

α_2 -Macroglobulina, INHIBIDOR DE PROTEINASAS ALTAMENTE SOFISTICADO

Barrera V D.I , Arbeláez Ramírez L.F
Grupo de Investigación en Biomoléculas
Universidad de Pamplona
luifer@unipamplona.edu.co

Recibido Mayo 03 de 2006

Aceptado Junio 12 de 2006

RESUMEN

A la superfamilia de las α -macroglobulinas pertenece la α_2 -Macroglobulina y la PZP, las cuales conforman el subgrupo de las α -macroglobulinas. Los componentes del complemento C-3, C-4 y C-5 hacen parte de esta superfamilia y conforman el subgrupo del complemento. Esta superfamilia tiene en común varios dominios como: el tiolester y el Terminal-C, con la excepción del C-5, el cual carece de este dominio. Todos estos dominios juegan un papel fisiológico muy importante, el tiolester como inhibidor de las proteinasas, uniéndolas de forma covalente al tiolester, la región cebadora que es hidrolizada por las proteínas, induciendo cambios conformacionales en la molécula y finalmente el Terminal-C que contribuye con la eliminación de los complejos de la circulación, uniéndose al receptor LRP/ α_2 -Macroglobulinas en la superficie de las células reticuloendoteliales. Este trabajo está basado en la α_2 -Macroglobulinas como una de las proteínas de esta superfamilia mas estudiada y además se le ha encontrado involucrada en muchas patologías como Alzheimer, Esclerosis múltiple, problemas de coagulación y fibrinólisis.

PALABRAS CLAVES

Región cebadora, cambios conformacionales, estructura, tiolester, dominio de unión al receptor.

ABSTRACT

α_2 -Macroglobulins belongs to the super family and PZP that is part of the sub-group of the α_2 -Macroglobulins. The complement C-3, C-4 and C-5 make up the sub-group of the complement and new protein CD 109. This super family has several domains in common as Thiolester and the terminal-C except for C-5 that is lacking in the thiolester group. All of these groups play an important physiological role as inhibitors of proteinases by binding them covalently; the bait region is hydrolyzed by proteinases inducing changes in the conformation of the molecules and finally, terminal-C is exposed at the surface of the protein and contributes to the elimination of the complexes in circulation by binding them to the receptor LRP/ α_2 -Macroglobulin at the surface of the reticuloendothelial cells. This paper deals with the α_2 -macroglobulin, as one of the groups of α -Macroglobulins which has been greatly studied and found to be involved in many pathologies such as; Alzheimers', Multiple Sclerosis, Coagulation and Fibrinolytic problems.

KEY WORDS

Bait region, Conformational changes, Structure, Thiolester, Receptor binding domain.

INTRODUCCIÓN

La α_2 -Macroglobulina (α_2 -M), es la proteína más representativa de la superfamilia de las glicoproteínas tioester, esta proteína pertenece al subgrupo Macroglobulina junto con la proteína de la zona de gestación (PZP).

La α_2 -M es una glicoproteína homotetramérica con un peso molecular ~ 720 kDa), compuesta por dos pares de subunidades idénticas de 180 kDa unidas por puentes de disulfuro y su concentración plasmática es elevada (BIRKENMEIER, STIGBRAND, 1993); la α_2 -M ha sido catalogada como una proteína inhibidora de los cuatro tipos de proteasas (serino, metalo, carboxil y tiol) (SOTTRUP-JENSEN 1989), también se ha demostrado que afecta la actividad de citotoxinas con las cuales interactúa (CROOKSTON et al, 1995), y tiene distintos sitios de unión al péptido β -amiloide, de esta manera puede influenciar el progreso de la enfermedad de alzheimer (METTENBURG et al, 2002). Esta proteína presenta una secuencia de residuos de a.a., los cuales sirven como cebo para las diferentes proteinasas (BARRET, STARKEY, 1973; SOTTRUP-JENSEN et al, 1989a, SOTTRUP-JENSEN et al, 1989b); el rompimiento de un enlace peptídico en esta región cebadora ("bait region") induce cambios conformacionales, que permiten atrapar la proteasa atacante dentro de la cavidad central de la α_2 -M (BARRET et al., 1979; GONIAS et al, 1982), la proteinasa puede llegar a ser enlazada de una forma covalente, como resultado de reacciones de sustitución nucleofílica que involucra el enlace tiolester de la α_2 -M (SOTTRUP-JENSEN et al, 1980). El último cambio conformacional como consecuencia de la activación de la α_2 -M ya sea por proteólisis o por ataque nucleofílico directo al tiolester por parte de la metilamina, es la exposición en la superficie de los dominios de unión al

receptor LRP/ α_2 -M (STRICKLAND, 1990).

Este receptor reconoce una secuencia localizada cerca del Terminal-C de la subunidad de α_2 -M e incluye residuos Lys en las posiciones 1370 y 1374 (HOWARD et al, 1996; NIELSEN et al, 1996), de esta manera despejando de la circulación los complejos α_2 -M-proteinasa por parte de las células reticuloendoteliales que expresan el receptor (STRICKLAND et al, 1990; KRISTENSEN et al, 1990; VAN DIJK et al, 1991). El receptor LRP/ α_2 -M internaliza múltiples ligandos además de los complejos α_2 -M-proteinasa (JENSEN et al, 1988; MIKHAILENKO et al, 2001), también como complejos del activador tisular del plasminógeno y del activador del plasminógeno tipo urinario con el inhibidor del activador del plasminógeno tipo I y II (HERZ et al, 1992; ORTH et al, 1992).

La superfamilia de las α -Macroglobulina o Proteínas Tioester.

