

SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W MIGRACJI KOMÓREK

THE PLASMINOGEN ACTIVATION SYSTEM IN CELL MIGRATION

Elżbieta JAKUBISZYN¹, Piotr DZIĘGIEL², Maciej ZABEL²

¹Dolnośląskie Centrum Onkologii oraz

²Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej, Wrocław

Streszczenie: Od kilku dziesięcioleci uważa się, że aktywacja plazminogenu może odgrywać ważną rolę w inwazji guza i przerzutowaniu. Podstawą jest założenie, że aktywatory plazminogenu uwolnione z komórek nowotworowych katalizują proteolityczną konwersję nieaktywnego plazminogenu do aktywnej proteiny plazminy, która następnie katalizuje degradację białek w błonie podstawnej i macierzy pozakomórkowej (ECM), co ułatwia inwazję komórek nowotworowych do otaczających tkanek. Badania wykazały, że system aktywacji plazminogenu odgrywa także rolę w procesach związanych z nowotworową przebudową tkanek. Przykładem tego jest angiogeneza i desmoplazja, czyli stymulacja proliferacji fibroblastów i syntezy białek macierzy pozakomórkowej. W artykule omówiono budowę składników systemu aktywacji plazminogenu i ich rolę w adhezji, migracji i inwazji komórek nowotworowych, na podstawie wyników badań przeprowadzonych w hodowlach komórkowych. Następnie omówiono procesy zachodzące w guzie nowotworowym związane z systemem aktywacji plazminogenu i wpływ ekspresji poszczególnych składników na rokowanie w niektórych nowotworach u człowieka.

Słowa kluczowe: system aktywacji plazminogenu, migracja komórek, nowotwory.

Summary: For several decades, it has been assumed that plasminogen activation may play an important role in tumor invasion and metastasis. The basic idea is that plasminogen activators released from cancer cells catalyze the proteolytic conversion of the inactive zymogen plasminogen to the active proteinase plasmin, which in turn catalyzes degradation of proteins in basement membranes and extracellular matrix (ECM) and thus facilitates cancer cell invasion into the surrounding tissue. Studies have proved that plasminogen activation system also plays a role in processes connected with cancer cell-directed tissue remodelling. Examples of such processes are angiogenesis and desmoplasia, i.e. stimulation of fibroblast proliferation and extracellular matrix protein synthesis. In the text the structures of plasminogen activation system's elements and their role in cancer cells adhesion, migration and invasion based on experiments in cell culture model systems are described. Moreover, processes in cancer tumor involving plasminogen activation system and the role of components' expressions level in prognosis in selected human cancers are discussed.

Key words: plasminogen activation system, cell migration, cancer.

1. ELEMENTY SYSTEMU AKTYWACJI PLAZMINOGENU

System aktywacji plazminogenu wydaje się odgrywać istotną rolę w inwazji guza nowotworowego i przerzutowaniu. Dzieje się tak poprzez katalizowanie procesów proteolitycznych, degradację białek błony podstawnej i ECM, jak i udział w procesach nieproteolitycznych (np. inicjowanie kaskady wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnałów). System aktywacji plazminogenu uczestniczy również w nowotworowej przebudowie tkanek, która dotyczy komórek nienowotworowych, ale ma silny wpływ na wzrost guza nowotworowego i jego inwazję (angiogeneza, desmoplazja).

W skład systemu aktywacji plazminogenu wchodzi:

- plazminogen,
- plazmina,
- 2 typy aktywatorów plazminogenu, typ urokinazy (uPA) i typ tkankowy (tPA),
- receptor uPA (uPAR),
- 2 główne inhibitory aktywatorów plazminogenu: PAI-1 i PAI-2.

1.1. Plazminogen

Plazminogen jest proenzymem plazminy, o aktywności 10^4 do 10^6 mniejszej od plazminy. To jednołańcuchowe białko jest przekształcane do dwułańcuchowej plazminy przez proteolizę katalizowaną przez uPA lub tPA [4]. Plazminogen jest produkowany głównie w wątrobie, ale również w jądrach i komórkach naskórka. Receptory plazminogenu znajdują się na powierzchni różnych typów komórek, w tym monocytów krwi, granulocytów, limfocytów i komórek śródbłonna [18]. Interakcja plazminogenu z komórkowymi receptorami przyspiesza jego konwersję do plazminy, której aktywność enzymatyczna na powierzchni komórki jest wzmożona [1].

