

Jednym z procesów zachodzących w czasie inwazji nowotworu na otaczającą tkankę i w czasie tworzenia przerzutów jest proteoliza składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Aby pokonać fizyczną barierę, jaką dla komórki nowotworowej stanowi między innymi macierz zewnątrzkomórkowa, komórki te wytwarzają enzymy proteolityczne. Ważną grupę wśród enzymów tworzących system proteolityczny odpowiedzialny za regulację degradacji składników ECM stanowią metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Podejmowane są próby zastosowania dotychczasowej wiedzy o roli metaloproteaz ECM i ich inhibitorów w procesie inwazji nowotworów do opracowywania nowych podejść terapeutycznych w leczeniu nowotworów.

Słowa kluczowe: metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), inwazyjność nowotworu.

One of the processes responsible for tumor cell invasion and metastasis is degradation of the extracellular matrix (ECM) proteins. To overcome the physical barrier, which is ECM, tumor cell produces proteolytic enzymes. A family of metalloproteinases named „matrix metalloproteinases” (MMPs) plays an important role in matrix degradation. Information about MMP and their inhibitors has led to a number of successful inhibitor strategies in tumor treatment.

Key words: Matrix metalloproteinases (MMP), tumor invasion.

Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej w inwazji nowotworów

Matrix metalloproteinases in tumor invasion

Joanna Łapińska

Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie

PROTEOLIZA SKŁADNIKÓW MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ W PROCESACH INWAZJI NOWOTWORU

Inwazja komórek nowotworowych to złożone zjawisko, w którego przebiegu występują wzajemne oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi, zdrowymi oraz ich środowiskiem. Wiele różnych cech komórek nowotworowych sprzyja ich własnościom inwazyjnym. Jest to między innymi zdolność komórek nowotworowych do utraty kontaktu z podłożem i z innymi otaczającymi komórkami, dzięki której komórka może odłączyć się od guza pierwotnego. Inne cechy komórek nowotworowych, pomocne w procesie inwazji, to szczególna skłonność do przylegania do powierzchni śródbłonna, czy wytwarzanie enzymów proteolitycznych umożliwiających pokonywanie fizycznych barier, które ma na swojej drodze komórka nowotworowa. Jedną z takich barier jest macierz zewnątrzkomórkowa (ECM – *extracellular matrix*). Macierz stanowi gęstą sieć różnorodnych białek i polisacharydów wypełniających przestrzeń zewnątrzkomórkową w tkankach. Spełnia w organizmie funkcje zarówno strukturalne, jak i regulacyjne.

Degradacja składników ECM zachodzi dzięki aktywności wielu enzymów proteolitycznych, wśród których ważną grupę stanowią metaloproteazy ECM (MMP – *matrix metalloproteinases*). Tworzą one jeden system proteolityczny wraz z białkami TIMP – tkankowymi inhibitorami metaloproteaz. Wyniki badań prowadzonych na komórkach nowotworowych *in vitro* i *in vivo* sugerują, że potencjał inwazyjny nowotworu może być zależny od interakcji MMP-TIMP, gdzie przebieg aktywności wybranych MMP zwiększa ów potencjał, a nadmiar białek TIMP zmniejsza lub znosi inwazyjność. Hipoteza ta daje podstawy do opracowania nowej terapii w inwazyjności nowotworów, opartej na zablokowaniu aktywności MMP. Skuteczność terapii wymaga jednak dokładnego wyjaśnienia mechanizmów molekularnych zachodzących w procesach inwazji nowotworów.

METALOPROTEAZY ECM

Metaloproteazy ECM są to metaloenzymy zawierające w swojej cząsteczce atom cynku. Do tej pory poznano 18 różnych MMP (Tab. 1.). Białka te to endopeptydazy o masie cząsteczkowej od 28 do 92 kDa o podobnym schemacie budowy (Ryc. 1.). Składają się z kilku domen (fragmentów białka) o różnej funkcji:

- ▶ propeptydu – którego odcięcie powoduje aktywację enzymu;
- ▶ domeny katalitycznej zawierającej centrum aktywne, a w nim atom cynku. U metaloproteaz ECM z grupy żelatynaz w obrębie tej domeny można wyróżnić fragment podobny do fibronektyny, odpowiedzialny za ich wiązanie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej;
- ▶ domeny C-końcowej, która wydaje się być odpowiedzialna za łączenie się enzymu z innymi białkami, a więc także za specyficzność substratową;
- ▶ domeny transbłonowej występującej tylko u metaloproteaz z grupy błonowych MMP (MT-MMP).