La superfamilia de las α -Macroglobulinas o proteínas tioester son glicoproteínas de alto peso molecular encontradas en la circulación de vertebrados, huevos blancos de aves y reptiles (SOTTRUP-JENSEN 1989) y en algunos insectos (LAGUEUX et al, 2000). Los factores del sistema del complemento C3, C4 y C5 pertenecen a esta superfamilia, así como, i) el subgrupo Macroglobulina (SOTTRUP-JENSEN 1989) ii) proteínas de insectos en fase aguda que contienen tioesteres, las cuales parece que contribuyen a una respuesta inmune innata similar al complemento contra infecciones bacterianas (LEVY et al, 2004; LAGUEUX et al, 2000; LEVASHINA et al, 2001) y iii) la proteína de superficie celular CD 109, la cual se encuentra en células hematopoyéticas (LIN et al, 2002), recientemente se ha descubierto que esta proteína está relacionada con el cáncer de pulmón (HASHIMOTO et al, 2004) y adenocarcinomas endometriales

(ZHANG et al, 2005).

La característica estructural más distintiva de esta superfamilia es la presencia de un tiolester β -cisteinil- γ -glutamil intracatenario (LAW, DODDS, 1997; SOTTRUP-JENSEN 1989; LAGUEUX et al, 2000).

El C5 es el único miembro de esta familia que no tiene este grupo funcional. El propósito primario de este tiolester parece ser, proveer un mecanismo preparado para la creación de un enlace covalente a proteínas o carbohidratos cercanos.

Este proceso es usualmente desencadenado por un cambio conformacional inducido por proteólisis permitiendo una reacción de intercambio intermolecular que forma una unión amida o éster entre un grupo carboxilo del tiolester y un grupo amino cercano o grupo de hidroxilos (LAW, DODDS, 1997), por lo anterior, los miembros de esta superfamilia pueden considerarse como sofisticadas proteínas de enlace activadas por una proteólisis específica.

Dentro de esta familia que contiene tioesteres, el subgrupo complemento se distingue por dos características: i) la presencia de un dominio anafilatoxina de una longitud ~ 75 residuos de aminoácidos (a.a), en el Terminal-N de las cadenas α , comparable con el segmento que sirve como cebo para las proteinasas de las proteínas del subgrupo Macroglobulina (SOTTRUP-JENSEN et al, 1989a) y en el cual las proteínas de los insectos que contienen tioesteres presentan una región de alta variabilidad de secuencia, la cual puede servirle para expandir su repertorio de interacciones intermoleculares (LEVY et al, 2004; LAGUEUX et al, 2000) y ii) una extensión del Terminal-C de las cadenas α con una longitud ~ 150 residuos de a.a., conocida como C345C (THAI, OGATA, 2003).

Ha sido sugerido (BÁNYAI, PATTHY, 1999) que este dominio complemento/netrina es homólogo al dominio Terminal-N del inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMPs).

Estructura de la α_2 -Macroglobulina.

La estructura primaria consta de una sola cadena de 180 kDa que contiene 1451 a.a. (SOTTRUP-JENSEN et al, 1984b), esta proteína es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades idénticas (HARPEL 1973) que contiene 24 residuos de medias cistinas, de los cuales 22 forman 11 puentes de disulfuro intracatenarios en la estructura secundaria, los últimos dos puentes de disulfuro se forman con otra subunidad en la estructura terciaria. (SOTTRUP-JENSEN et al, 1984a).

El contenido total de carbohidratos de la α_2 -M se ha estimado entre el 9-10 % (SCHÖNENBERGER et al, 1958; DUNN, SPIRO, 1967; FRENOY et al, 1974) formando ocho cadenas de carbohidratos por subunidad de α_2 -M (SOTTRUP-JENSEN et al, 1984b). Estas cadenas de carbohidratos presentan un peso promedio de 2.27 kDa, repartidos en 31 unidades por molécula de α_2 -M, con una composición promedio de 3 residuos de manosa, 2 de galactosa, 4.7 de N-acetilgalactosamina, 4.5 de ácido siálico y 0.4 de fucosa (DUNN, SPIRO, 1967); sin embargo, estudios posteriores indican que los residuos conocidos de Asn en esta proteína presentan grupos de carbohidratos basados en glucosamina (SOTTRUP-JENSEN et al, 1984b).

Cada subunidad de monómero de α_2 -M contiene una región sensible a las proteasas en la mitad de la misma; este dominio es conocido como "Bait Region" (HARPEL, 1973; BARRETT, STARKEY, 1973; STARKEY, BARRETT, 1973) y un sitio tiolester en los aminoácidos 949-952 en una región altamente conservada ⁹⁴⁹Cys-Gly-Glu-

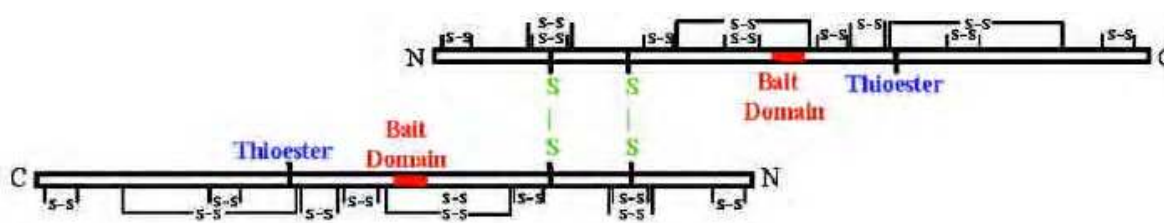


Figura 1. Diagrama del dímero de la α_2 -Macroglobulina, la cadena polipeptídica se encuentra unida por dos puentes de disulfuro en forma antiparalela; los dominios bait region y tiolester se encuentran cerca de la cavidad central de la estructura, el dominio de unión al receptor se encuentra en la región del Terminal-C de cada subunidad. Tomado de KOLODZIEJ SJ et al. 2002.