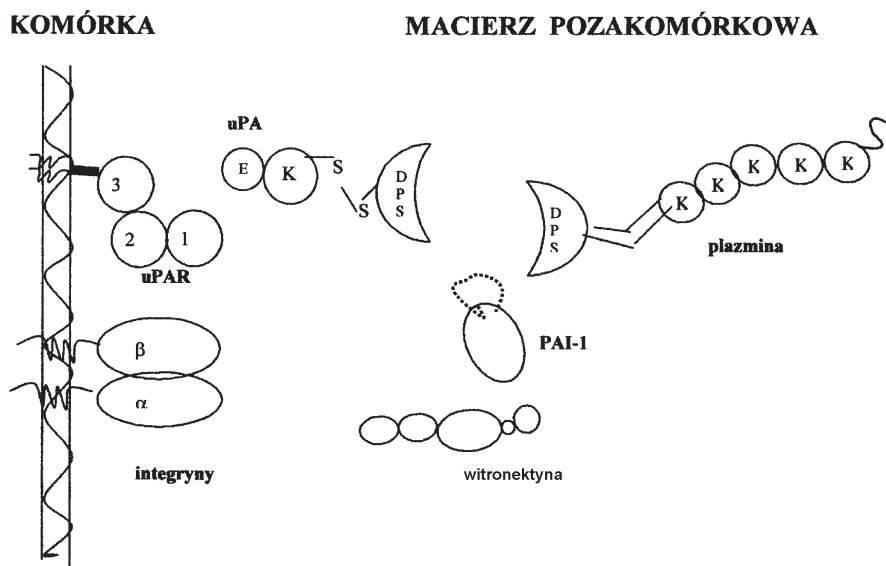
1.2. Plazmina

Plazmina jest to proteaza serynowa, składająca się z 2 łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Koniec aminowy łańcucha A zawiera 5 tzw. domen „kringle”. Koniec karboksylowy łańcucha B zawiera typową domenę proteazy serynowej, odpowiedzialną za jej właściwości katalityczne. Plazmina katalizuje hydrolizę wiązania peptydowego na końcu C między Lys i Arg [1,10]. Związana z powierzchnią komórki poprzez receptor plazmina katalizuje rozpad wielu substancji międzykomórkowych i cząsteczek błony podstawnej, takich jak: fibronektyna, laminina, witronektyna, fibryna i kolagen. Dochodzi do tego przez bezpośrednie działanie plazminy lub pośrednio przez aktywację zależnych od plazminy proteaz, takich jak pro-stromelizyny i prokolagenazy. Ponadto plazmina działa też na pojedyncze łańcuchy pro-uPA i uPA. Plazmina katalizuje również aktywację nieczynnej formy czynnika wzrostu TGF- β (*transforming growth factor- β*) i uwalnia bFGF (*basic fibroblast growth factor*) z miejsc jego połączenia z macierzą pozakomórkową. Plazmina może ponadto współuczestniczyć w aktywacji proenzymów metaloproteinaz macierzy (MMPs), których aktywacja prowadzi do dalszej degradacji i przebudowy ECM [10,17].

Angiostatyna, uważana za inhibitor angiogenezy, jest fragmentem plazminy, składającym się z „kringli” 1–3 lub 1–4. Angiostatyna zawiera przynajmniej jedną wolną grupę sulfhydrylową. *In vitro* wytwarzana jest z plazminogenu i plazminy przez elastazę trzustkową, metaloproteinazy i przez autoproteolizę plazminy [1].

1.3. Aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA)

Aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA) jest proteazą serynową wytwarzaną jako jednołańcuchowe białko (pro-uPA). Po sekrecji pro-uPA jest przekształcany do aktywnej dwułańcuchowej formy uPA przez rozszczepienie łańcucha peptydowego przez plazminę [4, 10,27]. Pro-uPA jest proenzymem o znacznie mniejszej zdolności do aktywacji plazminogenu niż uPA. Wydzielany pro-uPA łączy się z uPAR (specyficzny receptor dla uPA), a następnie jest aktywowany przez plazminę do uPA, który z kolei przekształca sąsiadujący, związany z błoną plazminogen do plazminy. Dwa łańcuchy uPA są połączone mostkami dwusiarczkowymi, a każda cząsteczka zawiera 3 funkcjonalne domeny. W obszarze końca karboksylowego łańcucha B znajduje się domena proteazy serynowej z pełną specyficzną aktywnością. Fragment końca aminowego łańcucha A, zawiera tzw. domenę „kringle”, która łączy białka oraz domenę GF podobną do naskórkowego czynnika wzrostu, a także obszar łączący. Tym samym cząsteczka uPA ma przynajmniej dwie całkowicie niezależne części: katalityczny łańcuch końca karboksylowego (domena proteazy serynowej) i niekatalityczny łańcuch końca aminowego, którego początkowa GF domena jest odpowiedzialna za specyficzne interakcje z uPAR [3,10]. Proteolityczne



RYCINA 1. Schematyczny rysunek składników systemu aktywacji plazminogenu i współdziałających z nim elementów okołokomórkowych

rozszczerzenie uPA w obszarze łączącym powoduje powstanie fragmentu aminoterminalnego (ATF) tzn. domeny GF i domeny „kringle” oraz małej cząsteczkowej formy uPA (*low molecular-weight uPA* – LMW-uPA) tzn. domeny proteazy serynowej i części łącznika [1,20].

Aktywność uPA jest kontrolowana przez PAI (specyficzny inhibitor) i internalizację. Oprócz plazminogenu, uPA bezpośrednio katalizuje konwersję nieaktywnej jednołańcuchowej formy czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i białka stymulującego makrofagi (MSP) do ich aktywnych form dwułańcuchowych. HGF i MSP mają sekwencję podobną do plazminy, ale są pozbawione aktywności proteolitycznej i działają przez połączenie się z receptorem typu kinazy tyrozynowej [20]. uPA jest produkowany przez nerki. Do fizjologicznych zjawisk, w których bierze udział uPA, należą: rozerwanie pęcherzyka jajnikowego podczas owulacji i implantacja blastocysty, inwolucja gruczołu piersiowego po laktacji, inwolucja prostaty po kastracji, gojenie ran [20]. Procesy te są w pewnym sensie podobne do inwazji raka, gdyż wiążą się z destrukcją błony podstawnej.

1.4. Aktywator plazminogenu typu tkankowego (tPA)

Aktywator plazminogenu typu tkankowego (tPA) jest białkiem wydzielanym przez komórki jako jednołańcuchowy prekursor. Plazmina przekształca prekursor przez rozszczerzenie wiązania peptydowego do aktywnej dwułańcuchowej formy. Łańcuchy są połączone pojedynczym wiązaniem dwusiarczkowym. Odmienne niż w uPA pojedynczy łańcuch tPA ma także znaczną aktywność (ale ok. 10 do 50 razy niższą niż forma dwułańcuchowa). Cząsteczka tPA składa się z czterech czynnościowo różnych domen:

- 1) końca aminowego znanego jako domena podobna do fibronektyny lub domena palca,
- 2) domeny podobnej do naskórkowego czynnika wzrostu,
- 3) domeny dwóch „kringle” (K1, K2),
- 4) domeny proteazy serynowej.

Trzy pierwsze domeny znajdują się w łańcuchu końca aminowego i mają właściwości modulujące dla enzymu [1]. Obecność specyficznych receptorów dla tPA stwierdzono m.in. w hepatocytach, mózgu, śródbłonku [20]. tPA ma wysokie powinowactwo do fibryny i jest aktywowany przez jej przyłączenie. Może to świadczyć, że główna biologiczna rola tPA jest związana z fibrynolizą. tPA jest produkowany przez śródbłonek naczyń i uwalniany do krwi.

1.5. uPAR (receptor uPA)

uPAR (receptor uPA) jest cząsteczką, zawierającą trzy bogate w cysteinę domeny połączone krótkim obszarem łączącym. Domena końca aminowego (D1) ma aktywność wiązania uPA; pozostałe dwie domeny (D2 i D3) przyłączają witronektynę. uPAR może też przyłączać integryny, w miejscach odmiennych od miejsc łączenia uPA i witronektyny [4,20]. Uważa się, że uPAR może być modulatorem funkcji integryn. uPAR łączy się z błoną komórkową przez kotwicę glikozylo-fosfatydylo-inozytolową [1]. Pro-uPA i uPA mają takie same powinowactwo do łączenia z uPAR. uPAR łączy się z domeną podobną do naskórkowego czynnika wzrostu (domena GF) cząsteczki uPA.

1.6. Inhibitory aktywatorów plazminogenu

Inhibitory aktywatorów plazminogenu (PAI) należą do rodziny inhibitorów proteazy serynowej (SERPIN) do podgrupy zawierającej argininę w reaktywnym centrum (arg-SERPIN) [1]. Wyróżniamy dwa inhibitory: PAI-1 i PAI-2.

1.6.1. PAI-1

PAI-1 jest jednołańcuchową glikoproteiną wydzielaną przez wiele typów komórek (m.in. płytki krwi, komórki śródbłonna, komórki guza). Oprócz roli bezpośredniej inaktywacji aktywatorów plazminogenu (reaguje zarówno z uPA, jak i tPA), PAI-1 związany w macierzy pozakomórkowej moduluje okołokomórkową proteolizę, wywołaną przez uPA związany z receptorem. PAI-1 bierze także udział w regulacji adhezji i migracji komórkowej, łącząc się z białkiem ECM – witronektyną [10,27].

1.6.2. PAI-2

PAI-2 jest jednołańcuchowym białkiem wytwarzanym m.in. przez monocyty, komórki trofoblastyczne, komórki guza. PAI-2 jest obecny w dużej ilości w osoczu kobiet ciężarnych. Jego właściwości inhibicyjne są 15 razy mniejsze niż PAI-1. Ogólnie PAI-2 określa się jako inhibitor pozakomórkowej proteazy serynowej uPA. Jednakże, większość nowosyntezowanego PAI-2 pozostaje wewnątrz komórki. Ostatnio postuluje się wewnątrzkomórkową rolę PAI-2 na podstawie obserwacji, że cytoplazmatyczna ekspresja PAI-2 chroni komórki przed apoptozą, w której pośredniczy TNF- α . PAI-2 może występować w dwóch formach: wydzielniczej i cytozolowej. Forma wydzielnicza uczestniczy w kontroli przebudowy tkankowej i w fibrylizacji. Forma cytozolowa gra ważną rolę w wewnątrzkomórkowej proteolizie w takich procesach, jak apoptoza i zapalenie [10,20].

1.7. Inne cząsteczki związane z systemem aktywacji plazminogenu

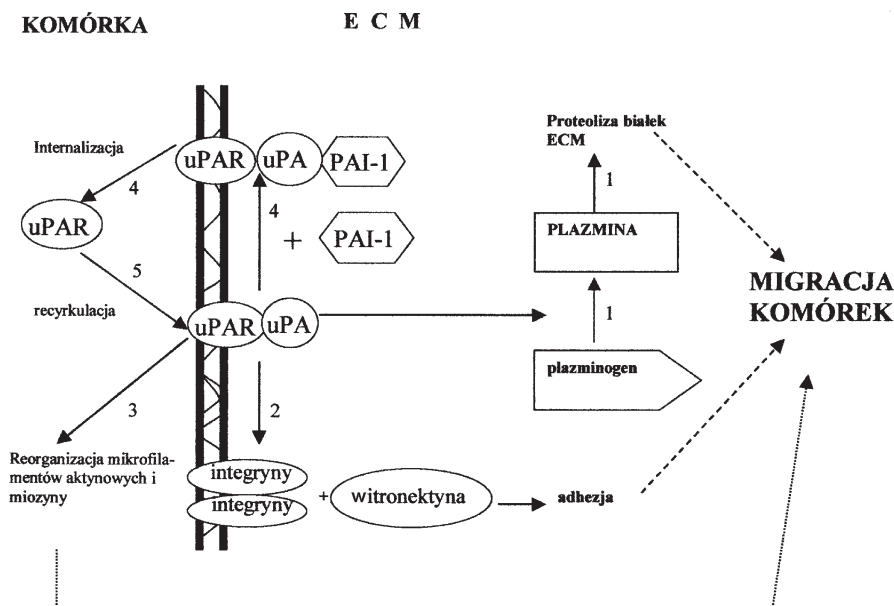
W procesach adhezji i migracji komórek składniki systemu aktywacji plazminogenu współdziałają z innymi cząsteczkami. Należą do nich: witronektyna i integryny.

1.7.1. Witronektyna

Witronektyna jest glikoproteiną obecną w osoczu krwi i pozanaczyniowo w macierzy pozakomórkowej. Przyczynia się ona do adhezji i rozprzestrzeniania się komórek. Koniec N witronektyny (domena somatomedyny B) łączy się zarówno z PAI-1, jak i uPAR, które konkurują ze sobą o przyłączenie [6]. Witronektyna przyłącza się również do integryn, obecnych w błonie komórkowej, które współzawodniczą o łączenie z PAI-1. Łączenie to następuje w miejscu sekwencji RGD (linijna sekwencja arginina-glicyna-asparaginian /Arg-Gly-Asp/) [1].

1.7.2. Integryny

Integryny są rodziną transbłonowych glikoprotein. Zbudowane są z łańcuchów α i β . Należą do cząsteczek odpowiedzialnych za adhezję komórek. Do ligandów integryn w macierzy pozakomórkowej należy wiele cząsteczek, np. kolagen, laminina, fibronektyna, witronektyna. Integryny łączą się z tymi cząsteczkami w miejscu sekwencji



RYCINA 2. Przyłączenie pro-uPA do jego receptora uPAR powoduje aktywację pro-uPA do uPA. Kompleks uPA-uPAR (1) powoduje przejście plazminogenu w aktywną plazminę, która proteolizuje białka ECM; (2) moduluje funkcję integrzyn umożliwiając im wiązanie się z niektórymi składnikami ECM, np. witronektyna; (3) aktywuje procesy wewnątrzkomórkowe mające wpływ na reorganizację mikrofilamentów aktywnych i miozyny. Wszystkie te trzy procesy umożliwiają migrację komórek. W przypadku komórek nowotworowych prowadzi to do naciekania podścieliska i umożliwia przerzutowanie. Przyłączenie PAI-1 do kompleksu uPA-uPAR powoduje inaktywację kompleksu i prowadzi do jego internalizacji (4). Cząsteczka uPAR może podlegać recyrkulacji i powracać do błony komórkowej (5)

RGD. Wewnątrzkomórkowo integrzyny łączą się poprzez układ wielu białek z mikrofilamentami aktywnymi. To połączenie integrzyn, poza- i wewnątrzkomórkowo, umożliwia poruszanie się komórki dzięki systemowi mikrofilamentów aktywnych i miozynowych przy jednoczesnym umocowaniu w macierzy pozakomórkowej.

2. SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W HODOWLACH KOMÓRKOWYCH

Łączenie z uPAR powoduje akumulację pro-uPA i uPA na powierzchni komórek. Badania immunocytochemiczne na hodowlach komórkowych wykazały, że uPAR i jego kompleksy z pro-uPA i uPA gromadzą się często w specyficznych miejscach – obszarze kontaktu komórek z podłożem. W czasie migracji komórek uPAR zwykle ulega koncentracji na prowadzącym brzegu komórki. Tym samym lokalizacja uPAR wydaje się mieć charakter dynamiczny. Aktywacja pro-uPA związanego z uPAR na powierzchni komórki przebiega dużo szybciej niż aktywacja niezwiązanego pro-uPA.

Aktywny uPA związany z uPAR na powierzchni komórki katalizuje aktywację plazminogenu dużo bardziej wydajnie niż niezwiązany uPA. To wzmocnienie aktywacji pro-uPA i aktywacji plazminogenu przez uPA wydaje się być spowodowane przez akumulację plazminogenu na powierzchni komórki. Najbardziej oczywistą konsekwencją okołokomórkowego wytwarzania plazminy jest degradacja fibryny i innych białek macierzy pozakomórkowej [1].

W hodowlach komórkowych PAI-1 jest związany z witronektyną w podłożu. Połączenie PAI-1 z witronektyną może chronić witronektynę przed degradacją spowodowaną przez uPA.

Dużo uwagi poświęca się przypuszczeniu, że kompleks uPA-uPAR może aktywować wewnątrzkomórkową kaskadę przenoszenia sygnałów, bez wytwarzania plazminy. Proces zostaje zainicjowany przez przyłączenie uPA do uPAR, co aktywuje różne kinazy i dalej czynniki transkrypcyjne, które z kolei mogą wpływać poprzez aktywację syntezy odpowiednich białek na strukturę cytoszkieletu, adhezję komórek i ich migrację [10,20]. Kompleks uPAR-uPA reaguje z PAI-1; następnie może ulegać internalizacji, czyli endocytozie kompleksów [2,10]. Do endocytozy dochodzi przez przyłączenie kompleksu do receptorów endocytozy z rodziny LDLR (receptorów lipoproteinowych o małej gęstości). uPAR podlega recyrkulacji i może powracać na powierzchnię komórki [1,10,27].

Klasyczną rolą plazminogenu jest przeciwdziałanie adhezji komórka-podłoże i komórka-komórka, ponieważ okołokomórkowe powstanie plazminy prowadzi do degradacji receptorów adhezji i ich ligandów w macierzy pozakomórkowej.

W regulacji adhezji komórek może mieć też udział zainicjowanie kaskady sygnałów wewnątrzkomórkowych przez kompleks uPA-uPAR oraz regulacja funkcji integryn przez ten kompleks, do której prawdopodobnie dochodzi przez bezpośredni pozakomórkowy kontakt uPAR-integriny [1]. uPAR może być również receptorem adhezji, gdyż ma zdolność łączenia witronektyny. Proces ten jest stymulowany przez uPA, którego przyłączenie do uPAR powoduje zmiany przestrzenne w jego strukturze, eksponujące miejsce wiązania z witronektyną, czyli uPA stymuluje łączenie uPAR-witronektyna [20].

2.1. Migracja komórek

Migracja komórek jest definiowana jako poruszanie się komórek przez podłoże macierzy pozakomórkowej, obejmuje jej rozciągnięcie i przyłączenie integryn lub innych receptorów adhezji do ich ligandów w macierzy (takich jak witronektyny) przy prowadzącym brzegu komórki. Adhezja komórka-macierz przy jej brzegu prowadzącym daje siłę napędową do pociągnięcia komórki do przodu, siła mechaniczna jest wytwarzana przez układ aktyna-miozyna. Rozszczepienie kompleksu integriny/ligand umożliwia retrakcję pozostającej części komórki [1].

uPA może stymulować migrację komórek drogą proteolityczną i nieproteolityczną. W pierwszym przypadku ma to miejsce przez katalizowanie wytwarzania plazminy, która powoduje degradację białek macierzy pozakomórkowej i receptorów adhezji, co ułatwia uwalnianie pozostającej części komórki [3].

W przypadku stymulacji nieproteolitycznej efekt ten może zależeć od wzmocnienia przez uPA adhezji na brzegu prowadzącym komórki przez stymulację łączenia uPAR-

witronektyna [3], od aktywacji kaskady wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów w prowadzącym brzegu komórki [20] oraz od regulacji aktywności łączenia integryn. Do stymulacji może też dochodzić przez wiązanie z PAI-1, co powoduje uwolnienie jego połączenia z witronektyną i znosi jego inhibicję w stosunku do łączenia integryn i witronektyny [1,3].

PAI-1 może wpływać hamująco lub stymulująco na migrację komórek. Zależy to od hamującego wpływu PAI-1 na wiązanie integryn z witronektyną i relatywnego udziału tego wiązania w migracji komórek [5]. PAI-1 może też hamować migrację komórek przez inhibicję katalizowanego przez uPA wytwarzania plazminy [3].

2.2. Inwazja komórek w hodowlach komórkowych

Różne badania w hodowlach komórkowych wykazały, że wytwarzanie plazminy, katalizowane przez połączenie uPA z uPAR na powierzchni komórek inwazyjnych jest czynnikiem wpływającym na szybkość inwazji w wielu typach komórek. Badania te wykonano przy użyciu testów oceniających inwazję w hodowlach komórkowych, takich jak np. test na inwazję w izolowanej ludzkiej błonie owodniowej, w żelu fibrynowym i kolagenowym i w innych rodzajach odtworzonej ECM (tzw. Matrigel). Obserwowano, że PAI-2 zawsze hamuje inwazję. Obserwacje dotyczące PAI-1 są bardziej różnorodne. Ta niejednorodność obserwowanych efektów działania PAI-1 może mieć związek z inhibującym wpływem na inwazję nadmiernej aktywacji plazminogenu. Mimo że wysoki poziom PAI-1 może chronić macierz pozakomórkową przed proteolizą zależną od aktywacji plazminogenu i w ten sposób hamować inwazję, to niski poziom PAI-1 może być potrzebny do ochrony białek macierzy pozakomórkowej niezbędnych do migracji komórek. Wpływ PAI-1 na inwazję wydaje się być zależny od ekspresji innych składników systemu aktywacji plazminogenu w komórkach inwazyjnych, od receptorów endocytozy, integryn i składu macierzy pozakomórkowej [1].

3. SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH I PATOFIZJOLOGICZNYCH NIENOWOTWOROWYCH – BADANIA NAD MYSZAMI Z BRAKAMI SPECYFICZNYCH GENÓW

Badania te wykazały, że u myszy plazminogen $-/-$ oraz u myszy uPA $-/-$ i tPA $-/-$ powstają rozsiane złogi fibryny wewnątrz- i pozanaczyniowo, powodując rozległe uszkodzenia narządów, niską wagę ciała i krótki czas życia. Dlatego uważa się, że fibrynoliza może być krytyczną i być może jedyną istotną fizjologiczną funkcją aktywacji plazminogenu [1]. U myszy uPA $-/-$ i myszy plazminogen $-/-$ stwierdzono upośledzoną rekrutację leukocytów do miejsca infekcji. uPA i jego prekursorzy mogą stymulować chemotaksję różnych typów komórek, np. leukocytów, neutrofilii i makrofagów [1]. U myszy uPA $-/-$ w ciągu pierwszych trzech dni życia naskórek proliferuje znacznie wolniej niż naskórek normalnej myszy. Proliferacja normalizuje się do 5 dnia życia, a potem stopniowo zmniejsza

się z wiekiem, podobnie jak u myszy normalnej, do bardzo niskiego poziomu charakterystycznego dla dojrzałego naskórka. Dla kontrastu naskórek myszy tPA^{-/-} wykazuje normalną proliferację w każdym okresie życia. Mechanizm, w którym uPA promuje proliferację naskórka, nie jest jasny. Jedną z możliwości jest, że uPA łącząc się z receptorem uPAR stymuluje transdukcję sygnałów. Inna hipoteza zakłada, że następuje odszczepienie czynnika wzrostu hepatocytów, który jest mitogenem dla keratynocytów. HGF jest przekształcany do swojej aktywnej formy bezpośrednio przez uPA [22].

Wyniki tych obserwacji ukazują, że system aktywacji plazminogenu może pełnić fizjologiczne role niezwiązane z fibrylizacją.

4. SYSTEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU W EKSPERYMENTALNYM TWORZENIU PRZERZUTÓW U ZWIERZĄT

Wiele eksperymentów na zwierzętach wykazało, że wytwarzanie plazminy katalizowane przez uPA odgrywa istotną rolę w procesie tworzenia przerzutów. Aby ułatwić ten proces, uPA musi być związane z uPAR.

Ekspresja PAI-2 w komórkach raka hamuje tworzenie przerzutów [1]. Brak spójnych wyników dotyczących PAI-1. Istnieją badania wykazujące upośledzenie zdolności przerzutowania po iniekcji zwierzętom PAI-1, jak i takie, które wykazują udział PAI-1 w inwazji komórek raka i angiogenezie.

Angiostatyna hamuje wzrost guza pierwotnego i tworzenie przerzutów u zwierząt przez inhibicję angiogenezy guza, która następuje przez hamowanie migracji komórek śródbłonna i ich proliferacji [1].

5. PROCESY ZACHODZĄCE W GUZIE NOWOTWOROWYM ZWIĄZANE Z SYSTEMEM AKTYWACJI PLAZMINOGENU

Sytuacja w guzie *in vivo* jest dużo bardziej skomplikowana niż w hodowlach komórkowych, służących do badania roli systemu w migracji komórek i inwazji. W guzie nie tylko komórki nowotworowe, ale też komórki niezłośliwe mają właściwości migracyjne i inwazyjne, co jest związane z procesem przebudowy tkanek wywołanym przez komórki raka. System aktywacji plazminogenu może uczestniczyć we wzroście guza, inwazji i tworzeniu przerzutów biorąc udział w takich właśnie procesach. W celu zidentyfikowania procesów zachodzących w guzie, w których uczestniczy system aktywacji plazminogenu, stosuje się immunohistochemię i hybrydyzację *in situ*, uwidaczniając komórki wykazujące ekspresję poszczególnych składników systemu. Ograniczeniem takich badań jest fakt, że niekoniecznie musi istnieć korelacja między ilością określonego białka w określonym miejscu i jego funkcjonalnym znaczeniem w tej lokalizacji. Wyniki poszczególnych badań różnią się między sobą. Jednak ogólną

regułą jest, że każdy z elementów systemu wykazuje ekspresję nie tylko w jednym typie komórek i że wzory ekspresji w różnych typach guzów są odmienne. Lokalizacja poszczególnych elementów może się różnić w poszczególnych guzach w tej samej tkance, zależnie od stopnia ich zróżnicowania [1].

Obecność elementów systemu aktywacji plazminogenu w komórkach raka sugeruje ich funkcję w migracji i inwazji komórek raka, ich obecność w fibroblastach podścieliska – ich rolę w desmoplazji i przebudowie podścieliska, natomiast obecność w komórkach śródbłonna – rolę w angiogenezie.

Różna ekspresja PAI-1 przez różne typy komórek i w różnych typach tkanek może być związana z zależną od nowotworu przebudową tkanek, przez umożliwienie odkładania nowej macierzy pozakomórkowej, np. podczas angiogenezy, w obszarach tkanek o dużej aktywności uPA [1].

6. EKSPRESJA ELEMENTÓW SYSTEMU AKTYWACJI PLAZMINOGENU W GUZIE I ROKOWANIE CHORYCH

Ekspresja uPA, PAI-1 i uPAR w złośliwych guzach u człowieka jest znacząco wyższa niż w odpowiadających im tkankach normalnych [13], jednak ich ekspresja w określonym typie guza różni się znacząco między poszczególnymi pacjentami.

U chorych z dużą ekspresją uPA w komórkach guza stwierdzono krótszy czas wolny od choroby i krótszy całkowity czas przeżycia w porównaniu z chorymi, u których ta ekspresja była niska. Niekorzystna rokowniczo wydaje się być również wysoka ekspresja PAI-1 i uPAR. Odwrotnie, ekspresja tPA korelowała z dobrym rokowaniem [7].

Wysoki poziom ekspresji uPA obserwowano zarówno w ludzkich guzach, jak i liniach komórkowych z raków pęcherza, piersi, płuca [17], prostaty [12], jelita grubego [2,15], jajnika [25,29] i płaskonabłonkowym raku jamy ustnej [16]. Podwyższona ekspresja uPA i PAI-1 w rakach jajnika i piersi korelowała z większą inwazyjnością, częstością wznów, krótszym czasem przeżycia [6,25,26,27,29]. W raku piersi wykazującym wysoką ekspresję uPA obserwowano zwiększone ryzyko wczesnych wznów i złe rokowanie ze względu na wczesne przerzuty [6,9,11,24]. Podobnie gorsze rokowanie miały chore na raka piersi z niską ekspresją tPA [7]. W raku piersi *in situ* (DCIS) wysoka ekspresja uPAR znacząco korelowała z nawrotem choroby [14]. Progresja guza i wznowy związane były z wysoką ekspresją uPA w raku pęcherza.

PODSUMOWANIE

Hipoteza, że aktywacja plazminogenu jest czynnikiem ograniczającym inwazję guza i tworzenie przerzutów, znalazła potwierdzenie w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo*. Rosnąca wiedza na ten temat wykazała, że system działa w sposób dużo bardziej skomplikowany, niż zakładano. Wiele wyników sugeruje, że oprócz funkcji zależnych od plazminy (tj. degradacji białek błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej, co

ułatwia inwazję komórek nowotworowych do otaczających tkanek), system aktywacji plazminogenu pełni też funkcje niezależne od plazminy. Na funkcje te składa się: inicjowanie przez połączenie uPA z uPAR kaskady wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnałów; działanie uPAR jako receptora witronektyny i regulatora funkcji integryn; działanie PAI-1 jako regulatora uPAR i łączenia integryn z witronektyną; interakcje z receptorami endocytozy.

Dynamiczny stan systemu umożliwia przestrzenną i czasową reorganizację jego składników na powierzchni komórek podczas ich migracji i inwazji. Co więcej, staje się pewne, że system spełnia wiele funkcji w biologii guza. Wydaje się, że odgrywa rolę nie tylko w migracji i inwazji komórek raka, ale i w przebudowie otaczających tkanek. Przykładem takich procesów jest angiogeneza i desmoplazja, czyli stymulacja proliferacji fibroblastów i syntezy białek macierzy pozakomórkowej. Procesy te, mimo że obejmują migrację i inwazję komórek nienowotworowych, mają silny wpływ na wzrost guza i inwazję, co może mieć duże znaczenie w całym procesie przerzutowania.

Specjalny problem istnieje w rozumieniu roli PAI-1 w biologii guza. Nieoczekiwane obserwacje, że PAI-1 jest markerem złej prognozy, stało się bodźcem do wielu badań, jednak nie wypracowano jednolitej hipotezy o roli PAI-1.

Niektóre obserwacje wskazują, że PAI-1 może przeciwdziałać migracji i inwazji przez hamowanie uPA, chroniąc macierz pozakomórkową przed proteolizą zależną od aktywacji plazminogenu i w ten sposób hamować inwazję. Inne popierają hipotezę, że PAI-1 jest niezbędny dla optymalnego działania systemu w tych procesach przez regulację adhezji komórek i ograniczanie proteolizy w czasie i w przestrzeni.

Ostatnie wyniki sugerują, że PAI-1, którego ekspresję wykazano w komórkach nienowotworowych, odgrywa rolę we wzroście guza i jego rozprzestrzenianiu przez ochronę nowej macierzy pozakomórkowej, powstałej podczas przebudowy tkanek, np. podczas angiogenezy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDREASEN PA, EGELUND R, PETERSEN HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *CMLS, Cell Mol Live Sci* 2000; **57**: 25–40.
- [2] BAKER EA, LEAPER DJ. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 981–988.
- [3] BLASI F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunology Today* 1997; **18**: 415–417.
- [4] BLASI F, VASSALLI JD, DANO K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol* 1987; **104**: 801–804.
- [5] CHAZAUD B, RICOUX R, CHRISTOV C, PLONQUET A, GHERARDI RK, BARLOVATZ-MEIMON G. Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol* 2002; **160**: 237–246.
- [6] CIANFROCCA M, GOLDSTEIN LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist* 2004; **9**: 606–616.
- [7] CORTE MD, VEREZ P, RODRIGUEZ JC, ROIBAS A, DOMINGUEZ ML, LAMELAS ML, VAZGUEZ J, MUNIZ JLG, ALLENDE MT, GONZALEZ LO, FUEYO A, VIZOSO F. Tissue-type plasminogen activator (tPA) in breast cancer: relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* 2005; **90**: 33–40.

- [8] DENG A, CURRIDEN S.A., WANG S, ROSENBERG S, LOSKUTOFF DJ. Is Plasminogen Activator Inhibitor-1 the Molecular Switch That Governs Urokinase Receptor-mediated Cell Adhesion and Release? *J Cell Biol* 1996; **134**: 1563–1571.
- [9] DUBLIN E, HANBY A, PATELN K, LIEBMAN R, BARNES D. Immunohistochemical Expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in Breast Carcinoma. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1219–1227.
- [10] DUFFY MJ, DUGGAN C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clinical Biochemistry* 2004; **37**: 541–548.
- [11] FOEKENS JA, PETERS HA, LOOK MP, PORTENGEN H, SCHMITTM, KRAMER MD, BRUNNER N, JANICKE F, MEIJER-VAN GELDER ME, HENZEN-LOGMANS S, VAN PUTTEN WLJ, KLIJN JGM. The Urokinase System of Plasminogen Activation and Prognosis in 2780 Breast Cancer Patients. *Cancer Res* 2000; **60**: 636–643.
- [12] GAVRILOV D, KENZIOR O, EVANS M, CALALUCE R, FOLK WR. Expression of urokinase plasminogen activator and receptor in conjunction with the *ets* family and AP-1 complex transcription factors in high grade prostate cancers. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 1033–1040.
- [13] GHISO JAA, ALONSO DF, FARRIAS EF, GOMEZ DE, BAL DE KIER JOFFE E. Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 295–304.
- [14] GUYTON DP, EVANS DM, SLOAN-STAKLEFF KD. Urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR): A Potential Indicator of Invasion for *in situ* Breast Cancer. *The Breast Journal* 2000; **6**: 130–136.
- [15] HARVEY SR, SAIT SNJ, YAN XU, BAILEY JL, PENETRANTE RM, MARKUS G. Demonstration of Urokinase Expression in Cancer Cells of Colon Adenocarcinomas by Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization. *AJP* 1999; **155**: 1115–1120.
- [16] HUNDDSDORFER B, ZEILHOFER HF, BOCK KP, DETTMAR P, SCHMITT M, HORCH HH. Comparison of urokinase-type plasminogen activators (uPA) and plasminogen activator inhibitors (PAI-1) in primary resection of oral squamous cell carcinoma. *Mund Kiefer Gesichtsschir* 2004; **8**: 180–190.
- [17] HE CH, HE P, LIU LP, ZHU YS. Analysis of expressions of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; **127**: 180–186.
- [18] HILDENBRAND R, GLIENKE W, MAGDOLEN V, GRAEFF H, STUTTE HJ, SCHMITT M. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 1998; **110**: 27–32.
- [19] HILDENBRAND R, LEITZ M, MAGDOLEN V, LUTHER T, ALBRECHT S, GRAEFF H, STUTTE HJ, BLEYL U, SCHMITT M. Validation of immunolocalization of the urokinase receptor expression in ductal carcinoma *in situ* of the breast: comparison with detection by non-isotopic *in-situ* hybridization. *Histopathology* 2000; **36**: 499–504.
- [20] IRIGOYEN JP, MUNOZ-CANOVES P, MONTERO L, KOZICZAK M, NAGAMINEY. The plasminogen activator system: biology and regulation. *CMLS, Cell Mol Live Sci* 1999; **56**: 104–132.
- [21] ITOH T, HAYASHI Y, KANAMARU T, MORITA Y, SUZUKI S, WANG W, ZHOU L, RUI JA, YAMAMOTO M, KURODA Y, ITOH H. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterology and Hepatology* 2000; **15**: 422–430.
- [22] JENSEN P, LAVKER RM. Urokinase is a Positive Regulator of Epidermal Proliferation *in vivo*. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 240–244.
- [23] LANZA F, CASTOLDI GL, CASTAGNARI B, TODD III RF, MORETTI S, SPISANIS, LATORRACA A, FOCARILE E, ROBERTI MG, TRANIELLO S. Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukaemic cells. *Brit J Haematol* 1998; **103**: 110–123.
- [24] LOOK MP, van PUTTEN WL, DUFFY MJ, HARBECK N, CHRISTENSEN IJ, THOMSEN C. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 116–128.
- [25] O TOOLE S, MCGUINNESS E, SHEPPARD B, BONNAR J. Plasminogen activators and inhibitors in ovarian adenocarcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 1999; **9**: 61–66.
- [26] PEDERSEN AN, CHRISTENSEN IJ, STEPHENS RW, BRIAND P, MOURIDSEN HT, DANOK, BRUNNER N. The Complex between Urokinase and Its Type-1 Inhibitor in Primary Breast Cancer: Relation to Survival. *Cancer Res* 2000; **60**: 6927–6934.
- [27] PEDERSEN AN, MOURIDSEN HT, TENNEY DY, BRUNNER N. Immunoassays of urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in detergent extracts of breast cancer tissue. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 899–908.

- [28] ROMER J, PYKE CH, LUND LR, RALFKIAER E, DANO K. Cancer Cell Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor mRNA in Squamous Cell Carcinomas of the Skin. *J Invest Dermatol* 2001; **116**: 353–358.
- [29] TECIMER C, DOERING DL, GOLDSMITH LJ, MEYER JS, ABDULHAY G, WITTLIFF JL. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor type 1 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; **10**: 372–381.
- [30] THEWES M, ELSNER E, WESSNER D, ENGST R, RING J. The urokinase plasminogen activator system in angiosarcoma, granuloma pyogenicum, and angioma: an immunohistochemical study. *Internat J Dermatol* 2000; **39**: 188–191.
- [31] ZHOU L, HAYASHI Y, ITOH T, WANG W, AN RUI J, ITOH H. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in hepatocellular carcinoma. *Pathology Internat* 2000; **50**: 392–397.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.11.2005 r.

Przyjęto: 10.01.2006 r.

53-644 Wrocław, ul. Zachodnia 14/9

e-mail: elzbieta.jak@wp.pl