REGULACJA AKTYWNOŚCI MMP

Aktywność metaloproteaz ECM regulowana jest na kilku poziomach. Ekspresja genów niektórych białek z rodziny MMP w fibroblastach może być indukowana przez białko obecne w błonie komórek nowotworowych – czynnik indukujący metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*). EMMPRIN jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 58 kDa, zlokalizowaną po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Większość proteaz wykorzystywanych przez komórki nowotworowe w procesach inwazji jest wytwarzana przez inne komórki, np. fibroblasty. Proteazy następnie przyczepiają się do powierzchni komórek nowotworowych i są przez nie wykorzystywane. Przy pomocy białka EMMPRIN komórki nowotworowe mogą zatem regulować ekspresję MMP wydzielanych przez normalne komórki.

Metaloproteazy ECM są wydzielane przez komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w formie proenzymu (latentnej, proMMP), w którym cynk w centrum aktywnym jest zablokowany przez połączenie z grupą tiolową cysteiny w propeptydzie. Propeptyd zawiera sekwencję PRCGXPDV (Pro, Arg, Cys, Gly, X, Pro, Asp, Val), która jest zachowana w toku ewolucji w całej rodzinie białek MMP. Aktywacja polega na odsłonięciu jonu cynku przez odcięcie propeptydu. Aktywacja proenzymu może zachodzić w sposób autokatalityczny lub przy udziale błonowych MMP (MT-MMP). W pierwszym przypadku wiązanie Cys-Zn zostaje przerwane przy udziale enzymów proteolitycznych. Kolejnym krokiem jest autokatalityczne odcięcie propeptydu. W drugim przypadku proenzym jest aktywowany przez MT-MMP. MT-MMP tworzą potrójne kompleksy z białkami TIMP-2 i proMMP (Ryc. 2.). MT-MMP działa tu jako receptor dla cząsteczki TIMP-2. Dopiero MT-MMP z przyłączoną cząsteczką TIMP-2 staje się receptorem dla proMMP, która przyłącza się do niego przy pomocy domeny C-końcowej. Jak dotąd wiemy tylko o dwóch enzymach z rodziny matryksyn, które mogą ulegać aktywacji z udziałem błonowych MMP. Są to MMP-2 i MMP-13. Nie wiadomo, czy inne MMP są aktywowane przez podobny MT-MMP-zależny mechanizm.

Kolejnym poziomem, na którym zachodzi regulacja aktywności MMP jest hamowanie aktywności przez białka TIMP. Dotychczas znane są 4 geny kodujące białka, określa-

ne jako TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. Cząsteczki TIMP-1 i TIMP-2 tworzą niekowalencyjne kompleksy z białkami MMP w stosunku molowym 1:1. Chociaż zarówno TIMP-1, jak i TIMP-2 hamują aktywność wszystkich MMP, okazuje się, że TIMP-2 ma większe powinowactwo do MMP-2 i MMP-9 niż TIMP-1, natomiast TIMP-1 ma dwa razy większe powinowactwo do MMP-1 niż TIMP-2. Na temat mechanizmu inhibicji MMP przez TIMP niewiele jeszcze wiadomo. TIMP łączy się prawdopodobnie z cząsteczką MMP w kilku miejscach. Na przykład MMP-2 wydaje się mieć dwa miejsca, dzięki którym tworzy kompleks z TIMP-2: centrum aktywne oraz miejsce „stabilizujące” w C-końcowym fragmencie cząsteczki.