Glx⁹⁵² (SWENSSON, HOWARD, 1979; HOWARD, 1981; SOTTRUP-JENSEN et al, 1984b).

El diagrama de dos monómeros de α_2 -M nativa que forman la estructura terciaria de esta proteína se aprecia en la Figura 1.

La "Bait Region" de la α_2 -M

La "Bait Region" se encuentra localizada entre los residuos de a.a. 660-700, es el dominio de la α_2 -M que presenta una mayor variabilidad al compararse con la glicoproteína sérica homóloga PZP (SOTTRUP-JENSEN et al, 1989a). La mayoría de los sitios en la α_2 -M susceptibles a un rompimiento proteolítico están limitados a una serie de residuos de aminoácidos se encuentra entre 681-686 y 696-700.

Hasta el momento, todas las proteinasas conocidas que escinden la "bait region" de la PZP, también rompen la "bait region" de la α_2 -M, por ejemplo: la elastasa pancreática porcina (SOTTRUP-JENSEN et al, 1981), papaina, quimotripsina bovina y subtilisina (MORTENSEN et al, 1981), collagenasa de fibroblastos humanos (SOTTRUP-JENSEN et al, 1984a), proteasa del *S. aureus* (HALL et al, 1981), cruzipaina (RAMOS et al, 2002) y termolisina. Algunas proteasas escinden la "bait region" de la α_2 -M, pero no la de la

PZP, por ejemplo: plasmina, trombina y tripsina (SOTTRUP-JENSEN et al, 1981), lo cual indica que el diseño de inhibición las dos α -Macroglobulinas puede variar. Análisis por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) demostraron que la "bait region" de cada monómero eran inusualmente flexibles (GETTINS, CUNNINGHAM, 1986; ARAKAWA et al, 1986) y que se encontraba cerca (10-17 Å) a la Cys del tiol ester en la proteína transformada (GETTINS et al, 1988). Bowen, Gettings, en 1998, por medio de mutaciones específicas y expresión de α_2 -M recombinantes evidenciaron que las cuatro "bait regions" presentes en la α_2 -M están involucradas en la asociación dímero-dímero y en la mediación de los cambios conformacionales. Husted et al, en 2002 descubrieron un nuevo puente de disulfuro en la región cebadora de la α_2 -M del cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*)

El Tiolester de la α_2 -M

El tiolester se encuentra en el centro de una región altamente conservada entre los residuos de aminoácidos 943-969. El tiolester esta formado entre ⁹⁴⁹Cys y Glx⁹⁵² (SWENSSON et al, 1979; SOTTRUP-JENSEN et al, 1989a; HOWARD 1981), tal como se muestra en la figura 2.

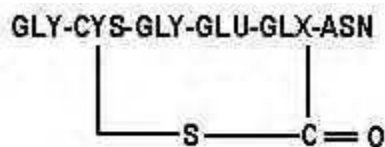


Figura 2. Enlace tioéster.

Existen tres formas conocidas para escindir del tioéster i) mediante el rompimiento de la "bait region" y la unión covalente de la enzima al grupo carboxilo del γ -glutamato, ii) rompimiento del tioéster por pequeños nucleófilos como la metilamina, iii) mediante la desnaturalización de las proteínas generando la formación de un residuo interno piroglutamil, seguido de reacciones secundarias.

Este rompimiento genera la formación de fragmentos de 20 y 60 de residuos de a.a. (HARPEL et al. 1979; SOTTRUP-JENSEN et al, 1980; HOWARD et al 1980), los mecanismos 1 y 2 generan un grupo sulfhidrilo libre.

Estudios sobre la cinética del rompimiento del tioéster por nucleófilos han demostrado que los cambios conformacionales ocurren cooperativamente después que los dos tioéster y una mitad de tetrámero de la α_2 -M ha sido escindida (STRICKLAND et al, 1984).

Suda et al, en 1997, descubrieron que la Asn¹⁰⁶⁵ presente en el hexapéptido SGSLLN juega un papel importante en la formación y reactividad del tioéster presente en la α_2 -M humana.

Estudios sobre la cinética de incorporación no proteolítica de un ligando protéico a la α_2 -M térmicamente activada, confirmaron que el enlace tioéster es modificado hacia un "estado naciente" para posteriormente sufrir el ataque nucleofílico (ADLAKHA et al, 2001).

Recientemente (ARNOLD, 2006) demostró que

el tioéster de la α_2 -M no interviene en la unión de esta proteína a las lectinas.

Dominio de unión al receptor

El dominio de unión al receptor se encuentra ubicado en la región del Terminal-C de la proteína, su importancia radica en el hecho que esta región realiza el contacto directo con el receptor LRP/ α_2 -M, el cual elimina los complejos α -Ms-proteinasa de la circulación (CHIABRANDO et al, 2002). Un fragmento del Terminal-C, con un peso molecular de 18 kDa, se ha obtenido por el rompimiento específico de la α_2 -M con papaína y este fragmento es capaz de unirse a fibroblastos con afinidad dos veces menor en magnitud que el complejo intacto α_2 -M-proteinasa (SOTTRUP-JENSEN et al, 1986), la proteólisis ocurre entre ¹³¹³Lys-Glu¹³¹⁴ produciendo un fragmento con 138 residuos de a.a., incluyendo un puente de disulfuro y una cadena de oligosacáridos. Se han desarrollado varios métodos para el aislamiento del Terminal-C de la α_2 -M, (JENSEN et al, 1996; ARBELÁEZ, STIGBRAND T, 1997), mediante la modificación de este último método se ha logrado obtener el Terminal-C de la α_2 -M en un tiempo de 5 minutos con un 88% de recuperación.

