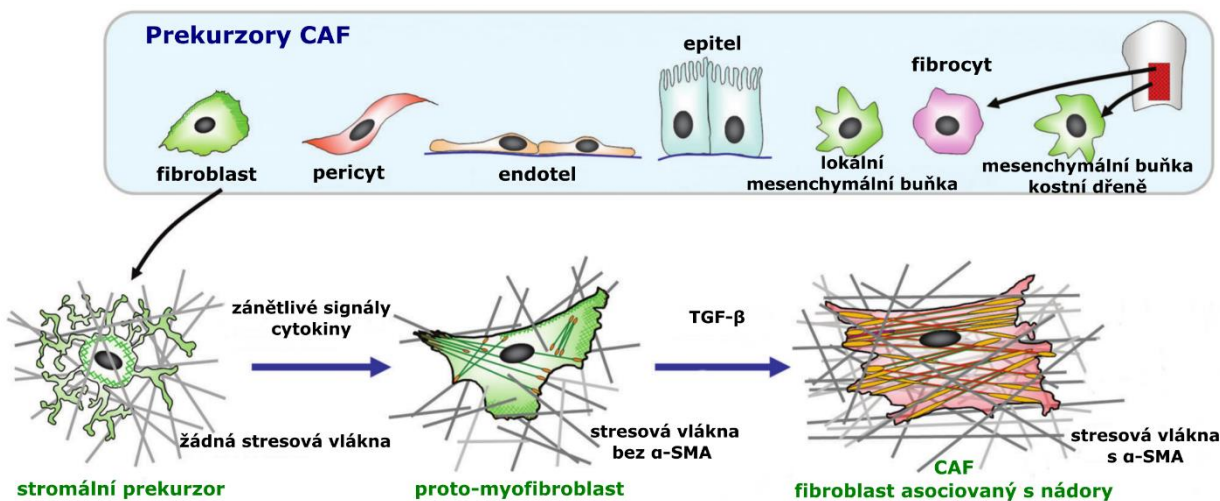
FAP má aminodipeptidasovou aktivitu – štěpením peptidové vazby za prolinem uvolňuje z N-konce proteinů dipeptidy (Park et al., 1999). Reakce je iniciována His734 aktivujícím hydroxylovou skupinu na Ser624, která se chová jako nukleofil a napadá peptidovou vazbu, Asp702 stabilizuje tetrahedrání intermediát, vznikající během reakce (shrnuto v Polgár, 2005). Na základě experimentů se substráty s blokovánými N-konci benzyloxykarbonylovou skupinou byla prokázána i endopeptidasová aktivita FAP, pro kterou je důležitý Ala657. V odpovídající pozici má jeho homolog DPPIV Asp663, který proto endopeptidasovou aktivitu nevykazuje. Nicméně, tato záporně nabitá aminokyselina způsobuje lepší rozeznání volné NH_3^+ skupiny a umožňuje DPPIV efektivnější exopeptidasové štěpení ve srovnání s FAP (Aertgeerts et al., 2005). Endopeptidasová aktivita FAP souvisí s jeho

schopností degradovat některé složky ECM – želatinu (denaturovaný kolagen) a nativní kolagen typu I (Park et al., 1999). Dlouho nebyly známy přirozené substráty pro FAP, až v roce 2011 byla publikována studie, ve které byly představeny první čtyři substráty dipeptidyl-peptidasové aktivity FAP – neuropeptid Y (NPY, neurotransmitter s funkcí ve vazokonstrikci a tvorbě cév), mozkový natriuretický peptid (BNP, hormon s rolí v inhibici jaterní fibrózy), substance P (hormon/neurotransmitter asociovaný se zánětlivými procesy), peptid YY (PYY, hormon regulující glukosovou homeostázu) (Keane et al., 2011). Ze stručné charakterizace přirozených substrátů lze předpovídat, že FAP by mohl být vliv na mnoho fyziologických procesů zahrnujících štěpení hormonů.

V lidské plazmě byla nalezena rozpustná forma FAP, která nese název enzym štěpící antiplasmin (APCE; z angl. antiplasmin-cleaving enzyme). APCE vykazuje stejné enzymatické aktivity jako FAP, k nimž také vyžaduje dimerizaci. Přirozeným substrátem je α_2 -antiplasmin (α_2 AP), inhibitor plasminu štěpícího fibrin. α_2 AP se vyskytuje ve dvou formách – delší forma s methioninem na N-konci (Met- α_2 AP) a kratší s asparaginem na N-konci (Asn- α_2 AP). APCE vytváří štěpením Met- α_2 AP kratší variantu Asn- α_2 AP, která je přibližně desetkrát rychlejší ve vazbě na fibrin a ve výsledku tak účinněji zabraňuje fibrinolýze (Lee et al., 2004, 2006).

4.2 Fibroblasty asociované s nádory

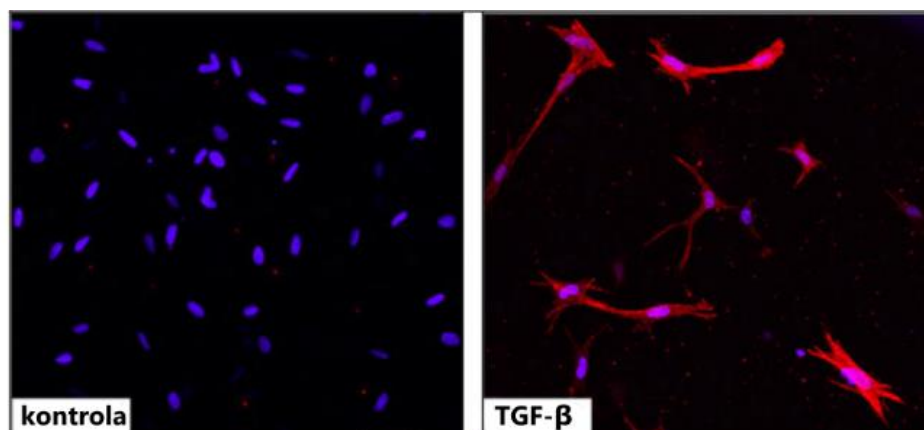
Pro vývoj nádorových onemocnění jsou důležité nejen vlastní nádorové buňky, ale i buňky stromální, přivádějící do nádorového mikroprostředí živiny a kyslík nebo stimulující progresi nádoru pomocí nejrůznějších chemokinů a cytokinů. Mezi stromální buňky se řadí buňky imunitního systému, hladkého svalstva, endoteliální buňky, pericyty a fibroblasty (shrnutí v Spill et al., 2016). FAP je exprimován ve stromálních fibroblastech – v tzv. fibroblastech asociovaných s nádory (CAF; z angl. cancer associated fibroblasts) (Garin-Chesa et al., 1990). Ty mohou vznikat nejen z klasických fibroblastů pojivové tkáně, které jsou za normálních podmínek neaktivní, ale i z mnoha dalších buněčných prekurzorů – z pericytů, buněk hladkého svalstva, mesenchymálních buněk odvozených z kostní dřeně (např. z fibrocytů) nebo takzvaným epiteliálně/endoteliálně-mesenchymálním přechodem (Obr. 4, str. 16) (Direkze et al., 2004; Zeisberg et al., 2007).