Degradacja ECM zachodzi poprzez lokalną produkcję enzymów proteolitycznych. Jest ona ograniczona do regionów bezpośrednio przylegających do komórek nawet wtedy, gdy enzymy są niezwiązane z błonami. Dzieje się tak dzięki zogniskowaniu proteolizy, czyli skoncentrowaniu tego procesu na lub w pobliżu powierzchni komórki. Istnieją różne sposoby zogniskowania działania enzymów proteolitycznych w regionie okołokomórkowym:

- ▶ poprzez bezpośrednie (przy pomocy domeny transbłonowej) zakotwiczenie enzymów lub/i ich inhibitorów w błonach komórkowych. Komórka posiada na swojej powierzchni związane z błoną proteazy. Dzięki temu degradowane są tylko te składniki ECM, które bezpośrednio kon-

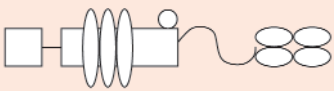

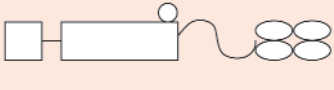
taktuują się z powierzchnią komórki;

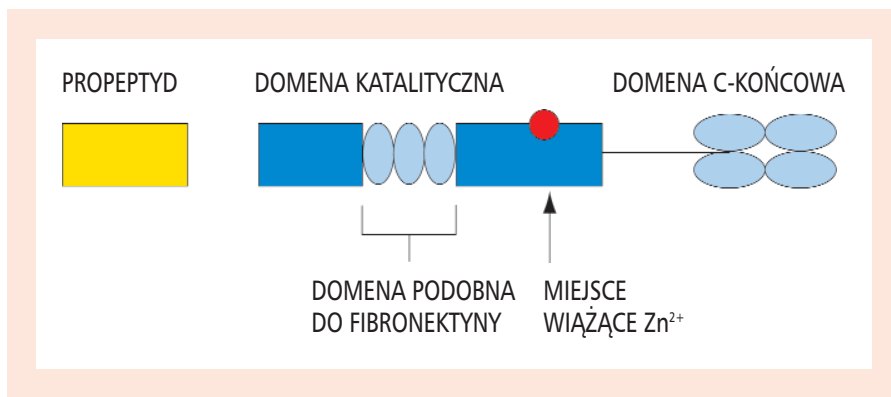
- ▶ poprzez posiadanie receptorów błonowych dla enzymów (np. kompleks MT-MMP-1-TIMP-2 jest receptorem dla proMMP-2). Enzymy produkowane są przez komórki (np. fibroblasty) i wydzielane do przestrzeni międzykomórkowej. Komórka dzięki posiadaniu na swojej powierzchni receptorów dla MMP, wychwytuje je, co pozwala na proteolizę składników ECM sąsiadujących z komórką. Dzięki zogniskowaniu proteoliza jest bardziej specyficzna i efektywna nawet przy dużym stężeniu inhibitorów.