La estructura cristalina de este dominio se ha realizado a partir de α_2 -M bovina, demostrándose que el dominio contiene dos α -hélices y nueve hojas plegadas β (JENNER et al, 1998) en humanos estudios realizados por espectroscopia RMN, demostraron que este dominio presenta estructuras con α -hélices y hojas β plegadas (HUANG et al, 1998; HUANG et al, 2000). Estudios inmunohistoquímicos desarrollados por GUNNARSSON et al., 2000a, descubrieron variantes conformacionales en el Terminal-C.

Cambios conformacionales de la α_2 -M

La variación en la movilidad electroforética de la α_2 -M fue por primera vez detectada por Barret et al, 1979, cuando el tiolester o la "bait region" de la α_2 -M fueron escindidos por metilamina o proteinasas respectivamente, los derivados de la α_2 -M migraron más rápido que la α_2 -M original en un gel de electroforesis PAGE nativo.

Estas diferencias en la movilidad han sido denominadas como "cambios conformacionales". Estudios adicionales han sido realizados, tales como electromicrografías (SCHRAMM et al, 1982; FELDMAN et al, 1985) y dispersión de rayos X de ángulo pequeño (BRANEGÅRD et al, 1982) han revelado una reducción en el tamaño de la α_2 -M seguido del tratamiento con proteinasas (FELDMAN et al, 1985). Feldman et al, propusieron un modelo de la estructura de la α_2 -M nativa y α_2 -M tratada con metilamina y proteinasas.

Otros estudios electromicroscópicos extensivos confirmaron similitudes significantes en el modelo de Feldman cuando se comparó con los resultados electromicroscópicos (TAPON-BRETAUDIERE et al, 1985; DELAIN et al,

1988, 1992) en el cual la α_2 -M nativa fue presentada como dos bloques sobrelapados en forma de S abultada y girada, permitiendo un espacio común en la mitad del tetrámero, generando un diseño de la molécula en forma de "Dona". La reacción de la α_2 -M con proteinasas y metilamina transforman la forma de "Dona" a una molécula parecida de una H (Figura 3).

Los cambios involucrados en la exposición del dominio de unión al receptor no son bien entendidos, sin embargo, se han propuesto modelos, uno conocido como "cilindro hueco" propuesto por Feldman et al, 1985, cuyas bases fueron propuestas para estar abierto o cerrado en los estados nativo o transformado, el otro modelo propone que la molécula esta sujeta a una elongación que permite la exposición del dominio de unión al receptor (GONIAS, FIGLER 1989; MARSHALL et al, 1992); sin embargo, el uso de la microscopia inmunoelectrónica (DELAINE et al, 1992) propone que la exposición de los dominios de unión al receptor se deben a un "desenrollamiento" en cada subunidad dimérica, este último estudio ha sido confirmado por otros (BOISSET et al, 1996; QAZI et al, 1999; KOLODZIEJ et al 2002). Jensen et al, en 1993, estudiaron y compararon los cambios conformacionales



Figura 3. Representación del relieve la estructura del complejo α_2 -Macroglobulina-quimotripsina, se aprecia claramente forma de H del tetrámero de la proteína debido a la exposición de los cuatro dominios de unión al receptor como consecuencia del rompimiento de la región cebadora y posterior activación del dominio tiolester por parte de la proteasa. Tomado de KOLODZIEJ SJ et al. 2002.

de la α_2 -M y PZP por medio del análisis del cambio en la hidrofobicidad de la superficie de la proteína, encontrando que estos cambios están relacionadas con el grado de "atrapamiento".

Gunnarsson et al, 2000a, desarrollaron estudios con anticuerpos monoconales utilizando técnicas de ELISA y BIAcore, determinaron una región específica dentro del dominio de unión al receptor y la llamaron "switch region" compuesta por 300 residuos de a.a ¹³¹⁴Glu-Ser¹³⁴³, la cual es clave en la generación de cambios estructurales.

Papel biológico de la α_2 -M

La alta concentración persistente de la α_2 -M en suero humano a través de la vida y el hecho que esta proteína pueda ser escindida en la "bait region" por las cuatro clases de proteinasas (BARRET et al, 1973) son las observaciones sobre las cuales el papel biológico de la α_2 -M como inhibidor de respaldo de proteinasas ha sido propuesto.

La interacción de α_2 -M con varias serinoproteinases como plasmina, tripsina, quimotripsina (HOWELL et al, 1983; HARPEL 1973) trombina (DANGOTT et al, 1982; SCHMIDT et al, 1989; HARPEL 1973) y kalicreina (OGATA et al, 1993) ha sido reportada.

Plasmina y trombina son importantes componentes dentro del sistema de coagulación y fibrinólisis. Plasmina es inhibida por α_2 -M y el inhibidor α_2 -antiplasmina (HARPEL 1977), el mecanismo de interacción entre α_2 -M y plasmina ha sido también estudiado y comparado con el que se sucede en la interacción entre α_2 -M y tripsina (CHRISTENSEN et al, 1989).