Obr. 4: Buněčné prekurzory (fibroblasty, pericyty, endotel, epitel, mesenchymální buňka, fibrocyt, mesenchymální buňka kostní dřevě) a jednotlivá stádia vývoje fibroblastů asociovaných s nádory (CAF). Vznik CAF indukují cytokiny, především TGF- β . Během vývoje dochází k morfologické přestavbě, kterou charakterizují aktinová stresová vlákna s inkorporovaným α -aktinem hladkého svalu (α -SMA; z angl. α -smooth muscle actin). Převzato a upraveno z review Otranto et al., 2012.

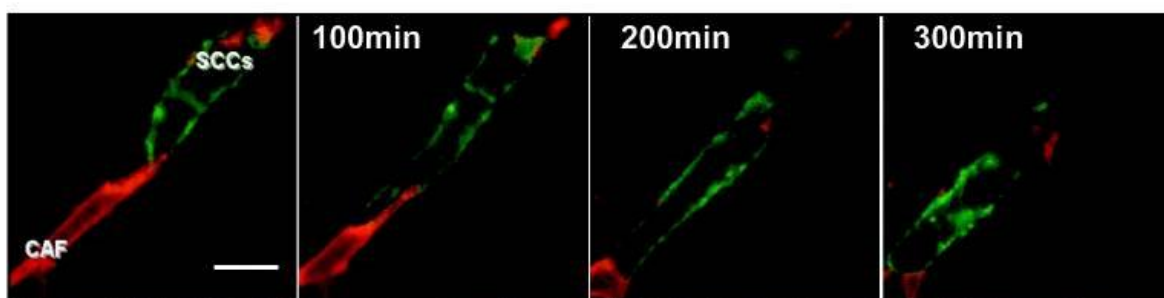
CAF se vyznačují přítomností specifických markerů – FAP, fibroblastový specifický protein (FSP1) a receptor destičkového růstového faktoru α/β (PDGFR α/β ; z angl. platelet-derived growth factor receptor) (Sugimoto et al., 2006).

Při poranění tkáně prozánětlivé buňky imunitního systému produkují růstové faktory, kterými do postiženého místa přilákají fibroblasty a aktivují je. Nádorové buňky umí toto chování napodobit a tím se fibroblasty v prostředí nádoru diferencují do aktivovaných CAF. Bylo zjištěno, že diferenciaci indukuje TGF- β , který také stimuluje fibroblasty k expresi FAP. Diferenciace zahrnuje i morfologickou změnu fibroblastů, kdy dochází ke zvýšené expresi aktinových stresových vláken a α -aktinu hladkého svalu (α -SMA; z angl. α -smooth muscle actin) (Obr. 5, str. 17) a fibroblasty nabývají charakteristického prodlouženého vřetenovitého tvaru. Kontrakce stresových vláken je důležitá pro pohyb buněk (Denys et al., 2008).



Obr. 5: Tvorba aktinových stresových vláken po indukci transformujícím růstovým faktorem β (TGF- β). Buňky (lidské kožní fibroblasty) byly inkubovány s TGF- β (vpravo), kontrolní buňky nebyly vystaveny působení TGF- β (vlevo). Vizualizace konfokálním mikroskopem (jádra buněk obarvena DAPI, aktinová vlákna značena faloidinem konjugovaným s fluorescein isothiokyanátem). Převzato z Denys et al., 2008.

Jedním ze způsobů, jak aktivované fibroblasty ovlivňují progresi nádoru, je produkce stimulačních faktorů. Bylo popsáno, že CAF karcinomu prsu sekretují faktor stromálních buněk (SDF-1; z angl. stromal cell-derived factor 1), který chemotaxí přiláká endoteliální progenitorové buňky do prostředí nádoru, kde diferencují do nádorových endoteliálních buněk a zprostředkovávají angiogenezi. SDF-1 působí navíc i parakrinně přímo na nádorové buňky přes jejich CXC chemokinový receptor typu 4 (CXCR4 receptor) a stimuluje tak růst nádoru (Orimo et al., 2005). Druhý způsob ovlivňování vývoje nádorového onemocnění představuje mechanická remodelace ECM za pomoci proteas degradujících matrix. Fibroblasty si tak vytváří cestu skrz ECM a jsou následovány buňkami nádorovými, které tak mohou migrovat (Obr. 6) (Gaggioli et al., 2007).



Obr. 6: Časoběrné snímání migrace fluorescenčně značených fibroblastů a nádorových buněk pomocí konfokální mikroskopie. Fibroblast asociovaný s rakovinou (CAF, značený červeně) vytváří cestu skrz matrix a je následovaný buňkami karcinomu dlaždicového epitelu (SCC, z angl. squamos cell carcinoma; značený zeleně). Převzato z Gaggioli et al., 2007.

4.3 FAP jako klíčový regulátor invazivity

Role FAP v invazivitě a migraci se stala předmětem zkoumání kvůli schopnosti FAP štěpit kolagen, protože vliv degradace složek ECM jinými proteasami na karcinogenezi byl už znám.

Exprese FAP byla zaznamenána na stromálních fibroblastech karcinomu pankreatu, ale nikoliv na vlastních nádorových epiteliálních buňkách (Lee et al., 2011). Bylo prokázáno, že FAP mění architekturu ECM, která je tak přístupnější invazi nádorových buněk. Touto cestou mohou nádorové buňky interagovat s ECM skrze β_1 -integrinové receptory, které zprostředkovávají důležité signální kaskády pro migraci (Lee et al., 2011). Stejně tak exprese FAP ve stromálních fibroblastech karcinomu žaludku korelovala s invazivitou nádorových buněk. Naopak při inkubaci s fibroblasty transfekovanými siRNA proti FAP došlo k výraznému potlačení invazivity (Wang et al., 2013). Změna organizace ECM, závislá na aktivitě FAP, byla potvrzena i jinou vědeckou skupinou v experimentu, kdy histologické řezy izolované z nádorů myši s delecí genu pro FAP obsahovaly akumulovaná množství neorganizovaného kolagenu (Santos et al., 2009).

Ačkoli ve většině nádorů je FAP přítomen na stromálních fibroblastech, v některých karcinomech byl nalezen i na vlastních nádorových buňkách. Při studiu funkce FAP v karcinomu vaječníků bylo zjištěno, že inkubací nádorových buněk na misce s kolagenem typu I se zvyšuje exprese FAP a jejich schopnost prostupovat gelovou maticí. Tato spojitost s nádorovou invazivitou byla potvrzena i na myším modelu. V myších, kterým byly injikovány tyto nádorové buňky vaječníků s různou expresí FAP, se vyvinuly peritoneální metastázy, jejichž počet závisel na hladině exprese v původních buňkách (Kennedy et al., 2009). Také buňky osteosarkomu s umlčenou expresí FAP měly sníženou schopnost migrace a pohybu *in vitro*, což naznačuje možnou funkci FAP také v progresi nádoru neepiteliálního původu (Ding et al., 2014).

V karcinomu prsu byl FAP shledán jako faktor podporující růst nádoru, pravděpodobně proteolytickým uvolňováním růstových faktorů (Goodman et al., 2003). Zajímavé výsledky přinesla studie zkoumající roli FAP v invazivitě buněk karcinomu prsu, kdy Huang a kol. připravili buněčnou nádorovou linii exprimující proteolyticky neaktivní FAP (mutant S624A), ale přesto pozorovali migraci nádorových buněk. V médiu buněk s aktivním i mutantním FAP zjistili přítomnost MMP-9 (která zároveň nebyla přítomna v médiu buněk neexprimujících FAP), což naznačuje, že FAP by mohl ovlivňovat expresi MMP-9, která je pak zodpovědná za degradaci ECM (Huang et al., 2011b). Hypotéze nahrává i to, že na expresi MMP-9 se podílí

β_1 -integriny, se kterými FAP asociuje. Tato zjištění upozorňují na to, že ačkoliv se FAP vyskytuje především na stromálních buňkách, jeho exprese ve vlastních nádorových buňkách může být spojena s jinou cestou působení na invazi nádoru (Artym et al., 2002; Morini et al., 2000).

Překvapující výsledky ukázala jedna z publikací, když vysoká stromální exprese FAP statisticky korelovala s lepší prognózou a delší dobou dožití pacientek s nádorem prsu (Ariga et al., 2001). Nedávno publikovaná data jinou skupinou, také ohledně karcinomu prsu, prokázala přesný opak, totiž že pacienti s vysokou expresí FAP se dožívali kratší dobu a byly u nich vyvinuty také metastázy v kostech (Jia et al., 2014). Tato skutečnost je v souladu s ostatními studiemi prokazujícími souvislost FAP s růstem a invazí nádoru – např. exprese stromálního FAP v karcinomu tlustého střeva je spojena s rychlou progresí nádoru a kratší dobou života pacientů. Nejvyšší exprese byla přitom zaznamenána v brzkých stádiích nemoci, což poukazuje na důležitou roli FAP hlavně v počátcích vývoje nádoru (Henry et al., 2007).

4.4 FAP jako nádorový supresor?

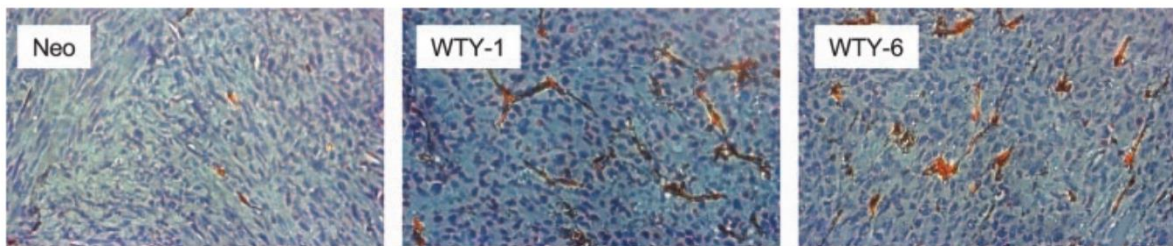
Kromě exprese v nádorových buňkách karcinomu prsu byl FAP objeven i v buněčné linii LOX odvozené z maligního melanomu, která byla schopna degradovat želatinu *in vitro* (v dalších nádorových liniích nebyl FAP přítomen) (Aoyama and Chen, 1990). Pozdější studie jiných buněčných linií však ukázaly, že FAP je exprimován v normálních melanocytech (množství proteinu je závislé na stádiu diferenciaci melanocytů), ale při maligní transformaci je jeho exprese nulová. Tato pozorování předpokládají, že FAP funguje jako nádorový supresor. Po injikování buněk melanomu transfekovaných FAP do myši došlo k potlačení růstu nádoru. V pokusech *in vitro* melanomové buňky transfekované FAP zachovávaly kontaktní inhibici, v buňkách došlo k aktivaci kaspas a následné apoptóze buněk (Ramirez-Montagut et al., 2004).

Bylo také zjištěno, že zvýšená exprese FAP v buňkách karcinomu prsu koreluje se sníženou fosforylací fokální adhezivní kinasy (FAK), která by mohla být způsobena vytvářením komplexu s FAP. To vede ke snížené schopnosti migrace buněk. Další studium signální dráhy FAK ve spojitosti s FAP je tedy žádoucí pro určení, jakým způsobem ji FAP reguluje *in vivo* (Jia et al., 2014). Další předpoklad pro potvrzení účasti FAP v signální dráze s FAK přinesla publikace s pokusy založenými na myším modelu s delecí genu pro FAP. Ukázalo se, že nádory izolované z těchto myši a nádory z divokého typu myši, kterým byl podáván inhibitor pro FAP, vykazovaly zvýšenou fosforylací FAK a s tím související korelující zvýšenou expresí inhibitoru buněčného cyklu p21 (Santos et al., 2009).

4.5 FAP v angiogenezi

Analýzou genové exprese pomocí RT-PCR v endoteliálních buňkách izolovaných z nádorů vaječníků byl FAP objeven jako jeden z markerů, jehož exprese je v nádorovém endotelu mnohem vyšší než v normálních endoteliálních buňkách (Ghilardi et al., 2008). Jednou z cest, kterou by mohl FAP působit na vytváření nových cév v prostředí nádorů, je degradace a reorganizace ECM pro migraci buněk, jak už bylo popsáno výše (kapitola 3.3) (Lee et al., 2011).

O spojitosti FAP s angiogenezí hovoří výsledky experimentů s implantací buněk karcinomu prsu exprimujících FAP do myši. U myši se vyvinuly nádory, které rostly mnohem rychleji a byly výrazně více vaskularizované než nádory odvozené od kontrolních transfektantů (nádorové buňky transfekované prázdným vektorem) (Obr. 7) (Huang et al., 2004).



Obr. 7: Vizualizace cév (hnědé zbarvení) v nádorech pomocí imunohistochemie. Neo – nádory vyvinuté z buněk neexprimujících FAP, WTY-1 a WTY-6 – nádory z myši exprimujících FAP. Cévy byly obarveny protilátkou proti CD34, nádorové buňky hematoxylinem. Převzato z (Huang et al., 2004).

Studie s myšími modely s delecí genu pro FAP a s myšími modely exprimujícími FAP, kterým byl podáván inhibitor FAP, ukázaly, že nepřítomnost této proteasy nebo inhibice její enzymové aktivity vede k potlačení růstu nádoru a vaskularizace (Santos et al., 2009). Korelaci exprese FAP s angiogenezí dokázaly také pokusy s krysami, kterým byly popáleny oči hydroxidem sodným, což indukovalo neovaskularizaci rohovky. Histologické řezy z očí těchto krys a RT-PCR ukázaly, že stroma neovaskularizované tkáně obsahuje myofibroblasty exprimující FAP, který jinak v normální rohovce nebyl detekován (Wang and Shi, 2009).

Další navrhovaný způsob, kterým by FAP mohl regulovat angiogenezi, je prostřednictvím proteolytického štěpení substrátu NPY na jeho formu NPY₃₋₃₆ (Keane et al., 2011). Bylo totiž popsáno, že NPY₃₋₃₆ se váže na Y2 receptory endoteliálních buněk a stimuluje angiogenezi obdobně jako růstové faktory. Stejnou štěpenou formu navíc generuje i DPPIV, která je společně s NPY lokalizována na endoteliálních buňkách (Zukowska-Grojec et al., 1998).

5 Dipeptidylpeptidasa IV (DPPIV)

Dipeptidylpeptidasa IV, jiným názvem CD26 nebo ADA (komplexační protein adenosin deaminasy 2) je serinová exopeptidasa, uvolňující z N-konce proteinů dipeptidy štěpením vazeb za prolinem nebo alaninem (Rawlings et al., 2016). DPPIV je transmembránový glykoprotein typu II s devíti *N*-glykosylačními místy, katalyticky aktivní po dimerizaci dvou 110 kDa velkých monomerních podjednotek (Engel et al., 2003). DPPIV patří do oligopeptidasové podrodiny S9B, společně se svým homologem FAP (Piñeiro-Sánchez et al., 1997). Kromě membránové formy se DPPIV vyskytuje také v rozpustné formě v séru (Durinx et al., 2000). DPPIV je exprimována v gastrointestinálním traktu, ledvinách, pankreatu, placentě, děloze, prostatě, játrech, plicích, slezině, lymfatických uzlinách, mozku a dalších orgánech, dále na povrchu epitelů, endoteliálními buňkami či aktivovanými lymfocyty (Dinjens et al., 1989).

Je známo několik přirozených substrátů DPPIV – NPY, peptid YY, glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1), glukagonu podobný peptid 2 (GLP-2), na glukose závislý insulinotropický peptid (GIP), BNP, substance P či nejrůznější chemokiny (Keane et al., 2011). DPPIV tedy hraje významnou roli v regulaci fyziologických procesů a na základě proteolytické inaktivace GLP a GIP, substrátů důležitých pro glukosovou homeostázu, se inhibice DPPIV stala jednou z možných cest léčby diabetu 2. typu (shrnutí v Irons et al., 2012).

DPPIV vystupuje v mnoha typech nádorového onemocnění jako nádorový supresor – transfekce buněk melanomu DPPIV (normálně neexprimujících tuto proteasu) výrazně snížila schopnost invazivity buněk (Pethiyagoda et al., 2000). Stejně tak v karcinomech vaječníků byla vyšší exprese DPPIV spojena s nižší invazivitou a korelovala také se sníženou expresí některých MMP. Myši, kterým byly injikovány buňky karcinomu vaječníku transfekované DPPIV, měly méně peritoneálních metastáz a přežívaly déle (Kajiyama et al., 2002). Při studiu souvislosti DPPIV s karcinomem prostaty bylo zjištěno, že proteolytickou degradací SDF-1, stimulačního vazbou na receptor CXCR4 progresi nádoru, inhibuje DPPIV tvorbu metastáz (Sun et al., 2008).

Diskusi ohledně supresorové aktivity DPPIV přinesly výsledky studie kolorektálního karcinomu. V jaterních metastázách odvozených od tohoto nádoru byla nalezena buněčná subpopulace exprimující DPPIV podílející se na invazivitě a tvorbě metastáz, jak bylo také otestováno na myším modelu (Pang et al., 2010). V maligním mesoteliomu byla zaznamenána korelace zvýšené exprese DPPIV s invazivitou nádorových buněk, zatímco delece genu pro

DPPIV nebo použití protilátek proti DPPIV způsobily sníženou schopnost invaze a inhibici růstu nádoru, což také staví DPPIV do pozice markeru progresu nádorů (Okamoto et al., 2014).

5.1 Interakce DPPIV s FAP

Bylo popsáno, že DPPIV vytváří komplex s FAP na invazivních endoteliálních buňkách schopných migrace kolagenovou maticí *in vitro*. Konfokální mikroskopií byla potvrzena kolokalizace těchto proteas na strukturách podobným invadopodiím na endoteliálních buňkách a zároveň byla přítomnost komplexu DPPIV-FAP detekována imunohistochemicky na drobných kapilárách karcinomu prsu. V *in vitro* pokusech vedlo použití protilátky proti doméne DPPIV vázající želatínu k potlačení migrace endoteliálních buněk, což napovídá o kooperativě proteas tohoto komplexu při vazbě substrátu a následné proteolytické degradaci (Gherzi et al., 2006).

6 Nádorová terapie

6.1 Terapie pomocí protilátek proti FAP

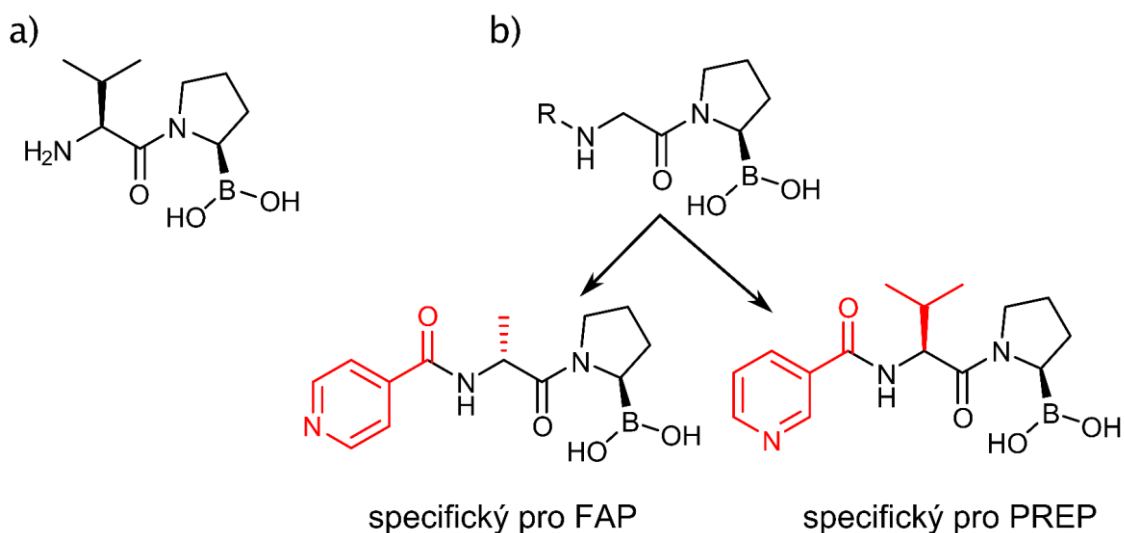
Již v roce 1994 byla testována myší monoklonální protilátka F19 značená jodem (^{131}I -mAbF19) proti lidskému FAP. ^{131}I -mAbF19 byla intravenózně podána pacientům s metastázemi v játrech odvozenými od primárního karcinomu tlustého střeva. Protilátka umožnila specifické cílení a vizualizaci FAP exprimovaného pouze ve fibroblastech nádorového stromatu. Tím byla otevřena cesta pro použití humanizované protilátky v dalších fázích klinické studie (Welt et al., 1994). Humanizovaná protilátka (sibrotuzumab) však skončila v druhé fázi klinického testování. U pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem, na které byla léčba aplikována, nedošlo ani k částečné remisi. Naopak byla pozorována progresse nádoru a u dvou pacientů byly detekovány protilátky vytvořené proti sibrotuzumabu (Hofheinz et al., 2003).

6.2 Terapie pomocí inhibitorů enzymové aktivity FAP

Další z přístupů nádorové terapie představují inhibitory blokující proteolytickou aktivitu FAP. První inhibitor Val-boroPro (PT-100, talabostat; Obr. 8, str. 23), inhibitor interagující svou boronovou skupinou se serinem v aktivním místě FAP, se dostal do druhé fáze klinického testování. Byl testován na pacientech s pokročilým stádiem kolorektálního karcinomu. Aplikace inhibitoru však ukázala jen minimální klinické účinky, pravděpodobně kvůli nízkému podílu inhibovaného FAP, limitovaného dávkou Val-boroPro (při vyšších dávkách projev toxicity). Val-boroPro navíc není selektivní pro FAP a inhibuje i další členy prolyloligopeptidasové rodiny (DPPIV, DPP8, DPP9) (Narra et al., 2007). Talabostat

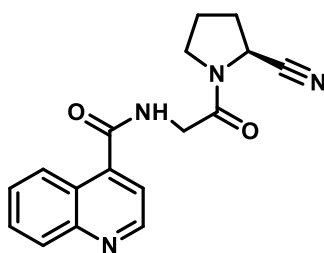
neprokázal pozitivní odpověď ani u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (non-small cell lung cancer), kdy byl podáván společně s docetaxelem (cytostatikum) v naději, že talabostat bude stimulovat imunitní systém a zvýší účinek docetaxelu (Eager et al., 2009).

Z výše uvedeného je zřejmé, že vytvoření selektivního inhibitoru pro FAP bylo velmi žádoucí pro experimentální rozlišení, zda je za potlačení patologických projevů zodpovědná inhibice pouze FAP a nikoliv jiných prolyloligopeptidas. Dalším důvodem bylo také to, že DPPIV se na rozdíl od FAP vyskytuje i ve zdravých tkáních, kde plní fyziologické funkce (Dinjens et al., 1989). Pro návrhy selektivních inhibitorů je důležitá skutečnost, že FAP je díky své endopeptidasové aktivitě schopen štěpit N-blokované substráty, na rozdíl od DPPIV, která tuto schopnost nevykazuje (Aertgeerts et al., 2005). Blokování N-konce však není dostatečné pro selektivitu vůči endopeptidase PREP (prolyloligopeptidasa patřící do podrodiny S9A; Rawlings et al., 2016) (Poplawski et al., 2013). Později bylo zjištěno, že selektivita inhibitorů závisí na aminokyselině v pozici P₂ ve struktuře inhibitoru. Tak byl vytvořen selektivní inhibitor pro FAP, který je založen na pyridinu na N-konci inhibitoru a alaninu v pozici P₂ (Obr. 8) (Poplawski et al., 2013).



Obr. 8: a) Struktura inhibitoru Val-boroPro (talabostat). b) Struktury inhibitorů specifických pro FAP/PREP, odvozené od základní struktury Gly-boroPro (nahore). Pyridin na N-konci inhibitoru zajišťuje selektivitu vůči DPPIV, pozice P₂ u inhibitoru pak způsobuje rozlišení mezi specifitou inhibitoru pro FAP (alanin) a PREP (valin).

Ve stejném roce byl publikován další selektivní inhibitor pro FAP obsahující chinolin a nitrilovou skupinu namísto boronové kyseliny, taktéž interagující se serinem v aktivním místě FAP (Obr. 9, str. 24) (Jansen et al., 2013).



Obr. 9: Struktura selektivního inhibitoru pro FAP s nitrilovou skupinou. Selektivitu zajišťuje chinolin na N-konci.

6.3 Cílené doručování léčiv pomocí FAP

Při doručování léčiv (nejčastěji různých cytostatik) do nádorů se cílí na proteiny specifické pro dané nádory, ve snaze minimalizovat vedlejší účinky na ostatní zdravé tkáně v těle. FAP se díky své expresi v mnoha epitelálních nádorech stal slibným kandidátem pro terapii tohoto druhu (Garin-Chesa et al., 1990).

Po neúspěchu protilátek v klinických studiích přinesl novou naději konjugát protilátky s cytotoxickým mitotickým inhibitorem maytansinoidem DM1 (konjugát FAP5-DM1). Ostermann a kol. pozorovali, že protilátka má schopnost internalizovat do buňky, proto se jí rozhodli modifikovat a použít pro cílení na xenografty lidských nádorů (slinivky, plic, kolorektální, hlavy a krku) v imunodeficientních myších. Konjugát FAP5-DM1 způsobil dlouhodobou inhibici růstu nádoru ve všech uvedených případech kromě kolorektálního karcinomu, což z FAP5-DMP1 udělalo slibný léčebný terapeutický prostředek vhodný k dalšímu testování (Ostermann et al., 2008). Huang a kol. vytvořili konjugát substrátu Z-Gly-Pro a cytotoxického doxorubicinu pro cílené štěpení FAP a uvolnění doxorubicinu v prostředí nádoru. Ve srovnání s volným doxorubicinem konjugát způsobil snížení rychlosti růstu nádoru v myších bez signifikantních toxických účinků na jiné orgány (především na srdce) a bez ztráty hmotnosti myší (Huang et al., 2011a).

Novým přístupem k doručování léčiv s využitím cílení FAP se staly také nanočástice. Nanočástice z amfifilních peptidů (CAP; z angl. cleavable amphiphilic peptide) mají schopnost se samy složit poté, co dojde k enkapsulaci hydrofobního léčiva. V nádorovém stromatu jsou pak částice rozštěpeny FAP, protože peptidy obsahují štěpitelnou sekvenci specifickou pro FAP. Nanočástice naplněné doxorubicinem dokázaly v myších modelech karcinomu prostaty (s ko-implantovanými CAF) výrazně inhibovat růst nádoru bez vedlejších účinků. Stejný efekt byl pozorován i v případě xenograftů karcinomu slinivky a prsu pomocí nanočástic naplněných cytostatiky paclitaxelem nebo irinotecanem. Nanočástice jsou tedy nadějným nástrojem pro cílenou léčbu širokého spektra karcinomů s expresí FAP (Ji et al., 2016).

7 Závěr

Role proteas v nádorech představuje široký záběr vědeckého zkoumání na poli nádorové biologie. Na jednu stranu mají proteasy jako matrixové metaloproteasy, katepsiny nebo serinové proteasy jasnou funkci v invazivitě nádorů díky proteolytické degradaci složek extracelulární matrix (ECM). Stejně tak proteolytickou aktivitou ovlivňují vytváření nových cév nutných pro růst nádoru, kdy odštěpují důležité růstové faktory uložené v síti ECM, které následně vazbou na příslušné receptory aktivují signální dráhy vedoucí k dělení buněk – např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) stimulující proliferaci právě endoteliálních buněk. Na druhou stranu působí proteasy také jako enzymy potlačující růst nádoru, protože se podílí na vytváření inhibitorů angiogeneze – angiostatinu, endostatinu a tumstatinu, odvozených od proteinových složek ECM. Proteasy se sdružují ve strukturách zvaných invadopodia, která jsou charakteristická pro migrující nádorové buňky, nebo jsou z nich přímo sekretována do ECM. Bylo zjištěno, že aktivitu proteas a také tvorbu invadopodií stimulují reaktivní formy kyslíku, produkující se ve vysoké míře v nádorech.

Fibroblastový aktivační protein (FAP) exprimovaný ve více než 90 % epiteliálních nádorů je specifickým markerem fibroblastů asociovaných s nádory, ale byl detekován také v membránách vlastních nádorových buněk. V *in vitro* experimentech s buňkami nebo fibroblasty karcinomu pankreatu, žaludku či vaječnicků byla zaznamenána korelace míry exprese FAP se schopností buněk prostupovat kolagenovou maticí. V myším modelu karcinomu vaječnicku byla míra exprese spojena s počtem vyvinutých metastáz. FAP byl popsán v myších modelech i jako možný regulátor angiogeneze ovlivňující tvorbu nových cév a tím růst nádorů. S touto skutečností by mohl souviset i nově objevený fyziologický substrát pro FAP – neuropeptid Y, jehož štěpená forma indukuje dělení endoteliálních buněk.

Díky své roli v progresi nádoru FAP představuje zajímavý terapeutický cíl. Po neúspěchu humanizované protilátky proti FAP v klinických studiích byl směr protinádorové léčby zaměřen na vývoj inhibitorů, selektivně inhibujících aktivitu FAP a nikoliv jiné proteasy prolyloligopeptidasové rodiny, protože ty jsou na rozdíl od FAP exprimovány i ve zdravých tkáních, kde plní nejrůznější fyziologické funkce. Poté, co byla potvrzena internalizace FAP indukovaná vazbou protilátky, byly v myších modelech testovány její konjugáty s cytotoxickými molekulami. Ty se společně s nově vyvinutými nanočásticemi obsahujícími cytotoxické látky staly slibnými prostředky pro cílené doručování léčiv do nádorů exprimujících FAP. Z výše uvedeného plyne, že cílení na FAP a vývoj specifických inhibitorů má potenciál v léčbě nádorových onemocnění.

8 Použitá literatura

- Aertgeerts, K., Levin, I., Shi, L., Snell, G.P., Jennings, A., Prasad, G.S., Zhang, Y., Kraus, M.L., Salakian, S., Sridhar, V., et al. (2005). Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J. Biol. Chem.* 280, 19441–19444.
- Aoyama, A., and Chen, W.T. (1990). A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8296–8300.
- Ariga, N., Sato, E., Ohuchi, N., Nagura, H., and Ohtani, H. (2001). Stromal expression of fibroblast activation protein/seprase, a cell membrane serine proteinase and gelatinase, is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast. *Int. J. Cancer* 95, 67–72.
- Artym, V.V., Kindzelskii, A.L., Chen, W.-T., and Petty, H.R. (2002). Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. *Carcinogenesis* 23, 1593–1601.
- Banner, D.W., D’Arcy, A., Chène, C., Winkler, F.K., Guha, A., Konigsberg, W.H., Nemerson, Y., and Kirchhofer, D. (1996). The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380, 41–46.
- Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699–704.
- Bauer, S., Jendro, M.C., Wadle, A., Kleber, S., Stenner, F., Dinser, R., Reich, A., Faccin, E., Gödde, S., Dinges, H., et al. (2006). Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.* 8, R171.
- Bertenshaw, G.P., Norcum, M.T., and Bond, J.S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* 278, 2522–2532.
- Bode, W., and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 241–252.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801.
- Brauer, R., Beck, I.M., Roderfeld, M., Roeb, E., and Sedlacek, R. (2011). Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. *BMC Biochemistry* 12, 38.
- Buck, M.R., Karustis, D.G., Day, N.A., Honn, K.V., and Sloane, B.F. (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem. J.* 282, 273–278.
- Burrage, P.S., Mix, K.S., and Brinckerhoff, C.E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.* 11, 529–543.
- Buschman, M.D., Bromann, P.A., Cejudo-Martin, P., Wen, F., Pass, I., and Courtneidge, S.A. (2009). The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol. Biol. Cell* 20, 1302–1311.
- Busek, P., Hrabal, P., Fric, P., and Sedo, A. (2015). Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets. *Histochem. Cell Biol.* 143, 497–504.
- Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogoyo, M., Caglic, D., and Sloane, B.F. (2009). Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Experimental Cell Research* 315, 1234–1246.

- Chen, W.T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* *251*, 167–185.
- Chen, H., and Guan, J. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 10148–10152.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* *278*, 36027–36031.
- Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res.* *67*, 4227–4235.
- DeLeo, F.R., and Quinn, M.T. (1996). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol.* *60*, 677–691.
- Demir, R., Yaba, A., and Huppertz, B. (2010). Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochemica* *112*, 203–214.
- Denys, H., Derycke, L., Hendrix, A., Westbroek, W., Gheldof, A., Narine, K., Pauwels, P., Gespach, C., Bracke, M., and De Wever, O. (2008). Differential impact of TGF-beta and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion. *Cancer Lett.* *266*, 263–274.
- Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., and Courtneidge, S.A. (2009). Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci. Signal.* *2*, ra53.
- Ding, L., Ye, L., Xu, J., and Jiang, W.G. (2014). Impact of fibroblast activation protein on osteosarcoma cell lines in vitro. *Oncol Lett* *7*, 699–704.
- Dinjens, W.N., ten Kate, J., van der Linden, E.P., Wijnen, J.T., Khan, P.M., and Bosman, F.T. (1989). Distribution of adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* *37*, 1869–1875.
- Direkze, N.C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulson, R., Oukrif, D., Alison, M.R., and Wright, N.A. (2004). Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* *64*, 8492–8495.
- Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., and Fidler, I.J. (1997). Macrophage-Derived Metalloelastase Is Responsible for the Generation of Angiostatin in Lewis Lung Carcinoma. *88*, 801–810.
- Durinx, C., Lambeir, A.M., Bosmans, E., Falmagne, J.B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpé, S., and De Meester, I. (2000). Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur. J. Biochem.* *267*, 5608–5613.
- Eager, R.M., Cunningham, C.C., Senzer, N., Richards, D.A., Raju, R.N., Jones, B., Uprichard, M., and Nemunaitis, J. (2009). Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* *21*, 464–472.
- Eming, S.A., Brachvogel, B., Odorisio, T., and Koch, M. (2007). Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog. Histochem. Cytochem.* *42*, 115–170.
- Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H.-U., and Brandstetter, H. (2003). The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 5063–5068.
- Erez, E., Fass, D., and Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* *459*, 371–378.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *161*, 851–858.

- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., and Delaissé, J. (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* *486*, 247–251.
- Fischer, A. (1946). Mechanism of the proteolytic activity of malignant tissue cells. *Nature* *157*, 442.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* *133*, 275–288.
- Fortelny, N., Cox, J.H., Kappelhoff, R., Starr, A.E., Lange, P.F., Pavlidis, P., and Overall, C.M. (2014). Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol.* *12*, e1001869.
- Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C., and Heinecke, J.W. (2001). Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* *276*, 41279–41287.
- Fukuda, H., Mochizuki, S., Abe, H., Okano, H.J., Hara-Miyauchi, C., Okano, H., Yamaguchi, N., Nakayama, M., D'Armiento, J., and Okada, Y. (2011). Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production. *Br. J. Cancer* *105*, 1615–1624.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1392–1400.
- Galloway, W.A., Murphy, G., Sandy, J.D., Gavrilovic, J., Cawston, T.E., and Reynolds, J.J. (1983). Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components. *Biochem. J.* *209*, 741–752.
- Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1990). Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 7235–7239.
- Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., and Chen, W.-T. (2006). The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res.* *66*, 4652–4661.
- Ghilardi, C., Chiorino, G., Dossi, R., Nagy, Z., Giavazzi, R., and Bani, M. (2008). Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. *BMC Genomics* *9*, 201.
- Gianni, D., Diaz, B., Taulet, N., Fowler, B., Courtneidge, S.A., and Bokoch, G.M. (2009). Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity. *Sci. Signal.* *2*, ra54.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G., and Chiarugi, P. (2005). Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6391–6403.
- Gimbrone, M.A., Leapman, S.B., Cotran, R.S., and Folkman, J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* *136*, 261–276.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* *20*, 543–556.
- Goodman, J.D., Rozypal, T.L., and Kelly, T. (2003). Seprase, a membrane-bound protease, alleviates the serum growth requirement of human breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* *20*, 459–470.
- Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A., and Kalluri, R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha V\beta 3$ integrin. *Cancer Cell* *3*, 589–601.
- Heljasvaara, R., Nyberg, P., Luostarinen, J., Parikka, M., Heikkilä, P., Rehn, M., Sorsa, T., Salo, T., and Pihlajaniemi, T. (2005). Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteinases. *Exp. Cell Res.* *307*, 292–304.

- Henry, L.R., Lee, H.-O., Lee, J.S., Klein-Szanto, A., Watts, P., Ross, E.A., Chen, W.-T., and Cheng, J.D. (2007). Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1736–1741.
- Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I.J., Gyetko, M.R., and Weiss, S.J. (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* *95*, 365–377.
- Hofheinz, R.-D., al-Batran, S.-E., Hartmann, F., Hartung, G., Jäger, D., Renner, C., Tanswell, P., Kunz, U., Amelsberg, A., Kuthan, H., et al. (2003). Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* *26*, 44–48.
- Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* *267*, 26031–26037.
- Huang, S., Fang, R., Xu, J., Qiu, S., Zhang, H., Du, J., and Cai, S. (2011a). Evaluation of the tumor targeting of a FAP α -based doxorubicin prodrug. *J Drug Target* *19*, 487–496.
- Huang, Y., Wang, S., and Kelly, T. (2004). Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Res.* *64*, 2712–2716.
- Huang, Y., Simms, A.E., Mazur, A., Wang, S., León, N.R., Jones, B., Aziz, N., and Kelly, T. (2011b). Fibroblast activation protein- α promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions. *Clin. Exp. Metastasis* *28*, 567–579.
- Huber, K.L., Ghosh, S., and Hardy, J.A. (2012). Inhibition of caspase-9 by stabilized peptides targeting the dimerization interface. *Biopolymers* *98*, 451–465.
- Hutchinson, J.W., Tierney, G.M., Parsons, S.L., and Davis, T.R. (1998). Dupuytren's disease and frozen shoulder induced by treatment with a matrix metalloproteinase inhibitor. *J. Bone Joint Surg. Br.* *80*, 907–908.
- Inoue, K., Slaton, J.W., Perrotte, P., Eve, B.Y., and Dinney, C.P.N. (1999). Interleukin-8 (IL-8) Expression Regulates Tumorigenicity and Metastasis in Human Bladder Cancer. *The Journal of Urology* *180*, 120.
- Irons, B.K., Weis, J.M., Stapleton, M.R., and Edwards, K.L. (2012). An update in incretin-based therapy: a focus on dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Curr. Diabetes Rev.* *8*, 169–182.
- Jansen, K., Heirbaut, L., Cheng, J.D., Joossens, J., Ryabtsova, O., Cos, P., Maes, L., Lambeir, A.-M., De Meester, I., Augustyns, K., et al. (2013). Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* *4*, 491–496.
- Ji, T., Zhao, Y., Ding, Y., Wang, J., Zhao, R., Lang, J., Qin, H., Liu, X., Shi, J., Tao, N., et al. (2016). Transformable peptide nanocarriers for expeditious drug release and effective cancer therapy via cancer-associated fibroblast activation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *55*, 1050–1055.
- Jia, J., Martin, T.A., Ye, L., and Jiang, W.G. (2014). FAP- α (Fibroblast activation protein- α) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway. *BMC Cell Biol.* *15*, 16.
- de Jong, J.S., van Diest, P.J., van der Valk, P., and Baak, J.P.A. (1998). Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J. Pathol.* *184*, 53–57.
- Kajiyama, H., Kikkawa, F., Suzuki, T., Shibata, K., Ino, K., and Mizutani, S. (2002). Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* *62*, 2753–2757.
- Keane, F.M., Nadvi, N.A., Yao, T.-W., and Gorrell, M.D. (2011). Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- α . *FEBS J.* *278*, 1316–1332.

- Kennedy, A., Dong, H., Chen, D., and Chen, W.-T. (2009). Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells. *Int. J. Cancer* *124*, 27–35.
- Khan, A.R., and James, M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* *7*, 815–836.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* *362*, 841–844.
- Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K.A., and Hu, G. (2005). Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* *24*, 445–456.
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R.B., and Koul, H.K. (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res.* *68*, 1777–1785.
- Lee, H.-O., Mullins, S.R., Franco-Barraza, J., Valianou, M., Cukierman, E., and Cheng, J.D. (2011). FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* *11*, 245.
- Lee, K.N., Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Chung, K.H., and McKee, P.A. (2004). A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood* *103*, 3783–3788.
- Lee, K.N., Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Lee, C.S., Chun, J.-G., and McKee, P.A. (2006). Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* *107*, 1397–1404.
- Lee, S., Jilani, S.M., Nikolova, G.V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M.L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* *169*, 681–691.
- Leonhard, K., Guiard, B., Pellecchia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W., and Langer, T. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell* *5*, 629–638.
- Levy, M.T., McCaughan, G.W., Abbott, C.A., Park, J.E., Cunningham, A.M., Müller, E., Rettig, W.J., and Gorrell, M.D. (1999). Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* *29*, 1768–1778.
- Lijnen, H.R., Ugwu, F., Bini, A., and Collen, D. (1998). Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* *37*, 4699–4702.
- López-Otín, C., and Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* *283*, 30433–30437.
- Maeshima, Y., Colorado, P.C., Torre, A., Holthaus, K.A., Grunkemeyer, J.A., Ericksen, M.B., Hopfer, H., Xiao, Y., Stillman, I.E., and Kalluri, R. (2000). Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J. Biol. Chem.* *275*, 21340–21348.
- Maeshima, Y., Sudhakar, A., Lively, J.C., Ueki, K., Kharbanda, S., Kahn, C.R., Sonenberg, N., Hynes, R.O., and Kalluri, R. (2002). Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science* *295*, 140–144.
- Mason, S.D., and Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends in Cell Biol.* *21*, 228–237.
- Mathew, S., Scanlan, M.J., Mohan Raj, B.K., Murty, V.V., Garin-Chesa, P., Old, L.J., Rettig, W.J., and Chaganti, R.S. (1995). The gene for fibroblast activation protein alpha (FAP), a putative cell surface-bound serine protease expressed in cancer stroma and wound healing, maps to chromosome band 2q23. *Genomics* *25*, 335–337.
- Mian, B.M., Dinney, C.P.N., Bermejo, C.E., Sweeney, P., Tellez, C., Yang, X.D., Gudas, J.M., and Mcconkey, D.J. (2003). Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteinases and nuclear factor- κ B. *Clin. Cancer Res.* *9*, 3167–3175.

- Monsky, W.L., Lin, C.Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S.K., Mueller, S.C., and Chen, W.T. (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 54, 5702–5710.
- Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S., and Kuwano, M. (2000). Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 38912–38920.
- Morini, M., Mottolose, M., Ferrari, N., Ghiorzo, F., Buglioni, S., Mortarini, R., Noonan, D.M., Natali, P.G., and Albini, A. (2000). The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int. J. Cancer* 87, 336–342.
- Moser, T.L., Kenan, D.J., Ashley, T.A., Roy, J.A., Goodman, M.D., Misra, U.K., Cheek, D.J., and Pizzo, S.V. (2001). Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6656–6661.
- Moses, M.A., and O'Reilly, M.S. (2003). Regulation of angiostatin mobilization by tumor-derived matrix metalloproteinase-2. *Methods Mol. Med.* 74, 375–390.
- Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 413–426.
- Narra, K., Mullins, S.R., Lee, H.-O., Strzemkowski-Brun, B., Magalong, K., Christiansen, V.J., McKee, P.A., Egleston, B., Cohen, S.J., Weiner, L.M., et al. (2007). Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1691–1699.
- Navia, M.A., Fitzgerald, P.M., McKeever, B.M., Leu, C.T., Heimbach, J.C., Herber, W.K., Sigal, I.S., Darke, P.L., and Springer, J.P. (1989). Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* 337, 615–620.
- Niedermeyer, J., Enenkel, B., Park, J.E., Lenter, M., Rettig, W.J., Damm, K., and Schnapp, A. (1998). Mouse fibroblast-activation protein--conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur. J. Biochem.* 254, 650–654.
- Noskova, V., Ahmadi, S., Asander, E., and Casslén, B. (2009). Ovarian cancer cells stimulate uPA gene expression in fibroblastic stromal cells via multiple paracrine and autocrine mechanisms. *Gynecol. Oncol.* 115, 121–126.
- Okamoto, T., Iwata, S., Yamazaki, H., Hatano, R., Komiya, E., Dang, N.H., Ohnuma, K., and Morimoto, C. (2014). CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells. *PLoS ONE* 9, e86671.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315–328.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J. Cell Biol.* 186, 571–587.
- Ostermann, E., Garin-Chesa, P., Heider, K.H., Kalat, M., Lamche, H., Puri, C., Kerjaschki, D., Rettig, W.J., and Adolf, G.R. (2008). Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. *Clin. Cancer Res.* 14, 4584–4592.
- Otranto, M., Sarrazy, V., Bonté, F., Hinz, B., Gabbiani, G., and Desmoulière, A. (2012). The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh. Migr.* 6, 203–219.

- Owen, C.A., Campbell, M.A., Sannes, P.L., Boukedes, S.S., and Campbell, E.J. (1995). Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J. Cell Biol.* *131*, 775–789.
- Pang, R., Law, W.L., Chu, A.C.Y., Poon, J.T., Lam, C.S.C., Chow, A.K.M., Ng, L., Cheung, L.W.H., Lan, X.R., Lan, H.Y., et al. (2010). A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* *6*, 603–615.
- Park, J.E., Lenter, M.C., Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *274*, 36505–36512.
- Patterson, B.C., and Sang, Q.A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* *272*, 28823–28825.
- Pethiyagoda, C.L., Welch, D.R., and Fleming, T.P. (2000). Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* *18*, 391–400.
- Piñeiro-Sánchez, M.L., Goldstein, L.A., Dodt, J., Howard, L., Yeh, Y., Tran, H., Argraves, W.S., and Chen, W.T. (1997). Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J. Biol. Chem.* *272*, 7595–7601.
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 2161–2172.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., Keshet, E., and Neufeld, G. (1997). VEGF 145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* *272*, 7151–7158.
- Poplawski, S.E., Lai, J.H., Li, Y., Jin, Z., Liu, Y., Wu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Sudmeier, J.L., Sanford, D.G., et al. (2013). Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase. *J. Med. Chem.* *56*, 3467–3477.
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., and López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 544–558.
- Ramirez-Montagut, T., Blachere, N.E., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Rettig, W.J., Garin-Chesa, P., and Houghton, A.N. (2004). FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene* *23*, 5435–5446.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* *38*, D227–D233.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* *44*, D343–D350.
- Reilly, M.S.O., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* *88*, 277–285.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C., and Salvesen, G.S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 14250–14255.
- Rettig, W.J., Garin-Chesa, P., Beresford, H.R., Oettgen, H.F., Melamed, M.R., and Old, L.J. (1988). Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 3110–3114.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 363–397.
- Santos, A.M., Jung, J., Aziz, N., Kissil, J.L., and Puré, E. (2009). Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3613–3625.
- Schick, C., Pemberton, P.A., Shi, G.P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A.J., Gornstein, E.R., Brömme, D., Chapman, H.A., and Silverman, G.A. (1998). Cross-class inhibition of the cysteine

- proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 37, 5258–5266.
- Spill, F., Reynolds, D.S., Kamm, R.D., and Zaman, M.H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 40, 41–48.
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1640–1646.
- Sun, Y.-X., Pedersen, E.A., Shiozawa, Y., Havens, A.M., Jung, Y., Wang, J., Pienta, K.J., and Taichman, R.S. (2008). CD26/dipeptidyl peptidase IV regulates prostate cancer metastasis by degrading SDF-1/CXCL12. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 765–776.
- Tarui, T., Miles, L.A., and Takada, Y. (2001). Specific Interaction of Angiostatin with Integrin $\alpha\beta 3$ in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 39562–39568.
- Trochon, V., Li, H., Vasse, M., Frankenre, F., Thomaidis, A., Soria, J., Lu, H., Gardner, C., and Soria, C. (1998). Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 2, 277–285.
- Veillat, V., Spuul, P., Daubon, T., Egaña, I., Kramer, Ij., and Génot, E. (2015). Podosomes: Multipurpose organelles? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65, 52–60.
- Wang, T., and Shi, W. (2009). Expression of fibroblast activation proteins in corneal stromal neovascularization. *Curr. Eye Res.* 34, 112–117.
- Wang, R.-F., Zhang, L.-H., Shan, L.-H., Sun, W.-G., Chai, C.-C., Wu, H.-M., Ibla, J.C., Wang, L.-F., and Liu, J.-R. (2013). Effects of the fibroblast activation protein on the invasion and migration of gastric cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 95, 350–356.
- Welt, S., Divgi, C.R., Scott, A.M., Garin-Chesa, P., Finn, R.D., Graham, M., Carswell, E.A., Cohen, A., Larson, S.M., and Old, L.J. (1994). Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts. *J. Clin. Oncol.* 12, 1193–1203.
- Wickström, S.A., Alitalo, K., and Keski-Oja, J. (2002). Endostatin associates with integrin $\alpha 5\beta 1$ and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res.* 62, 5580–5589.
- Xu, J., Rodriguez, D., Petitclerc, E., Kim, J.J., Hangai, M., Moon, Y.S., Davis, G.E., Brooks, P.C., and Yuen, S.M. (2001). Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J. Cell Biol.* 154, 1069–1079.
- Yakovlev, A.G., Ota, K., Wang, G., Movsesyan, V., Bao, W.L., Yoshihara, K., and Faden, A.I. (2001). Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 21, 7439–7446.
- Yi, Y.-M., Zhang, G., Zeng, J., Huang, S.-C., Li, L.-L., Fang, R., Jiang, G.-M., Bu, X.-Z., Cai, S.-H., and Du, J. (2011). A new tumor vaccine: FAP τ -MT elicits effective antitumor response by targeting indolamine2,3-dioxygenase in antigen presenting cells. *Cancer Biol. Ther.* 11, 866–873.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 163–176.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67, 10123–10128.
- Zhang, J., Valianou, M., and Cheng, J.D. (2010). Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein. *Front Biosci (Elite Ed)* 2, 1154–1163.
- Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska-Prokopczuk, E., Rose, W., Rone, J., Movafagh, S., Ji, H., Yeh, Y., Chen, W.T., Kleinman, H.K., Grouzmann, E., et al. (1998). Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ. Res.* 83, 187–195.