ZASTOSOWANIE WIEDZY O BIAŁKACH MMP I TIMP DO OPRACOWYWANIA NOWYCH PODEJŚĆ TERAPEUTYCZNYCH W LECZENIU NOWOTWORÓW

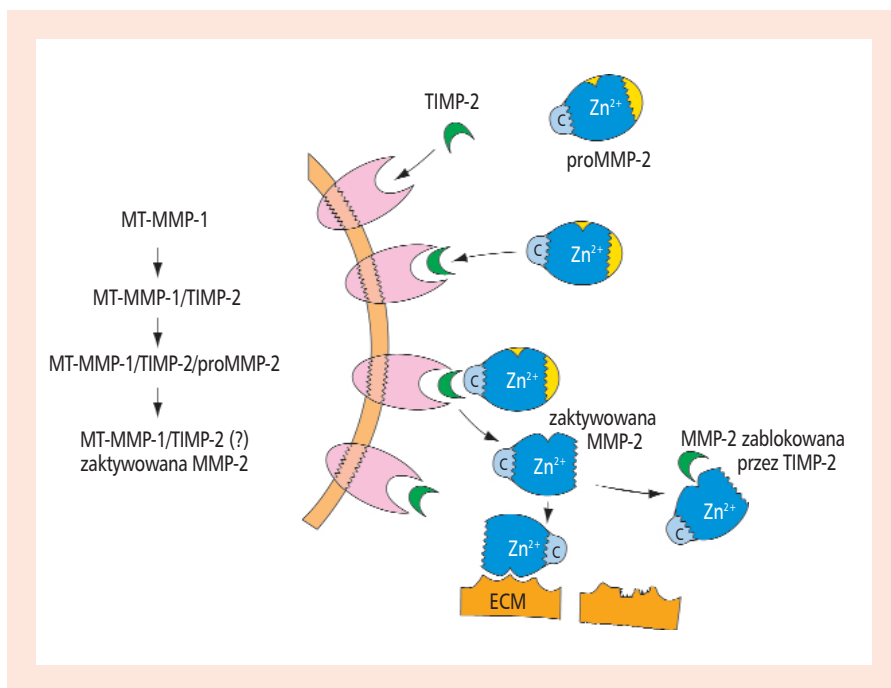
Podjęto już próby wykorzystania dotychczasowej wiedzy o roli białek MMP i TIMP w procesach inwazji nowotworów do opracowania potencjalnych leków działających jako czynniki przeciwinwazyjne. Jedną ze strategii proponuje użycie białkowych inhibitorów imitujących N-końcowy fragment MMP (propeptyd), który utrzymuje enzym w formie nieaktywnej. Zsyntetyzowano peptydy o sekwencjach: RCGVPDP-NH₂ (Arg, Cys, Gly, Val, Pro, Asp, Pro) i RCGVP-NH₂ (Arg, Cys, Gly, Val, Pro) wzorowanych na występującej u wszystkich MMP sekwencji w propeptydzie. Wykazano, iż te peptydy hamują aktywność

Tab. 1. Białka wchodzące w skład rodziny MMP

| Struktura cząsteczki MMP | Enzym | Masa cząsteczkowa | MMP# | Substraty |
|---|---|----------------------------|---------------------------|---|
|  | ŻELATYNAZY | | | |
| | Żelatynaza A Żelatynaza B | 72 000 92 000 | MMP-2 MMP-9 | Zdenaturowany kolagen, uaktywny kolagen typu IV, V, VII, X elastyna, fibronektyna |
|  | KOLAGENAZY | | | |
| | Fib-CL Kolagenaza-3 PMN-CL | 52 000 52 000 75 000 | MMP-1 MMP-13 MMP-8 | Kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X |
| | STROMIELIZYNY | | | |
|  | Stromielizyna-1 Stromielizyna-2 Stromielizyna-3 | 55 000 55 000 61 000 | MMP-3 MMP-10 MMP-11 | Białko rdzeniowe proteoglikanu, fibronektyna, laminina, kolagen typu IV, V, IX, X, elastyna |
| | Metaloelastaza | 54 000 | MMP-12 | Elastyna |
| | Matrylizyna | 28 000 | MMP-7 | Fibronektyna, laminina, kolagen typu IV, białko rdzeniowe proteoglikanu |
| | Błonowe MMP MT-MMP | 63 000 | MMP-14- MMP-18 | Kolagen Prożelatynaza A |
| | Domena transbłonowa | | | |



Ryc. 1. Ogólny schemat budowy białek z rodziny MMP



Ryc. 2. Mechanizm aktywacji i regulacji aktywności białka MMP-2

Białko TIMP-2 przyłącza się do zakotwiczonego w błonie białka MT-MMP-1, tworząc kompleks MT-MMP-1/TIMP-2. Kompleks ten służy następnie jako receptor dla latentnej formy MMP-2 (proMMP-2), która łączy się z nim przy udziale domeny C-końcowej. W ten sposób powstaje potrójny kompleks MT-MMP-1/TIMP-2/proMMP-2. Połączenie białka proMMP-2 z receptorem powoduje jego aktywację, przez odcięcie fragmentu białka na N-końcu (propeptydu), a następnie uwolnienie zaktywowanej formy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Nie wiadomo, czy po odłączeniu MMP-2, TIMP-2 pozostaje nadal połączony z białkiem MT-MMP-1. Aktywna forma MMP-2 może degradować białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Może również dojść do zahamowania aktywności MMP-2 przez przyłączenie się do niej cząsteczki TIMP-2.