La interacción de plasmina y tripsina ha sido

estudiada *in vivo* e *in vitro* y estas proteasas fueron encontradas que se unen diferencialmente a la α_2 -M dependiendo de la concentración de las proteinasas (ROCHE, PIZZO, 1988). La interacción de trombina con α_2 -M fue determinada por la exposición de grupos sulfhidrilo de la α_2 -M (STRAIGHT 1984). La significancia en la interacción de la plasmina con α_2 -M, es de mucha importancia teniendo en cuenta los diversos efectos que la plasmina puede ejercer en los sistemas biológicos.

El sustrato de la plasmina no solo es el fibrinógeno y/o fibrina, la plasmina está también involucradas en los siguientes sistemas i) degradación de glicoproteínas de la matriz extracelular y de la estructura de la membrana (JONES et al, 1980; LIOTTA et al, 1981; SILVERSTEIN et al, 1986), ii) degradación de los factores de crecimiento y péptidos de señal tales como la activación de las formas latentes de TGF β -1 e interferón γ (LYONS et al, 1988; GONIAS et al, 1989) y iii) activación de las formas proenzima de matriz metaloproteinases (DESRIVIERES et al, 1993). α_2 -M enlaza diversas citokinas (PHILIP, O'CONNOR-McCOURT, 1991; LIN et al, 1991; KURDOWKA et al, 2002), por un mecanismo que requiere cambios conformacionales (BORTH, 1992), múltiples estudios reportan la relación de esta proteína con el factor de crecimiento TGF- β , Web et al. en el 2000 descubrieron una secuencia de 16 residuos de a.a. en la α_2 -M responsable de la unión de esta proteína al TGF- β , por otra parte se han desarrollado estudios sobre la relación de esta proteína con la enfermedad de Alzheimer, especialmente con el péptido β -amiloide (QIU et al, 1996; METTENBURG et al, 2002; METTENBURG, GONIAS, 2005).

Algunos estudios han demostrado que la α_2 -M une de forma covalente a varias matriz metaloproteínas (WERB et al, 1974; SOTTRUP-JENSEN et al, 1989 b; ARBELÁEZ LF et al, 1997), demostrando una posible interacción entre estas proteínas *in vivo*. Varios síndromes y estados patológicos han sido relacionados con esta proteína por ejemplo: esclerosis múltiple; aberraciones conformacionales en la α_2 -M limitan la capacidad de esta proteína para eliminar proteínas sistémicas (GUNNARSSON et al., 2000b). En el caso de la artritis reumatoidea, α_2 -M afecta el nivel de citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio (WU, PIZZO et al, 2001; LIU et al, 2001).

En animales se han desarrollado estudios en los cuales se evidencia que esta proteína sirve como inhibidor del virus de influenza A (RYAN-POIRIER, KAWAOKA 1991, 1993) de esta manera ampliando el campo de acción biológico de esta proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlakha CL, Hart JP, Pizzo SV. (2001). Kinetics of Nonproteolytic Incorporation of a Protein Ligand into Thermally Activated α_2 -Macroglobulin. J. Biol. Chem. 276: 41547-41552.
- Arbeláez LF, Stigbrand T. (1997). Purification of pregnancy zone protein and its receptor binding domain from human plasma. Prot. Exp. and Pur. 10: 301-308.
- Arbelaez LF, Bergmann U, Tuuttila A, Shanbhag VP, Stigbrand T. (1997). Interaction of matrix metalloproteinases-2 and -9 with pregnancy zone protein and α_2 -Macroglobulin. Arch. Biochem. Biophys. 347: 62-8.
- Arakawa H, Muto Y, Arata Y, Ikai A. (1986). Proton nuclear magnetic resonance study of human plasma α_2 -Macroglobulin. Biochem. J. 25: 6785-6789.
- Arnold JN, Wallis R, Willis AC, Harvey DJ, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB. (2006). Interaction of mannan binding lectin with α_2 -Macroglobulin via exposed oligomannose glycans: a conserved feature of the thiolester protein family? J. Biol. Chem. 281: 6955-69563.
- Barrett AJ, Starkey AM. (1973). The interaction of α_2 -Macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. Biochem. J. 133: 709-724.
- Barrett AJ, Brown MA, Sayers CA. (1979). The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the α_2 -Macroglobulin molecule. Biochem. J. 181: 401-418.
- Bowen ME, Gettins PG. (1998). Bait region involvement in the dimer-dimer interface of human α_2 -Macroglobulin and in mediating gross conformational change. Evidence from cysteine variants that form interdimer disulfides. J. Biol. Chem. 273: 1825-1831.
- Birkenmeier G, Stigbrand T. (1993). Production of conformation-specific monoclonal antibodies against α_2 -Macroglobulin and their use for quantitation of total and transformed α_2 -Macroglobulin in human blood. J. Immunol. Methods. 162: 59-67.
- Boisset N, Taveau JC, Pochon F, Lamy J. (1996). Similar architectures of native and transformed human α_2 -Macroglobulin suggest the transformation mechanism. J. Biol. Chem. 271: 25762-25769.
- Borth W. (1992). α_2 -Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. FASEB J. 6: 3345-3353.
- Branegård B, Osterberg R, Sjöberg B. (1982). Small-angle X-ray scattering study of the

- interaction between human α_2 -Macroglobulin and trypsin. *Eur. J. Biochem.* 122: 663-666.
- Chiabrando GA, Vides M, Sanchez MC. (2002). Differential binding properties of human pregnancy zone protein and α_2 -Macroglobulin -proteinase complexes to low-density lipoprotein receptor-related protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 398: 73-78.
- Christensen U, Simonsen M, Harrit N, Sottrup-Jensen L. (1989). Pregnancy zone protein, a proteinase-binding macroglobulin. Interactions with proteinases and methylamine. *Biochem. J.* 28: 9324-9331.
- Crookston KP, Webb DJ, Wolf BB, Gonias SL. (1995). Classification of α_2 -Macroglobulin - cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. *J. Biol. Chem.* 269: 1533-1540.
- Dangott LJ, Cunningham LW. (1982). Residual α_2 -Macroglobulin in fetal calf serum and properties of its complex with thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1243-1251.
- Delain E, Barray M, Tapon-Bretaudiere J, Pochon F, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Van Leuven F. (1988). The molecular organization of human α_2 -Macroglobulin. An immunoelectron microscopic study with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 25: 2981-2989.
- Delain E, Pochon F, Barray M, Van Leuven F. (1992). Ultrastructure of α_2 -Macroglobulins. *Electron Microsc. Rev.* 5: 231-281. Review.
- Desrivieres S, Lu H, Peyri N, Soria C, Legrand Y, Menashi S. (1993). Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J. Cell Physiol.* 157: 587-593.
- Dunn JT, Spiro RG. (1967). The α_2 -Macroglobulin of human plasma. II. Studies on the carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* 242: 5549-5555.
- Feldman SR, Gonias SL, Pizzo SV. (1985). Model of α_2 -Macroglobulin structure and function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 5700-5704.
- Ganrot PO. (1967). Interaction of plasmin and trypsin with α_2 -Macroglobulin. *Acta Chem. Scan.* 21: 602- 608.
- Gettins P, Cunningham LW. (1986). Identification of ^1H resonances from the bait region of human α_2 -Macroglobulin and effects of proteases and methylamine. *Biochem. J.* 25: 5011-5017.
- Gettins P, Beth AH, Cunningham LW. (1988). Proximity of thiol esters and bait region in human α_2 -Macroglobulin: paramagnetic mapping. *Biochem. J.* 27: 2905-2911.
- Gonias SL, Reynolds JA, Pizzo SV. (1982). Physical properties of human α_2 -Macroglobulin following reaction with methylamine and trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* 705: 306-314.
- Gonias SL, Young WW Jr, Fox JW. (1989). Cleavage of recombinant murine interferon-gamma by plasmin and miniplasmin. *J. Interferon Res.* 5: 517-529.
- Gonias SL, Figler NL. (1989). Electron microscopy studies of α_2 -Macroglobulin conformational intermediates obtained by derivatization with cis-dichlorodiammineplatinum (II). *J. Biol. Chem.* 264: 9565-9570.
- Gunnarsson M, Stigbrand T, Jensen PE. (2000a). Conformational variants of human α_2 -Macroglobulin are reflected in a C-terminal 'switch region'. *Eur. J. Biochem.* 267: 4081-4087.
- Gunnarsson M, Stigbrand T, Jensen PE. (2000b) Immunochemical aberrations of α_2 -Macroglobulin purified from a patient with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 102: 406-409.

- Hall PK, Nelles LP, Travis J, Roberts RC. (1981). Proteolytic cleavage sites on α_2 -Macroglobulin resulting in proteinase binding are different for trypsin and Staphylococcus aureus V-8 proteinase. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 100: 8-16.
- Hashimoto M, Ichihara M, Watanabe T, Kawai K, Koshikawa K, Yuasa N, Takahashi T, Yatabe Y, Murakumo Y, Zhang JM, Nimura Y, Takahashi M. (2004). Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene* 23: 3716-3720.
- Harpel PC. (1973). Studies on human plasma α_2 -Macroglobulin-enzyme interactions. Evidence for proteolytic modification of the subunit chain structure. *J. Exp. Med.* 138: 508-521.
- Harpel PC. (1977). Plasmin inhibitor interactions. The effectiveness of α_2 -plasmin inhibitor in the presence of α_2 -Macroglobulin. *J. Exp. Med.* 146: 1033-1040.
- Harpel PC, Hayes MB, Hugli TE. (1979). Heat-induced fragmentation of human α_2 -Macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 254: 8669-8678.
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71: 411-421.
- Howard GC, Yamaguchi Y, Mistra UK, Gawdi G, Nelsen A, DeCamp DL, Pizzo SV. (1996). Selective mutations in cloned and expressed α -macroglobulin receptor binding fragment alter binding to either the α_2 -Macroglobulin signaling receptor or the low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -Macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 14105-14111.
- Howard JB. (1981). Reactive site in human α_2 -Macroglobulin: circumstantial evidence for a thiolester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78: 2235-2239.
- Howell JB, Beck T, Bates B, Hunter MJ. (1983). Interaction of α_2 -Macroglobulin with trypsin, chymotrypsin, plasmin, and papain. *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 261-270.
- Huang SS, O'Grady P, Huang JS. (1988). Human transforming growth factor beta α_2 -Macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor beta. *J. Biol. Chem.* 263: 1535-15341.
- Huang W, Dolmer K, Liao X, Gettins PG. (1998). Localization of basic residues required for receptor binding to the single alpha-helix of the receptor binding domain of human α_2 -Macroglobulin. *Protein Sci.* 7: 2602-2612.
- Huang W, Dolmer K, Liao X, Gettins PG. (2000). NMR solution structure of the receptor binding domain of human α_2 -Macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 275:1089-94.
- Husted LB, Sørensen ES, Armstrong PB, Quigley JP, Kristensen LK, Sottrup-Jensen L. (2002). Localization of Carbohydrate Attachment Sites and Disulfide Bridges in Limulus α_2 -Macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 277: 43698-43706.
- Jenner L, Husted L, Thirup S, Sottrup-Jensen L, Nyborg J. (1998). Crystal structure of the receptor-binding domain of α_2 -Macroglobulin. *Structure* 6: 595-604.
- Jensen PH, Moestrup SK, Sottrup-Jensen L, Petersen CM, Gliemann J. (1988). Receptors for α_2 -Macroglobulin and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast, *Placenta* 9: 463-477.
- Jensen PE, Hagglof EM, Arbelaez LF, Stigbrand T, Shanbhag VP. (1993). Comparison of conformational changes of pregnancy zone protein and human α_2 -Macroglobulin, a study using hydrophobic affinity partitioning. *Biochim. Biophys. Acta.* 1164: 152-158.
- Jensen PE, Arbeláez LF, Vithaldas PS, Stigbrand T. (1996). Preparation and characterization

- of a C-terminal fragment of pregnancy zone protein corresponding to the receptor-binding peptide from human α_2 -Macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1293: 254-258.
- Jones PA, DeClerck YA. (1980). Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin, and collagen by metastatic human tumor cells. *Cancer Res.* 40: 3222-3227.
- Kurdowska AK, Geiser TK, Alden SM, Dziadek BR, Noble JM, Nuckton TJ, Matthay MA. (2002). Activity of pulmonary edema fluid interleukin-8 bound to α_2 -Macroglobulin in patients with acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282: 1092-1098.
- Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen. (1990). Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the α_2 -Macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* 276: 151-155.
- Kolodziej SJ, Wagenknecht T, Strickland DK, Stoops JK. (2002). The three-dimensional structure of the human α_2 -Macroglobulin dimer reveals its structural organization in the tetrameric native and chymotrypsin α_2 -Macroglobulin complexes. *J. Biol. Chem.* 277: 28031-28037.
- Lagueux, M., E. Perrodou, E. A. Levashina, M. Capovilla, and J. A. Hoffman. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 11427.
- Law, S. K. A., and A. W. Dodds. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* 6: 263.
- Levashina, E. A., L. F. Moita, S. Blandin, G. Vriend, M. Lagneux, and F. C. Kafatos. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104: 709.
- Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L. (2004) Proteomic Analysis of the Systemic Immune Response of *Drosophila*. *Molecular & Cellular Proteomics* 3: 156-166.
- Lin, M., D. R. Sutherland, W. Horsfall, N. Totty, E. Yeo, R. Nayar, X. F. Wu, and A. C. Schuh. (2002). Cell surface antigen CD109 is a novel member of the α_2 -Macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood* 99: 1683.
- Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S. (1981). Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* 41: 4629-4636.
- Liu Q, Ling TY, Shieh HS, Johnson FE, Huang JS, Huang SS. (2001). Identification of the high affinity binding site in transforming growth factor-beta involved in complex formation with α_2 -Macroglobulin. Implications regarding the molecular mechanisms of complex formation between α_2 -Macroglobulin and growth factors, cytokines, and hormones. *J. Biol. Chem.* 276: 46212-46218.
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell. Biol.* 106: 1659-1665.
- Marshall LB, Figler NL, Gonias SL. (1992). Identification of α_2 -Macroglobulin conformational intermediates by electron microscopy and image analysis. Comparison of α_2 -Macroglobulin-thrombin and α_2 -Macroglobulin reacted with cis-dichlorodiammineplatinum(II) and trypsin. *J. Biol. Chem.* 267: 6347-6352.
- Mettenburg JM, Webb DJ, Gonias SL. (2002). Distinct binding sites in the structure of α_2 -Macroglobulin mediate the interaction with beta-amyloid peptide and growth factors. *J. Biol. Chem.* 277: 13338-13345.

- Mettenburg JM, Gonias SL. (2005). Beta-amyloid peptide binds equivalently to binary and ternary α_2 -Macroglobulin-protease complexes. *Protein J.* 24: 89-93.
- Mikhailenko I, Battey FD, Migliorini M, Ruiz JF, Argraves K, Moayeri M, Strickland DK. (2001). Recognition of α_2 -Macroglobulin by the low density lipoprotein receptor-related protein requires the cooperation of two ligand binding cluster regions. *J. Biol. Chem.* 276: 39484-39491.
- Mortensen SB, Sottrup-Jensen L, Hansen HF, Rider D, Petersen TE, Magnusson S. (1981). Sequence location of a putative transglutaminase crosslinking site in human α_2 -Macroglobulin. *FEBS Lett.* 135: 295-300.
- Nielsen KL, Holtet TL, Etzerodt M, Moestrup SK, Gliemann J, Sottrup-Jensen L, Thøgersen HC. (1996). Identification of residues in α -macroglobulins important for binding to the α_2 -Macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 271: 12909-12912.
- Ogata H, Kouyoumdjian M, Borges DR. (1993). Comparison between clearance rates of plasma kallikrein and of plasma kallikrein-alpha-macroglobulin complexes by the liver. *Int. J. Biochem.* 7: 1047-1051.
- Orth K, E.L. Madison, M.J. Getthing, F.J. Sambrook, J. Herz. (1992). Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -Macroglobulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7422-7426.
- Philip A, O'Connor-McCourt MD. (1991). Interaction of Transforming Growth Factor-01 with α_2 -Macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 266: 22290-22296.
- Qazi U, Gettins PG, Strickland DK, Stoops JK. (1999). Structural details of proteinase entrapment by human α_2 -Macroglobulin emerge from three-dimensional reconstructions of Fab labeled native, half-transformed, and transformed molecules. *J. Biol. Chem.* 274: 8137-8142.
- Qiu WQ, Borth W, Ye Z, Haass C, Teplow DB, Selkoe DJ. (1996). Degradation of amyloid beta-protein by a serine protease- α_2 -Macroglobulin complex. *J. Biol. Chem.* 271: 8443-8451.
- Ramos AM, Duschak VG, Gerez de Burgos NM, Barboza M, Remedi MS, Vides MA, Chiabrando GA. (2002). Trypsin from *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interact with human α_2 -Macroglobulin and pregnancy zone protein. *Exp. Parasitol.* 100: 121-130.
- Roche PA, Pizzo SV. (1988). Analysis of thiolester bond cleavage-dependent conformational changes in binary α_2 -Macroglobulin-proteinase complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 285-293.
- Ryan-Poirier KA, Kawaoka Y. (1991). Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *J. Virol.* 65: 389-395.
- Ryan-Poirier KA, Kawaoka Y. (1993). α_2 -Macroglobulin is the major neutralizing inhibitor of influenza A virus in pig serum. *Virology.* 193: 974-976.
- Schmidt B, Mitchell L, Ofosu FA, Andrew M. (1989). α_2 -Macroglobulin is an important progressive inhibitor of thrombin in neonatal and infant plasma. *Thromb. Haemost.* 62: 1074-1077.
- Schönenberger M, Schmidtberger R, Schultze HE. (1958). About the α_2 -Macroglobulin. *Z Naturforsch B.* 13B, 761-772.

- Schramm HJ, Schramm W. (1982). Computer averaging of single molecules of α_2 -Macroglobulin and the α_2 -Macroglobulin/trypsin complex. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 363: 803-812.
- Silverstein RL, Harpel PC, Nachman RL. (1986). Tissue plasminogen activator and urokinase enhance the binding of plasminogen to thrombospondin. J. Biol. Chem. 261: 9959-9965.
- Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Magnusson S. (1980). A thiol-ester in α_2 -Macroglobulin cleaved during proteinase complex formation. FEBS Lett. 121: 3820-3823.
- Sottrup-Jensen L, Lønblad PB, Stepanik TM, Petersen TE, Magnusson S, Jornvall H. (1981). Primary structure of the 'bait' region for proteinases in α_2 -Macroglobulin. Nature of the complex. FEBS Lett. 127: 167-173.
- Sottrup-Jensen L, Stepanik TM, Kristensen T, Wiersbicki DM, Jones CM, Lønblad PB, Magnusson S, Petersen TE. (1984a). Primary structure of human α_2 -Macroglobulin. V. The complete structure. J. Biol. Chem. 259: 8318-8327.
- Sottrup-Jensen L, Stepanik TM, Kristensen T, Tack BF. (1984b). Partial primary structure of human pregnancy zone protein: extensive sequence homology with human α_2 -Macroglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81: 7353-7357.
- Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Van Leuven F. (1988). Domain structure of human α_2 -Macroglobulin. Characterization of a receptor-binding domain obtained by digestion with papain. FEBS Lett. 205: 20-24.
- Sottrup-Jensen, L. (1989). α -Macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. J. Biol. Chem. 264:11539.
- Sottrup-Jensen, L., Sand O, Kristensen L, Fey GH. (1989a). The α -macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian alpha-macroglobulins. J. Biol. Chem. 264:15781-15789.
- Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H. (1989b). Human fibroblast collagenase- α -macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian α -macroglobulins. J. Biol. Chem. 264: 393-401.
- Starkey AM, Barrett AJ. (1973). Inhibition by α -macroglobulin and other serum proteins. Biochem. J. 131: 823-831.
- Straight DL, McKee PA. (1984). Characterization of thrombin binding to α_2 -Macroglobulin. J. Biol. Chem. 259: 1272-1278.
- Strickland DK, Bhattacharya P, Olson ST. (1984). Kinetics of the conformational alterations associated with nucleophilic modification of α_2 -Macroglobulin. Biochemistry. 23: 3115-3124.
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. (1990). Sequence identity between α_2 -Macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J. Biol. Chem 265:17401-17404.
- Suda A., Dolmer K, Gettins P G. (1997) Critical Role of Asparagine 1065 of Human α_2 -Macroglobulin in Formation and Reactivity of the Thiol Ester. J. Biol. Chem. 272: 31107-31112.
- Swensson RP, Howard JB. (1979). Structural characterization of human α_2 -Macroglobulin subunits. J Biol Chem. 254: 4452-4456.

- Tapon-Brethaudiere J, Bros A, Couture-Tosi E, Delain E. (1985). Electron microscopy of the conformational changes of α_2 -Macroglobulin from human plasma. *EMBO J.* 4: 85-89.
- Thai C-T, Ogata RT. (2003). Expression and Characterization of the C345C/NTR Domains of Complement Components C3 and C51. *The Journal of Immunology* 171: 6565-6573.
- Van Dijk MC, Ziere GJ, Boers W, Linthorst C, Bijsterbosch MK, van Berkel TJ. (1991). Recognition of chylomicron remnants and beta-migrating very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver α_2 -Macroglobulin-recognition site. *Biochem. J.* 279: 863-870.
- Web DJ, Roadcap DW, Dhakephalkar A, Gonias SL. (2000). A 16-amino acid peptide from human α_2 -Macroglobulin binds transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB. *Protein Sci.* 9: 1986-1992.
- Werb Z, Burleigh MC, Barrett AJ, Starkey PM. (1974). The interaction of α_2 -Macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem. J.* 139: 359-368.
- Wu SM, Pizzo SV. (2001). α_2 -Macroglobulin from rheumatoid arthritis synovial fluid: functional analysis defines a role for oxidation in inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.* 391: 119-126.
- Zhang J-M, Hashimoto M, Kawai K, Murakumo Y, Sato T, Ichihara M, Nakamura S, Takahashi M. (2005). CD109 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology International.* 55: 165.