stromielizyny ze współczynnikiem IC_{50} (stężenie inhibitora powodujące 50 proc. obniżenie aktywności enzymu) równym odpowiednio 5 i 11 μ M. Stwierdzono, że inwazyjność mierzona w badaniu *in vitro*, czyli zdolność komórek glejaka do przechodzenia przez filtr pokryty składnikami ECM, jest blokowana podaniem peptydu o sekwencji TMRKPRCGNP-DVAN (Thr, Met, Arg, Lys, Pro, Arg, Cys, Gly, Asn, Pro, Asp, Val, Ala, Asn). Pokazano również, iż egzogenne białko TIMP-1, dodane do hodowli komórek nowotworowych *in vitro*, w znacznym stopniu ogranicza ich inwazyjność. Wykazano także, że nadekspresja TIMP-1 po wprowadzeniu cDNA kodującego TIMP-1 w komórkach nowotworowych hodowanych *in vitro*, również zmniejsza inwazyjność ludzkiego gwiaździka.

Wyniki badań nad blokowaniem inwazyj-

ności komórek nowotworowych przez inhibitory MMP *in vitro* zachęciły do podjęcia badań *in vivo* na zwierzętach. Przykładem inhibitora testowanego *in vivo* jest chelator jonów cynku, blokujący centrum aktywne metaloproteaz, związek o nazwie Batimastat (BB94 firmy British Biotech). Wszczepiono myszom komórki ludzkiego raka okrężnicy. Pokazano, iż BB94 powoduje znaczące (o około 50 proc.) obniżenie wielkości guza pierwotnego u myszy, którym podawano BB94 – w stosunku do myszy kontrolnych, którym podawano sól fizjologiczną. Podawanie BB94 powodowało również zmniejszenie liczby przypadków inwazji z 67 proc. w grupie kontrolnej do 35 proc. w grupie, w której podawano BB94. U 6 na 20 myszy z grupy kontrolnej obserwowano przerzuty do płuc, wątroby,

otrzewnej, ściany brzucha, węzłów chłonnych. W grupie 20 myszy, którym podawano BB94, tylko w 2 przypadkach wykryto przerzuty do ściany brzucha. Obserwowana redukcja rozwoju nowotworu po podaniu BB94 przełożyła się na przedłużenie życia zwierząt z 110 dni w grupie kontrolnej do 140 dni w grupie zwierząt, którym podawano BB94. W czasie podawania Batimastatu nie obserwowano efektów ubocznych.

Najbardziej zaawansowane badania prowadzone są nad inhibitorem blokującym cynk w centrum aktywnym metaloproteaz, lekiem o nazwie Marimastat (BB-2516). Lek ten jest obecnie poddawany trzeciej fazie testów klinicznych. Testowano lek na 415 pacjentach z III lub IV stopniem złośliwości nowotworów jelita grubego, jajnika, trzustki i stercza. Pacjentom podawano różne dawki leku od 5 mg raz dziennie do 75 mg dwa razy dziennie przez 4 tygodnie. Badano wpływ Marimastatu na progresję nowotworu mierzoną ilością markerów nowotworowych we krwi. Procent pacjentów, u których obserwowano zahamowanie wzrostu ilości markerów nowotworowych, wzrastał liniowo od 10 do 41 proc. wraz ze wzrostem dawki leku. U tych pacjentów prawdopodobieństwo przeżycia (mierzone testem Kaplana-Meiera) było wyższe niż u pacjentów, u których nie obserwowano efektów działania Marimastatu. Większość pacjentów wykazała dobrą tolerancję leku.

PIŚMIENICTWO W REDAKCJI

ADRES DO KORESPONDENCJI

mgr Joanna Łapińska
Pracownia Neurobiologii Molekularnej
Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
im. M. Nenckiego
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa