

**METALOPROTEINAZA 9 (MMP-9)
JAKO SZCZEGÓLNY PRZEDSTAWICIEL METALO-
PROTEINAZ MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ:
ROLA W NAPŁYWIE I APOPTOZIE NEUTROFILII
W TRAKCIE REAKCJI ZAPALNEJ***

METALLOPROTEINASE 9 (MMP-9) AS A UNIQUE MEMBER
OF THE MATRIX METALLOPROTEINASE FAMILY:
ROLE IN INFLUX OF NEUTROPHILS AND THEIR APOPTOSIS
DURING INFLAMMATION

Elżbieta KOŁACZKOWSKA

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) to endopeptydazy zależne od jonów Zn^{2+} . Enzymy te mają zdolność do degradacji białek budujących błony podstawne oraz macierz zewnątrzkomórkową co umożliwia przebudowę tkanek oraz przemieszczanie się komórek, zarówno w przebiegu procesów fizjologicznych, stanów zapalnych, jak i chorób nowotworowych. Wśród licznych podrodzin MMP wyodrębnia się podrodzinę żelatynaz, do których należy żelatynaza A (MMP-2) i żelatynaza B (MMP-9). Enzymy te mają najbardziej skomplikowaną budowę spośród MMP i podobne spektrum substratów, jednak wykazują różną ekspresję – konstytutywną w przypadku MMP-2 i (zazwyczaj) indukowalną metaloproteiny 9. Wyjątkowość MMP-9 przejawia się ponadto w zdolności tego enzymu do regulacji aktywności czynników wzrostu, cytokin, a zwłaszcza chemokin. Stworzenie myszy transgenicznych z wyłączonym genem kodującym żelatynazę B (MMP-9^{-/-}) przyczyniło się do odkrycia także fizjologicznych funkcji MMP-9, w tym związanych z rozmnażaniem, funkcjonowaniem układu nerwowego, rozwojem kości, przebudową naczyń krwionośnych, gojeniem ran oraz procesami zachodzącymi w grasicy. Ponadto badania na myszach MMP-9^{-/-} pozwoliły na szczegółowe poznanie roli tego enzymu w zapaleniu. Wykazano, że oprócz zaangażowania w procesy związane z napływem leukocytów zapalnych, głównie neutrofilii, MMP-9 uczestniczy także na późnych etapach zapalenia w apoptozie tych komórek. Równocześnie wykazano, że w niektórych przypadkach MMP-9 ogranicza napływ neutrofilii przez degradację chemokin. Opisano również rozwój mechanizmów kompensujących brak tego enzymu u myszy MMP-9^{-/-}. Wszystkie powyższe cechy powodują, że żelatynaza B jest jednym z enzymów kluczowych dla rozwoju i przebiegu reakcji zapalnej.

Słowa kluczowe: metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, MMP-9, żelatynaza B, reakcja zapalna, neutrofile, apoptoza, myszy transgeniczne.

*Praca finansowana z K/ZDS/000784.

Summary: Matrix metalloproteinase (MMP) family consists of Zn^{2+} -dependent endopeptidases. The enzymes degrade structural proteins of basement membranes and extracellular matrix facilitating tissue remodeling and cell mobility thus phenomena accompanying physiological and inflammatory processes as well as cancer diseases. One of the subgroups among MMPs is a subfamily of gelatinases consisting of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9). The two enzymes are characterized by the most complicated structure among MMPs and similar spectrum of substrates, however, they show different expression – constitutive in case of MMP-2 and (usually) inducible of MMP-9. Moreover, one of distinguished features of MMP-9 is the capacity to regulate cytokine and chemokine activity. Bioengineering of transgenic mice deficient in gelatinase B (MMP-9^{-/-}) revealed also physiological functions of MMP-9, for example in reproduction, functioning of nervous system, bone development, remodelling of blood vessels, wound healing and some processes occurring in thymus. Moreover, studies on MMP-9^{-/-} mice allowed for detailed studies of the role of the enzyme in inflammation. It was shown that apart from its role in tissue infiltration by inflammatory leukocytes (mostly neutrophils), during late stages of inflammation MMP-9 also participates in apoptosis of the cells. Furthermore, it was reported that in certain circumstances MMP-9 might limit neutrophil infiltration by degradation of various chemokines. In addition development of compensatory mechanisms was reported to operate in MMP-9^{-/-} mice. Thus overall MMP-9 is one of the key enzymes in the development and the course of inflammation.

Key words: matrix metalloproteinase (MMP) family, gelatinase B, transgenic mice, inflammation, neutrophils.

WPROWADZENIE

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej – MMP (ang. *matrix metalloproteinases*) zależne od Zn^{2+} endopeptydazy – to grupa enzymów uczestniczących w degradacji białek błon podstawnych i macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulacji aktywności cytokin i chemokin, a co za tym idzie umożliwiającą przemieszczanie się leukocytów i regulujących przebieg procesów immunologicznych. Prawidłowe funkcjonowanie MMP jest również bardzo ważne dla przebiegu procesów fizjologicznych, takich jak: przebudowa tkanek w trakcie embriogenezy, rozwój kości i zębów, procesy związane z rozmnażaniem i gojeniem ran. MMP-9 (żelatynaza B) jest szczególnym członkiem rodziny MMP zarówno ze względu na najbardziej skomplikowaną budowę, jak i szeroki zakres funkcji, w tym w reakcji zapalnej. Przy braku selektywnych inhibitorów żelatynazy B jednym z najważniejszych narzędzi badawczych stosowanym w celu poznania jej funkcji są myszy transgeniczne niewytwarzające tego enzymu. Dzięki badaniom na myszach MMP-9^{-/-} nie tylko poznano liczne funkcje żelatynazy B, ale także odkryto powiązania pomiędzy poszczególnymi MMP oraz innymi enzymami zaangażowanymi w proces zapalny.

ODKRYCIE METALOPROTEINAZ

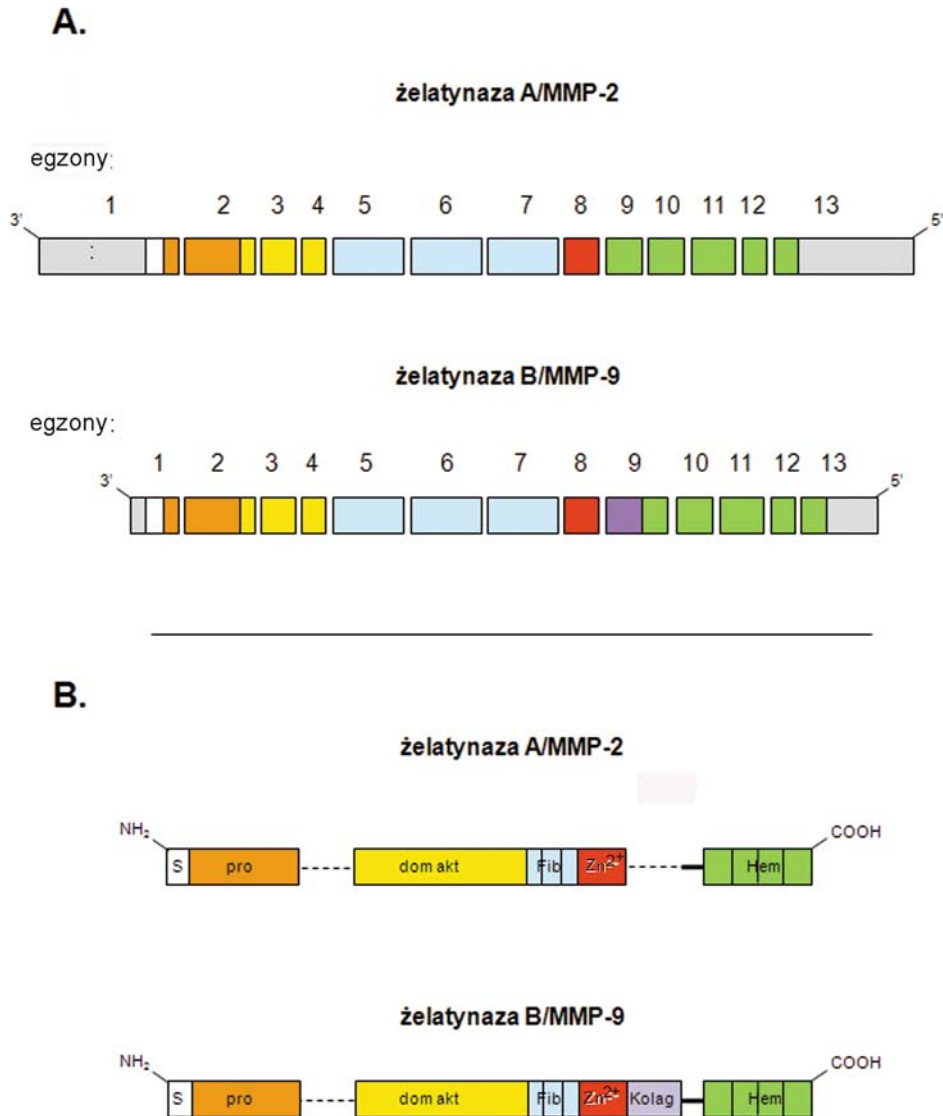
MMP zostały odkryte w trakcie badań nad metamorfozą kijanek w 1962 roku, kiedy to Jerome Gross i Charles M. Lapiere opisali enzym rozkładający potrójną helisę włókien kolagenu [33]. Z czasem enzym ten nazwano kolagenazą, a gdy zaczęto odkrywać kolejne enzymy o podobnej aktywności i budowie, został on nazwany metaloproteinazą 1 (MMP-1). Nazwa metaloproteiny macierzy zewnątrz-

komórkowej (nadana ze względu na obecność atomu cynku w ich cząsteczce oraz jedyną znaną wówczas funkcję) została wprowadzona dopiero w 1989 roku na pierwszym zjeździe naukowym w Sandestin Beach (Floryda, USA) poświęconym tej grupie enzymów, na którym ustalono także nomenklaturę MMP [11,69]. Izolacja pierwszej metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, MMP-1, udało się dopiero w 1970, a dokonał tego John Jeffrey ze współpracownikami [6]. W rok później stwierdzono, że MMP są produkowane i wydzielane w formie nieaktywnych zymogenów [35], ale dopiero w roku 1990 opisano mechanizm ich aktywacji, tzw. *cysteine switch* [101]. Obecnie w zasobach literaturowych funkcjonuje 28 różnych MMP, jednak cząsteczki początkowo opisane jako MMP-4, -5 i -6 zostały wycofane, a z kolei kilku kolejnym MMP nie przyznano (jeszcze) numeru [28]. MMP historycznie dzielimy na 5 głównych podrodzin: kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, matrylizyny i metaloproteiny błonowe – MT-MMP (ang. *membrane-type matrix metalloproteinases*), a także spokrewnione z MMP błonowe ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase domain*) i wydzielane ADAMTS (ang. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). Podstawą powyższego podziału było podobieństwo specyfiki substratowej i budowy poszczególnych enzymów [29,69,77]. Z czasem wykazano jednak, że wiele substratów jest wspólnych dla MMP z różnych rodzin, dlatego obecnie równocześnie funkcjonuje inny podział MMP oparty tylko na ich strukturze [5,68]. Według tej klasyfikacji wyróżniamy 8 typów MMP: 5 wydzielanych oraz 3 związane z błonami komórkowymi (tab. 1) [28].

ŻELATYNAZY – BUDOWA

Unikatową rodziną w obrębie MMP są żelatynazy. Wyjątkowość tej rodziny wynika z kilku powodów: (1) mają jeden z najbardziej skomplikowanych schematów budowy (tab 1, ryc. 1), (2) mają bardzo podobną do siebie specyfikę substratową, ale równocześnie różną ekspresję (MMP-2 jest głównie enzymem konstytutywnym, a MMP-9 indukowanym), (3) są bardzo ważne zarówno dla utrzymania homeostazy organizmu (głównie MMP-2, ale także MMP-9) oraz rozwoju i przebiegu reakcji zapalnych i chorób nowotworowych (głównie MMP-9, ale także MMP-2) [16,36,77,98]. W przypadku tej ostatniej grupy chorób żelatynazy są produkowane zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki immunokompetentne [28]. Porównanie wybranych parametrów żelatynaz przedstawiono w tabeli 2.

Geny kodujące żelatynazy składają się z 13 egzonów [28,67,98], a struktura organizacyjna ich genu jest przedstawiona na rycinie 1A (porównaj też z tabelą 1). U myszy najwyższą konstytutywną ekspresję genu MMP-2 stwierdzono w nerkach, śledzionie, mięśniach, płucach i sercu [73]. Co ciekawe, niska konstytutywna ekspresja genu kodującego MMP-9 wykryta została we wszystkich analizowanych tkankach myszy [73]. Promotor genu kodującego żelatynazę B o indukowanej ekspresji zawiera sekwencję TATA i pewną liczbę miejsc wiążących elementy



RYCINA 1. Schemat budowy genów kodujących żelatynazy (MMP-2 i MMP-9) (A) oraz struktura ich białek (B). (A) Różnymi kolorami zaznaczono egzony, bądź ich fragmenty, kodujące poszczególne domeny żelatynaz: peptyd sygnałowy (biały), pro-domena (pomarańczowy), domena katalityczna (żółty) z odcinkiem wiążącym atom cynku (czerwony), domeny podobne do fibronektyny (niebieski), domena podobna do kolagenu typu V (fioletowy), domena podobna do hemopeksyny (zielony). Fragmenty, które nie ulegają translacji, zaznaczono kolorem szarym (za [67,98], zmodyfikowane). (B) Poszczególne domeny oznaczono różnymi kolorami oraz symbolami, gdzie S to peptyd sygnałowy, pro to domena propeptydowa, dom akt – domena katalityczna enzymu, Fib – domena podobna do fibronektyny, Zn^{2+} – centrum aktywne w domenie katalitycznej wiążące atom cynku, Kolag – domena podobna do kolagenu typu V, Hem – domena podobna do hemopeksyny, region zawiasowy oznaczono grubą czarną linią (za [77,98], zmodyfikowane)

TABELA 1. Podział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) (na podstawie [11,29,68,69]). W tabeli przedstawiono podział MMP na rodziny na podstawie specyfiki substratowej oraz aktualnej klasyfikacji uwzględniającej podobieństwo budowy. Wszystkie MMP składają się z dwóch domen podstawowych – prodomeny i domeny aktywnej oraz zazwyczaj jednej do kilku domen dodatkowych

Klasyfikacja MMP wg podziału na podstawie specyfiki substratowej	Nowy podział MMP na podstawie budowy	Charakterystyczne cechy budowy
Matrylizyny	Typ 1 wydzielniczy	Budowa podstawowa: prodomena, domena aktywna
Kolagenazy	Typ 2 wydzielniczy	+ domena podobna do hemopeksyny
Stromelizyny	Typ 3 wydzielniczy	+ domena podobna do hemopeksyny i domena wiążąca furynę
MMP-21	Typ 4 wydzielniczy	+ domena podobna do hemopeksyny, domena wiążąca furynę i domena podobna do witronektyny
Żelatynaza A		+ domeny podobne do fibronektyny
Żelatynaza B	Typ 5 wydzielniczy	+ domeny podobne do fibronektyny i domena podobna do kolagenu typu V
MT-MMP (MMP błonowe) Typ I	Typ 1 błonowy	+ domena podobna do hemopeksyny i domena wiążąca furynę, domena transbłonowa, domena kotwicząca w błonie komórkowej
MT-MMP Typ II (Ig)	Typ 2 błonowy	+ domena wiążąca furynę, szereg cysteinowy i domena podobna do immunoglobuliny (Ig)
MT-MMP Typ GPI	Typ 3 błonowy	+ domena podobna do hemopeksyny i domena wiążąca furynę, glikozylofosfatydyloinozytol (GPI)

transkrypcyjne typu AP-1, NF κ B, Sp1, Ets (np. [55,67]). Przyłączenie się powyższych czynników transkrypcyjnych do promotora genu *MMP* następuje po zainicjowaniu wewnątrzkomórkowego sygnału przez kinazy białkowe [98]. Dotychczas nie wykryto wielu regulatorów ekspresji żelatynazy B, a do poznanych należą Kiss-1 (ang. *metastases suppressor Kiss-1, Kisspeptin*), czynnik różnicująco-represyjny 1 (ang. *differentiating-repressing factor 1*) i ostatnio zidentyfikowana transgelina (SM22), która ogranicza ekspresję MMP-9 hamując aktywację ERK przez wpływ na AP-1 [71,105]. Ekspresja MMP-9 jest kontrolowana także na poziomie stabilizacji mRNA i efektywności translacji [38,39].

Cząsteczki żelatynaz są zbudowane z podobnych domen, na końcu aminowym mają peptyd sygnałowy, który umożliwia wydzielenie enzymu z komórki, a który ulega proteolizie w jej błonie cytoplazmatycznej [28]. MMP są wydzielane z komórki wraz z pro-domeną, dzięki której pozostają w formie latentnej (tzw. zymogenu). Pro-domena składająca się z 80 – 90 aminokwasów zawiera ewolucyjnie konserwatywną sekwencję PRCGXPD (gdzie X to dowolny aminokwas), w której najważniejsza jest cząsteczka cysteiny. Poprzez grupę tiolową (-SH) cysteina ta wiąże atom cynku powodując zablokowanie miejsca aktywnego enzymu [68,98]. Po odcięciu prodomeny grupa tiolowa odłącza się od Zn²⁺ i jest zastępowana przez grupę wodorową (-OH) cząsteczki wody, która nie blokuje miejsca aktywnego enzymu. Ten

mechanizm aktywacji MMP został nazwany *cysteine switch* [101]. Odcięcie prodomeny ma charakter proteolityczny i następuje pod wpływem innych MMP (najczęściej MT-MMP) lub enzymów o aktywności proteaz serynowych. Na przykład pro-MMP-9 może być aktywowana przez stromelizynę 1 i MMP-2, ale także przez plazminę i urokinazę [80].

Domena katalityczna MMP złożona jest z ok. 170 aminokwasów o budowie – β kartki złożonej z 5 nici beta oraz trzech heliks α , nadających jej kształt sferyczny [5,11]. Centrum aktywne domeny katalitycznej zawiera sekwencję AHGXGHXXGXXH, w której najważniejsze jest położenie trzech konserwatywnych histydyn (H) wiążących i utrzymujących atom cynku [98]. W cząsteczkach obu żelatynaz w obrębie domeny katalitycznej występuje domena podobna do fibronektyny (glikoproteiny budującej m.in. macierz zewnątrzkomórkową), zawierająca trzy identyczne odcinki peptydowe fibronektyny typu II (ryc. 1B) [77]. Pomimo takiej lokalizacji struktura domeny katalitycznej nie jest zmieniona, gdyż wszystkie 3 powtórzenia fibronektynopodobne są skierowane na zewnątrz cząsteczki MMP [11]. Domena podobna do fibronektyny umożliwia wiązanie MMP-2 i -9 do ich substratów, a zwłaszcza do żelatyny.

Żelatynaza B (MMP-9) jest jedną z największych poznanych MMP, gdyż jako jedyna zawiera domenę podobną do kolagenu typu V, bogatą w zestaw trzech aminokwasów serynę/prolinę/treoninę (ryc. 1B) [77]. Domena ta najprawdopodobniej jest miejscem przyłączania O-glikozydowych oligosacharydów. Domena podobna do hemopeksyny (białka wiążącego heminę) jest poprzedzona przez odcinek zawiasowy. Domena ta składa się z 4 powtórzonych sekwencji, z których pierwsza i ostatnia połączone są mostkiem dwusiarczkowym, a całość składa się z ponad 200 aminokwasów i ma kształt elipsoidalnego dysku [11,68]. Domena podobna do hemopeksyny jest odpowiedzialna za interakcje z naturalnymi inhibitorami MMP – TIMP (ang. *tissue inhibitors of MMP*) oraz z substratami [5].

W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę obu spokrewnionych enzymów.

NATURALNE INHIBITORY ŻELATYNAZ

Aktywność MMP jest kontrolowana przez endogenne inhibitory tych enzymów. W płynach ustrojowych głównym naturalnym inhibitorem MMP jest α -2-makroglobulina, białko fazy ostrej, występujące w dużym stężeniu w osoczu [66]. Białko to ze względu na duże rozmiary (780 kDa) nie przenika do tkanek. Działanie α -2-makroglobuliny polega na związaniu cząsteczki MMP, a powstały kompleks jest następnie wychwytywany przez receptory zmiatacze (ang. *scavenger receptors*), które usuwają je przez endocytozę, jest to więc proces nieodwracalny [28].

Podobne do α -2-makroglobuliny działanie zaobserwowano w przypadku trombospondyn [108]. Trombospondyna-2 wiąże MMP-2 inicjując, analogiczną do wcześniej opisaną, endocytozę zależną od receptorów zmiataczy. Z kolei trombospondyna-1 wiążąc się z pro-MMP-9 i -2 bezpośrednio hamuje ich aktywność [28].

Grupą endogennych inhibitorów MMP, wykazującą znacznie większą selektywność niż α -2-makroglobulina, są tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej TIMP (ang. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*). TIMP, w przeciwieństwie do α -2-makroglobuliny, mają niewielkie rozmiary (20–30 kDa) i łatwo przenikają do tkanek. Wyróżniamy 4 tkankowe inhibitory MMP, TIMP-1 do -4, kodowane przez różne geny [73]. Działanie TIMP polega na odwracalnym wiązaniu danej MMP w stosunku 1:1, przy czym oprócz form aktywnych możliwe jest także wiązanie zymogenu, jak ma to miejsce w przypadku pro-MMP-9 i najsilniej ją wiążącego TIMP-1 [31,77]. Zaskakującym było odkrycie, że chociaż TIMP wiąże się z centrum aktywnym MMP podobnie jak substrat, to najważniejsze dla związania cząsteczki MMP jest tylko pierwszych pięć aminokwasów na końcu aminowym TIMP [31]. Do endogennych inhibitorów MMP zaliczamy także słabo dotychczas poznane inhibitory mające domeny podobne do TIMP [28]. Jedynym inhibitorem MMP związanym z błoną komórkową jest RECK (ang. *reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs*) zawierający w swojej cząsteczce struktury SPI (ang. *serine-protease inhibitor-like domains*), które są odpowiedzialne za odwracalne ściśle wiązanie ligandów [63].

Brak selektywnych inhibitorów MMP-9 nie sprzyja stosowaniu farmakologicznych metod deaktywacji enzymu. W przypadku MMP-9 najbardziej selektywną grupą inhibitorów są inhibitory żelatynaz hamujące aktywność MMP-9 i MMP-2, np. cykliczny peptyd CTTHWGFTLC. Grupa kontrolna otrzymuje równocześnie peptyd kontrolny STTHWGFTLS nie wpływający na funkcjonowanie żelatynaz [44,49].

MYSZY TRANSGENICZNE MMP-9^{-/-}

Myszy MMP-9^{-/-} nie wytwarzają MMP-9 są więc dobrym modelem do badania roli tego enzymu przez porównanie z tzw. myszami dzikimi (ang. *wild type*), czyli myszami ze szczepu wyjściowego wykorzystanego do stworzenia zwierząt transgenicznych. W uproszczeniu, myszy typu *knockout* (z ang. wyrzucony, wybity) tworzy się przez modyfikację genu kodującego białko docelowe usuwając fragment genu i zastępując go przez fragment antysensowny (w stosunku do sekwencji wyjściowej) w wyniku rekombinacji homologicznej (opis po polsku sposobu konstruowania zwierząt transgenicznych, np. [94,104]). W przypadku myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego MMP-9 najczęściej stosowano dwie techniki: (i) egzony 3 lub 4 (kodujące większą część domeny katalitycznej) oraz egzon 8 (kodujący fragment domeny katalitycznej z miejscem wiążącym atom cynku) zostały usunięte i zastąpione przez gen oporności na neomycynę (pierwsze doniesienie [25]; myszy stworzone według tego protokołu wykorzystywała w swoich badaniach Autorka), (ii) część egzonu 2 (kodującego fragment pro-domeny z końca karboksylowego i fragment domeny katalitycznej z końca aminowego) i cały intron 2 zostały zastąpione przez gen oporności na neomycynę (pierwsze doniesienie [102]). W obu przypadkach opisano całkowity brak aktywności genu kodującego MMP-9 dokumentując to analizami PCR (ekspresja genu), *westernblot* (ekspresja białka) i zymografią

(aktywność enzymu). Homozygotyczne myszy MMP-9^{-/-} stworzone przez poszczególne grupy różnią się także szczepem wyjściowym myszy, przy czym najczęściej stosowane są szczepy C57Bl/6 (np. [24,97]) i FVB (np. [18]) oraz 129SvEv (np. [54,102]) i rzadziej CD1. Badania, w których porównuje się wyniki pomiędzy myszami MMP-9^{-/-} stworzonymi na różnym podłożu genetycznym są bardzo rzadkie, ale nigdy nie wykazano różnic pomiędzy takimi zwierzętami. Na przykład w badaniach, w których analizowano proces fizjologicznego wzrostu kości, porównano myszy z aż czterech różnych szczepów wyjściowych (C57Bl/6, FVB, 129SvEv, CD1) i nie stwierdzono różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami myszy [102].

KOMÓRKOWE ŹRÓDŁA MMP-9

W latach 70 ubiegłego wieku żelatynaza B została opisana w neutrofilach [91] i dopiero w dziesięć lat później wyizolowano ją także z monocytów i makrofagów [57]. Obecnie wiadomo, że jest produkowana również przez inne typy leukocytów, w tym przez limfocyty i mastocyty [16,79]. W badaniach własnych opisaliśmy profil ekspresji pro-MMP-9 w różnych populacjach leukocytów obecnych w jamie otrzewnej [43,47], w trakcie reakcji zapalnej wywołanej przez zymosan (wielocukier ściany drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) [50]. Badania te pokazały, że na bardzo wczesnych etapach MMP-9 jest produkowana przez osiadłe leukocyty tkankowe, czyli otrzewnowe makrofagi i mastocyty [47]. Na następnych etapach zapalenia głównym źródłem komórkowym żelatynazy B są neutrofile, ale także makrofagi zapalne, które z czasem, na późnych etapach reakcji są głównymi producentami MMP-9 [43].

Neutrofile są wyjątkowym źródłem MMP-9, gdyż jest ona syntetyzowana i magazynowana w ich II- i III-rzędowych ziarnistościach już w trakcie dojrzewania komórek [98]. W przypadku neutrofilii aktywacja komórek pobudza nie syntezę żelatynazy B, ale jej wydzielanie. Proces ten jest bardzo gwałtowny i zachodzi w ciągu 15 – 45 minut pod wpływem cytokin i wzorców molekularnych związanych z patogenami – struktur PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) rozpoznawanych przez neutrofile [77]. Ponadto w przeciwieństwie do pozostałych komórek syntetyzujących żelatynazę B, neutrofile nie produkują drugiej z żelatynaz (MMP-2/żelatynazy A) i naturalnych inhibitorów MMP – TIMP [36,77]. Co więcej, neutrofile produkują dimery MMP-9: homodimery (wielkości ok. 200 kDa) i 120-kDa heterodimery z NGAL (ang. *gelatinase B-associated lipocalin*), a oba typy dimerów są połączone kowalencyjnie mostkami dwusiarczkowymi [60]. Funkcja NGAL i dimerów nie została jeszcze poznana [41,60], choć wykazano, że związanie z NGAL chroni MMP-9 przed degradacją, zwiększając całkowitą pulę tego enzymu [107].

Podobnie do neutrofilii także mastocyty mają zdolność do produkcji MMP-9 na etapie dojrzewania komórek. Żelatynaza B jest magazynowana w ich ziarnistościach i uwalniana po stymulacji czynnikami zapalnymi [77]. Zaskakująco, w przypadku stymulacji lipopolisacharydem (LPS), mastocyty co prawda zwiększają produkcję MMP-9, ale jej nie wydzielają [95].

FUNKCJE MMP-9

Najbardziej znaną i najwcześniej odkrytą funkcją MMP-9 jest degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błon podstawnych, co umożliwia migrację wydzielających je komórek [5]. Błony podstawne stanowią m.in. zewnętrzną warstwę ograniczającą naczynia krwionośne, są strukturami ciągłymi, a więc leukocyty przeciskające się pomiędzy komórkami śródbłonna w trakcie diapedezy mogą je pokonać tylko dzięki wydzieleniu enzymów proteolitycznych [58]. Błony podstawne są wyspecjalizowanym typem macierzy zewnątrzkomórkowej – ECM (ang. *extracellular matrix*), która wypełnia przestrzeń pomiędzy narządami i różnymi typami tkanek [86]. ECM stanowi także punkt zakotwiczenia dla różnych typów komórek oraz przekazuje sygnały do ich wnętrza przez receptory dla powierzchniowych białek adhezyjnych [28]. Podstawowe składniki ECM to kolageny, glikoproteiny i proteoglikany [51,86]. Substraty żelatynaz, spośród składników błon podstawnych i ECM, są wymienione w tabeli 2.

Degradacja składników błon podstawnych i ECM umożliwia komórkom, głównie leukocytom i komórkom nowotworowym, opuszczanie naczyń krwionośnych (diapedeza) i przemieszczanie się do ogniska zapalnego, bądź migrację w czasie przerzutowania w chorobach nowotworowych [51]. Udział MMP-9 w procesach nowotworowych został szczegółowo opisany w literaturze polskojęzycznej, np. [9]. Degradacja ECM może jednak wpłynąć także na funkcjonowanie komórek, wywołując np. apoptozę komórek związanych z ECM [27,97,102]. Ponadto MMP-9 odgrywa istotną rolę w regulacji aktywacji i aktywności cytokin i chemokin, co dotychczas wykazano w warunkach *in vitro*. W przypadku proformy IL-1 MMP-9 może aktywować tą cytokinę niezależnie od kaspazy-1/ICE (ang. *Interleukin-1 converting enzyme*) [28]. MMP-9 złącza także z powierzchni limfocytów T receptory dla IL-2 regulując ich proliferację [16,28]. Ponadto MMP-9 może degradować chemokiny, przy czym stwierdzono, że chemokiny CXC, takie jak: CXCL1 (GRO- /KC), CXCL4 (PF-4), CXCL7 (CTAP-III), CXCL12 (SDF-1) są przez nią rozkładane do form nieaktywnych [99]. Z kolei chemokiny CC, takie jak: CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4) nie są w ogóle substratami MMP-9 [99]. Co ciekawe jednak, CCL7 nie tylko jest rozkładana przez MMP-2, ale także powstałe fragmenty stają się antagonistami dla receptora CCR2 tej chemokiny [61]. Jeden z najistotniejszych, jak się wydaje, biologicznych efektów działania MMP-9 zaobserwowano w przypadku chemokiny CXCL8 (ludzkiej IL-8 i jej mysich odpowiedników), głównej chemokiny przyciągającej neutrofile. Wykazano bowiem, że MMP-9 powoduje takie przecięcie cząsteczki IL-8, iż dochodzi do odcięcia od jej końca aminowego pierwszych 6 z 77 aminokwasów. Prowadzi to do powstania formy IL-8(7-77) [99]. Powstała cząsteczka jest kilkakrotnie bardziej aktywna niż forma wyjściowa. Ponieważ IL-8 nie tylko przyciąga neutrofile do ogniska zapalnego, ale także powoduje ich aktywację przejawiającą się m.in. wydzielaniem MMP-9 [77], dlatego też IL-8(7-77) powoduje powstanie sprzężenia zwrotnego dodatniego. Bardziej aktywna chemokina przyciąga więcej neutrofile, które wydzielają więcej MMP-9, a wydzielany enzym, tnąc IL-8, zwiększa jej aktywność

TABELA 2. Porównanie wybranych parametrów żelatynazy A (MMP-2) i żelatynazy B (MMP-9) (na podstawie [37,56,77,83])

Parametr	MMP-2	MMP-9
Nazwy synonimiczne	żelatynaza A, żelatynaza 72,kDa kolagenaza typu IV	żelatynaza B, żelatynaza 92, kDa kolagenaza typu IV
Nr wg Komisji Enzymów*	EC.3.4.24.35	EC.3.4.24.24
Sekwencja nukleotydowa	Człowiek: NM_004530* Mysz: NM_008610	Człowiek: NM_004994* Mysz: NM_013599
Sekwencja aminokwasowa	Człowiek: NP_004521* Mysz: NP_032636	Człowiek: NP_004985* Mysz: NP_038627*
Lokalizacja na chromosomie	Człowiek: 16 Mysz: 8	Człowiek: 20 Mysz: 2
Rozmiar genu [pary zasad]	Człowiek: 27513 Mysz: 26093	Człowiek: 7654 Mysz: 7614
Rozmiar mRNA [pary zasad]	Człowiek: 3549 Mysz: 3070	Człowiek: 2387 Mysz: 3185
Zymogen – rozmiar białka kDa	Człowiek: 72 Mysz: 72	Człowiek: 92 Mysz: 112
Forma aktywna – rozmiar białka kDa	Człowiek: 66 Mysz: 62	Człowiek: 83-5 Mysz: 100
Ekspresja	Konstitutywna	Indukowalna
Odcięcie pro-domeny przez	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-13, MMP-26, elastazę neutrofilów, chymazę mastocytową, katepsynę G, kalikreinę	MMP-1, MMP-3, MMP-7, MT1-MP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP, autoliza, regulowana przez TIMP-2 w obecności elastazy neutrofilowej
Substraty&	Żelatyna, kolagen typu I, III, IV, V, VII, X, XI, laminina, agrekan, MBP, fibronektyna, fibrynogen, fibryna, elastyna, <i>C1q</i> , <i>substancja P</i> , <i>inhibitor proteinazy $\alpha 1$</i> , <i>pro-TGFβ</i> , <i>pro-TNF-α</i> , <i>pro-MMP-9</i>	Żelatyna, kolagen typu IV, V, XI, XIV, agrekan, elastyna, laminina, MBP, witronektyna, inhibitor proteinazy $\alpha 1$, kazeina, plasminogen, fibrynogen, fibryna, <i>ligand dla c-kit</i> , <i>C1q</i> , <i>$\alpha 2$-makroglobulina</i> , <i>pro-TNF-α</i> , <i>pro-CXCL7</i> , <i>CXCL1</i> , -4, -8, -12, <i>IL-2Ra</i> , <i>pro-TGFβ</i>

[99]. Co ciekawe, nieliczne przypadki rozkładu chemokin przez inne niż MMP-9 metaloproteinazy (np. przez MMP-13 i -14) także dotyczą IL-8 oraz drugiego z chemoatraktantów dla neutrofilii, obecnego u myszy, LIX (odpowiednik ludzkiej CXCL5/ENA-78) i CXCL6 (GCP-2) [100]. W obu przypadkach powstałe formy tych chemokin są silniejszymi chemoatraktantami niż chemokiny wyjściowe [100].

W świetle powyższych danych dotyczących roli MMP-9 w przemieszczaniu się komórek oraz regulacji procesów immunologicznych poprzez wpływ na aktywność cytokin, chemokin i innych białek zaskakującym było odkrycie, że żelatynaza B odgrywa także rolę w utrzymaniu homeostazy w wielu układach organizmu. Odkrycia te pochodzą z badań na myszach transgenicznych z wyłączonym genem kodującym MMP-9.

TABELA 2 cd

Parametr	MMP-2	MMP-9
Ekspresja w neutrofilach	nie	tak
Ekspresja w pozostałych leukocytach	Monocyty, limfocyty, komórki dendrytyczne	Monocyty, limfocyty, komórki dendrytyczne, mastocyty
Inne źródła komórkowe	Fibroblasty, keratynocyty, hondrocyty, komórki śródbłonna, osteoblasty i inne liczne normalne i zmutowane (nowotworowo) komórki	Keratynocyty, komórki nowotworowe
Ekspresja w chorobach nowotworowych	Komórki nowotworowe, komórki podścieliska, komórki śródbłonna	Komórki nowotworowe, komórki podścieliska, komórki śródbłonna, fibroblasty, makrofagi, neutrofile, perycyty
Wzrost ekspresji po stymulacji	2–4-krotny	Kilkunastokrotny
Wzajemna aktywacja	tak	nie
Białka umożliwiające wiązanie z błoną komórek	MT1-MMP/TIMP-2 [^] , integryna $\alpha\beta3$	CD44, kolagen typu IV
Selektywny TIMP	TIMP-2	TIMP-1
Degradacja chemokin	głównie CC	głównie CXC

* Numery referencyjne sekwencji według *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). & Substraty, których rozkład dotychczas wykazano tylko w warunkach *in vitro* są zaznaczone kursywą.[^] MT1-MMP aktywująca pro-MMP-2 może tworzyć kompleksy z TIMP-2 na powierzchni komórek [92]. *Nr wg Komisji Enzymów – EC (*Enzyme Commission*)

FIZJOLOGICZNE FUNKCJE MMP-9

W przypadku myszy MMP-9^{-/-} nie od razu odkryto większość tzw. spontanicznych fenotypów, manifestujących się nieprawidłowościami w rozwoju bądź dojrzewaniu zwierząt niepoddanych żadnej stymulacji. Przyczyną takiego zjawiska był zazwyczaj bądź przejściowy charakter danej anomalii, bądź tylko nieznaczne odchylenie od normy [24,54,93,98,102]. Nie zawsze wynikało to z braku istotnego wpływu żelatynazy B na dany proces, a często było wynikiem rozwoju tzw. mechanizmów kompensujących polegających na wzmocnieniu ekspresji/aktywności innych enzymów o podobnym spektrum działania.

Układ rozrodczy

Myszy MMP-9^{-/-} rozmnażają się i dożywają dorosłości, co nie sugerowało roli MMP-9 w procesach związanych z rozmnażaniem [24,102]. Jednak wnikliwa analiza wykazała, że liczba miotów oraz ich liczebność są mniejsze u myszy MMP-9^{-/-} niż u zwierząt dzikich. Ponadto więcej par MMP-9^{-/-} jest bezpłodnych [24]. Choć nie wykryto co jest bezpośrednią przyczyną tego zjawiska, warto w tym miejscu zaznaczyć, że MMP-9 jest obecna w endometrium macicy na wszystkich etapach

cyklu owulacyjnego i w czasie zagnieżdżania się zarodka, a jej poziom wzrasta w trakcie porodu [19]. Co więcej, żelatynaza B bierze udział w inwolucji gruczołów mlekowych po ustaniu laktacji [24]. Co najważniejsze, ekspresja MMP-9 ma miejsce we wszystkich ważnych narządach i tkankach rozwijającego się zarodka [73].

Układ kostny

Podobnie jak w przypadku rozmnażania, nie od razu zauważono zmiany w rozwoju kości występujące u młodych, kilkutygodniowych myszy MMP-9^{-/-}, gdyż z czasem brak enzymu był kompensowany przez inne MMP (choć nie MMP-2) [102]. U młodych myszy pozbawionych MMP-9 stwierdzono, że chociaż ich chondrocyty dzielą się i różnicują prawidłowo, to osyfikacja (proces powstawania kości) na podłożu chrzęstnym oraz unaczynianie chrząstki są opóźnione [102]. Prowadzi to do zmian fenotypowych objawiających się 8-krotnym wydłużeniem płytki wzrostu chrząstki. Następnie wykazano, że jest to wynikiem upośledzonej apoptozy chondrocytów oraz obniżonym/opóźnionym wydzielaniem czynników wywołujących angiogenezę [102].

Układ wydalniczy

Ze względu na fakt ekspresji MMP-9 w nerkach w czasie rozwoju embrionalnego i ontogenezy oraz wykazanie, że TIMP-1 (naturalny inhibitor MMP-9) oraz ilomastat (syntetyczny inhibitor MMP) hamują przebudowę morfogenetyczną nerek wysunięto hipotezę, że żelatynaza B jest niezbędna w fizjologicznym funkcjonowaniu tego narządu [15,84]. Jednak u myszy MMP-9^{-/-} nie stwierdzono zmian w rozwoju nerek, ich morfologii i funkcjonowaniu [3]. Z kolei badania przebiegu zespołu Alporta (dziedzicznej choroby nerek) wykazały, że aż trzy metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-2, MMP-3 i MMP-9 są niezbędne dla rozwoju tej choroby [112]. Co więcej enzymy te kompensują wzajemnie swój brak, co wykazano u myszy MMP-2^{-/-}, MMP-9^{-/-} i podwójnych *knockoutów* MMP-2^{-/-}/MMP-9^{-/-} [112].

Układ nerwowy

MMP-9 jest również niezbędna dla prawidłowego rozwoju mózgu [97]. Zaobserwowano, że podczas neurogenezy żelatynaza B uczestniczy w wydłużaniu wypustek komórek nerwowych oraz ukierunkowuje wydłużający się akson. Ekspresja MMP-9 ma miejsce głównie w prekursorach komórek ziarnistych kory mózgu i neuronach Purkiniego, a brak enzymu u myszy MMP-9^{-/-} prowadzi do ograniczenia ich apoptozy skutkując nadmierną akumulacją tych komórek [97]. Ponadto dzięki wykorzystaniu myszy MMP-9^{-/-} oraz MMP-12^{-/-} i MMP-9^{-/-}/MMP-12^{-/-} wykazano, że obie powyższe metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są niezbędne dla prawidłowej mielinizacji (wytwarzania osłonki mielinowej) komórek nerwowych przez oligodendrocyty [54]. Opiszano także rolę MMP-9 w degradacji składników mieliny, takich jak podstawowe białko mielinowe – MBP (ang. *myelin basic protein*) [76].

Badania wykazały, że liczba dojrzałych oligodendrocytów, ale nie ich prekursorów, jest niższa u myszy transgenicznych pozbawionych MMP-9 na skutek braku IGF-1 (ang.

insulin-like growth factor 1), który jest czynnikiem regulującym dojrzewanie tych komórek. Koreluje to ze zwiększoną obecnością IGFBP-6 (ang. *IGF binding protein 6*), który wyłapuje IGF-1 ograniczając jego dostępność, a jest substratem MMP-9 [54].

Żelatynaza B odgrywa także bardzo ważną rolę w plastyczności połączeń synaptycznych oraz uczestniczy w procesach uczenia się i zapamiętywania [62,64,70]. Badania na myszach MMP-9^{-/-} wykazały, że wielkość i czas trwania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w ich hipokampie są istotnie obniżone w stosunku do myszy dzikich, a podanie rekombinowanej aktywnej MMP-9 odwraca ten proces [70]. Udało się także zidentyfikować jeden z substratów żelatynazy B odpowiadających za ten proces. Jest nim β -dystroglikan, jedna z podjednostek dystroglikanu, który łączy dystrofinę z cytoszkieletem komórki [64].

Układ krwionośny

Przebudowa ścian naczyń krwionośnych zachodzi pod wpływem zmian hemodynamicznych bądź ich uszkodzenia [58]. Mięśnie gładkie występujące w ścianie naczyń odgrywają ważną rolę w utrzymaniu napięcia naczyń oraz w produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej będącej ich rusztowaniem [30,40]. Wykazano, że w warunkach *in vitro* niestymulowane komórki wyizolowane z mięśni gładkich naczyń myszy MMP-9^{-/-} migrują znacznie słabiej w kierunku surowicy bądź PDGF (ang. *platelet derived growth factor*) [30]. Wykazano także, że żelatynaza B jest ważna dla utrzymania prawidłowego napięcia ścian naczyń krwionośnych [93]. Proces ten jest głównie regulowany przez czynniki mechaniczne, takie jak: ciśnienie krwi i naprężenie styczne (ścinające) w świetle naczynia [32]. W badaniach na myszach MMP-9^{-/-} wykazano, że brak MMP-9 wpłynął na poszerzenie światła naczynia i podwyższenie ekspresji, zależnej od MMP-9, endotelialnej syntazy tlenu azotu eNOS [93]. Dotychczas nie udało się jednak wyjaśnić dokładnego mechanizmu tego zjawiska.

Gojenie ran

W badaniach na myszach MMP-9^{-/-} wykazano istotną rolę żelatynazy B w czasie regeneracji wątroby. Brak tego enzymu opóźniał proces gojenia, obniżał poziom czynników wzrostu, w tym czynnika wzrostu hepatocytów HGF, a także poziom TNF- α i apoptozę komórek wątroby [75]. Wiadomo, że niektóre z nieaktywnych czynników wzrostu oraz pro-TNF- α są substratami MMP-9, nie można więc wykluczyć, że ich obniżony poziom był wynikiem braku żelatynazy B, co doprowadziło do słabszej regeneracji hepatocytów [80].

Ciekawą strategią eksperymentalną do zweryfikowania roli MMP-9 w procesie gojenia ran zastosowali Salonurmi i współpracownicy (2004). Stworzyli oni myszy transgeniczne, u których przed promotorem genu kodującego MMP-9 został ulokowany fragment ludzkiego DNA kodującego TIMP-1 [87]. Wskutek tego zabiegu w tkankach, w których u myszy dzikich dochodziło do ekspresji MMP-9 u myszy transgenicznych zachodziła ekspresja TIMP-1 [87]. W badaniach na tego typu myszach wykazano, że proces gojenia ran powstałych przez sterylne nacięcia skóry

grzbietu jest istotnie obniżony i opóźniony [87]. Wart podkreślenia jest fakt, że także u myszy MMP-9^{-/-} bez nacięć skóry obserwowano zmiany skórne okolic głowy, karku i pleców, ale nie ogona, objawiające się przerzedzeniem owłosienia, obecnością ran i strupów. Co ciekawe zmiany te obserwowano u starzejących się myszy (począwszy od 6 – 7 miesiąca życia) tylko od drugiego pokolenia myszy transgenicznych i tylko w przypadku zwierząt przebywających w klatkach w grupie [87]. Wyniki te sugerują rolę MMP-9 także w procesach związanych ze starzeniem się.

Układ odpornościowy

Wykazano, że MMP-9 jest ważna w trakcie fizjologicznego różnicowania się elementów układu odpornościowego [74]. U myszy MMP-9^{-/-} nie stwierdzono zmian w liczbie apoptotycznych tymocytów (niedojrzałych limfocytów T), ale zaobserwowano zmniejszone usuwanie tych komórek przez makrofagi [74]. Następnie wykazano, że żelatynaza B, wydzielana przez makrofagi rezydujące w grasicy, rozkłada kolagen typu IV umożliwiając neowaskularyzację (tworzenie nowych naczyń krwionośnych) oraz migrację makrofagów z grasicy po fagocytozie [74].

ROLA MMP-9 W REAKCJI ZAPALNEJ

Myszy transgeniczne MMP-9^{-/-} zostały także wykorzystane do badań nad mechanizmami reakcji zapalnej. Zapalenie jest pierwszą reakcją organizmu na infekcję, bądź uszkodzenie tkanek [42,58]. Charakteryzuje się ono napływem leukocytów zapalnych, głównie neutrofilii i makrofagów, do miejsca zakażenia lub uszkodzenia. Ostra reakcja zapalna charakteryzuje się kilkoma etapami zachodzącymi chronologicznie: (1) zmianami w przepuszczalności naczyniowej sprzyjającymi (2) napływowi fagocytów (najpierw neutrofilii, potem makrofagów) do tkanki objętej zapaleniem. Proces ten zachodzi pod wpływem m.in. chemokin selektywnie zwołujących leukocyty. (3) Napływające leukocyty eliminują czynniki wywołujące zapalenie i/lub uczestniczą w naprawie uszkodzonych tkanek, po czym następuje, (4) kontrolowane przez czynniki przeciwzapalne (np. IL-10, PGD2), wyciszenie reakcji [42,58].

Zaangażowanie MMP-9 w procesach zmian przepuszczalności naczyń

Jednym z pierwszych etapów zapalenia są zmiany w przepuszczalności lokalnych naczyń krwionośnych. W badaniach na modelu zapalenia otrzewnej wywołanego podaniem zymosanu (fragmentów ściany komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*) wykazano, że u myszy kontrolnych (dzikich) początkowy wzrost poziomu MMP-9 obserwowano już w kilkanaście minut po dootrzewnowym podaniu zymosanu. Sugerowało to, że MMP-9 może odgrywać rolę w procesach toczących się na wczesnym etapie zapalenia [49]. Zaskoczeniem była więc obserwacja, że przepuszczalność naczyniowa u myszy MMP-9^{-/-} w pierwszej godzinie zapalenia jest wyższa niż u myszy kontrolnych MMP-9^{+/+}. W dalszych badaniach wykazano, że wzrost

przepuszczalności naczyniowej u myszy MMP-9^{-/-} był wynikiem zwiększonej ekspresji cyklooksygenazy 1 i nadprodukcją PGE2 przez osiadłe makrofagi otrzewnej [49].

Z kolei w trakcie zapalenia płuc wywołanego podaniem lipopolisacharydu (LPS) przepuszczalność lokalnych naczyń krwionośnych nie była zmieniona u myszy MMP-9^{-/-} [7].

Badania udziału MMP-9 w przepuszczalności naczyniowej w centralnym układzie nerwowym (CNS) wykazały, że u myszy MMP-9^{-/-}, u których wywołano niedokrwienie mózgu, zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg były mniejsze [4]. Podobny efekt udokumentowano w przypadku uszkodzenia rdzenia kręgowego i bariery krew-rdzeń [72].

Rola MMP-9 w napływie leukocytów zapalnych

W zdecydowanej większości badań na myszach transgenicznym z wyłączonym genem kodującym MMP-9 wykazano obniżenie zdolności migracyjnych leukocytów, zwłaszcza neutrofilii i makrofagów. W tabeli 3 zebrano przykładowe wyniki badań, w których u myszy MMP-9^{-/-} analizowano zdolność do przemieszczania się leukocytów w różnych stanach zapalnych lub po stymulacji *ex vivo* czynnikami prozapalnymi. Nieliczne przypadki, w których nie stwierdzono żadnego wpływu MMP-9 na migrację dotyczyły albo badań na wyizolowanych komórkach pobranych od myszy MMP-9^{-/-} [2] albo badań *in vivo*, w których analizowano tylko pojedyncze punkty czasowe [8]. Częstą przyczyną braku zmian w migracji leukocytów u myszy MMP-9^{-/-} był także rozwój mechanizmów kompensujących nieobecność MMP-9 [53,103].

Najbardziej zaskakujące obserwacje pochodzą z badań nad niektórymi formami zapalenia płuc, w których obserwowano zwiększoną migrację neutrofilii u myszy MMP-9^{-/-}. W przypadkach tych, zapalenie płuc było zazwyczaj wywołane ich uszkodzeniem mechanicznym, bądź na skutek długotrwałego korzystania z respiratora [1], bądź ekspozycji na ozon (O₃) [109], a nie kontaktem z antygenem. W przypadku ekspozycji na ozon, u myszy MMP-9^{-/-} obserwowano wzrost poziomu MMP-2, wykluczono jednak możliwość, że enzym ten kompensuje brak żelatynazy B, gdyż u myszy MMP-2^{-/-} w ogóle nie stwierdzono zmian w przebiegu zapalenia [109]. Wykryto jednak, że u myszy MMP-9^{-/-} wzrasta poziom przyciągających neutrofile chemokin CXCL1 (KC) i CXCL2 (MIP-2). Co ciekawe, wzrost ten zaobserwowano na poziomie białka, ale nie kodującego go mRNA. Ponieważ obie te chemokiny są degradowane przez żelatynazę B do form nieaktywnych [77], wydaje się, że u myszy pozbawionych tego enzymu, degradacja ta nie zachodzi, albo zachodzi w znacznie niższym stopniu, co w konsekwencji powoduje zwiększenie napływu neutrofilii [109].

Z kolei w zapaleniu płuc wywołanym mechaniczną respiracją u myszy pozbawionych MMP-9 nie stwierdzono wzrostu poziomu ani MMP-2 ani MMP-8, ale zwiększone wydzielanie IL-1 i IL-4 [1]. Wydaje się, że obserwowane u tych zwierząt zwiększenie liczby neutrofilii w ognisku zapalnym wynika z faktu, że zarówno IL-1, jak i IL-4 mogą opóźniać apoptozę tych komórek [1].

W przeciwieństwie do powyższych przykładów, w reakcjach zapalnych płuc wywołanych podaniem antygenów bakteryjnych [59,96] czy albuminy jaja kurzego [14] MMP-9 odgrywa głównie rolę w degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej ułatwiając napływ leukocytów zapalnych.

TABELA 3. Migracja leukocytów u myszy transgenicznych z wyłączonym genem kodującym MMP-9.: ↑ zwiększona migracja komórek, ↓ spadek migracji komórek, – brak wpływu na migrację, NW – nie weryfikowano, ref. – źródło literaturowe

	Typ leukocytów	Napływ komórek	Skutki braku MMP-9	Kompen-sacja	Ref.	
1	Symulacja lub przyczyna stanu zapalnego	2	3	4	5	6
	Mobilizacja komórek macierzystych przez czynniki wzrostu i chemokiny	hematopetyczne komórki macierzyste	↓	Bezpośrednia przyczyną słabej migracji komórek jest brak MMP-9. U myszy dzikich MMP-9 jest wydzielana przez neutrofile pod wpływem G-CSF i chemokin CXCL2 (MIP-2) i CXCL2 _A	NW	[79]
	Mobilizacja komórek macierzystych przez β-glukany drożdży	hematopetyczne komórki macierzyste	↓	Oslabiony napływ komórek jest bezpośrednim wynikiem braku MMP-9 wydzielanej przez komórki podścieliska i śródbłonna szpiku kostnego	NW	[22]
	Zapalenie dróg oddechowych wywołane albuminą jaja kurzego	makrofagi, limfocyty, eozynofile, neutrofile	↓ ↓	Słabsze oznaki zapalenia, w tym reakcja nadwrażliwości, jest skutkiem osłabionego napływu leukocytów	MMP-12 ↓ MMP-1 ↓ uPA ↓	[14]
	Infekcja płucna <i>Francisella tularensis</i>	neutrofile	↓	Lżejszy przebieg infekcji, mniejsza śmiertelność myszy	NW	[59]
	Ostre zapalenie płuc	neutrofile	–	Lagodniejszy przebieg choroby	MMP-3 ↑	[103]
	Zapalenie płuc wywołane podaniem IL-13	eozynofile, limfocyty, makrofagi, neutrofile	– – ↑	U myszy MMP-9 ^{-/-} obserwowano mniejszą śmiertelność. MMP-9 selektywnie hamuje kumulację neutrofilii w tkance regulując aktywność chemokin CXCL1(KC) i CXCL2 (MIP-2)	MMP-2 ↑ MMP-12 ↑ MMP-13 ↑ MMP-14 ↑	[53]
	Infekcja płucna <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	makrofagi	↓	Mniej zorganizowanej tkanki ziarninakowej zawierającej komórki olbrzymie i nabłonkowe	NW	[96]
	Zapalenie dróg oddechowych wywołane ekspozycją na ozon	neutrofile	↑	Zaostrzenie reakcji zapalnej na skutek nadmiernej kumulacji neutrofilii. Wyniki sugerują ochronną rolę MP-9 w tej reakcji	MMP-2 ↑ CXCL1 (KC) ↑ CXCL2 (MIP-2) ↑	[109]

TABELA 3. cd

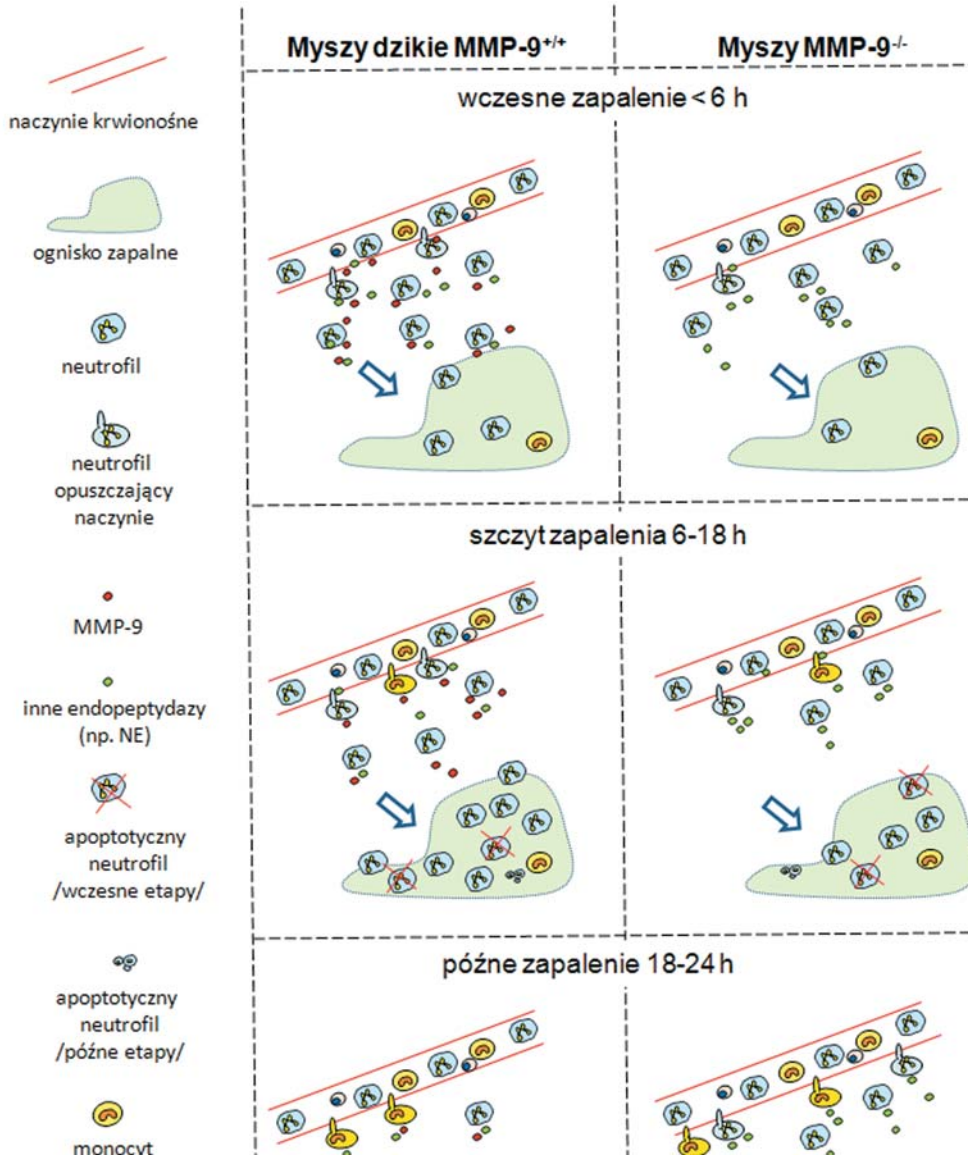
1	2	3	4	5	6
Uszkodzenie płuc wywołane mechanicznym respiratorem	neutrofile	↑	Rozleglejsze uszkodzenia płuc u myszy MMP-9 ^{-/-} . MP-9 spełnia rolę ochronną hamując napływ eutrofilii, być może poprzez regulację aktywności L-1β i IL-4	MMP-8 ↓ MMP-2 –	[1]
Zapalenie okrężnicy	neutrofile	↓	Krótszy czas i łagodniejszy przebieg zapalenia	MMP-2 –	[88]
Zapalenie okrężnicy	neutrofile	↓ /-	MMP-9 uwalniana przez komórki nabłonkowe jelita jest odpowiedzialna za jego uszkodzenie	NW	[13]
Zapalenie otrzewnej wywołane tioglikolatem Dotchawicze podanie LPS Dostórnie podanie CXCL8	neutrofile	-	Brak istotnego wpływu na badane procesy (w przypadku zapalenia otrzewnej badano tylko jeden punkt czasowy)	NW	[8]
Zapalenie otrzewnej wywołane <i>Escherichia coli</i>	neutrofile makrofagi	↓ ↓	Intensywniejsze namnażanie się i rozprzestrzenianie się bakterii	NW	[82]
Zapalenie/uszkodzenie wątroby na skutek jej niedokrwienia	neutrofile makrofagi limfocyty	↓ ↓ ↓	Mniejsze uszkodzenia wątroby i niższy poziom cytokin prozapalnych	MMP-2 –	[34]
Uszkodzenie nerwu obwodowego	makrofagi	↓	Słabsza degeneracja aksonów	NW	[90]
Uszkodzenie rdzenia kręgowego	neutrofile	↓	Mniejsze zaburzenia bariery krew-mózg i lepsza sprawność ruchowa.	NW	[72]
Zawał mięśnia sercowego	makrofagi	↓	Mniejsze poszerzenie lewej komory serca i słabsze odkładanie się kolagenu w bliznie	MMP-2 ↑ MMP-13 ↑ TIMP-1 ↑	[26]
Migracja komórek prezentujących antygen ze skóry	makrofagi – komórki Langerhansa	↓	Brak MMP-9 nie tylko ogranicza napływ komórek, ale także osłabia ich dojrzewanie	NW	[81]
Stymulacja <i>in vitro</i> neutrofilii TNF-α	neutrofile	-	Wysoka ekspresja białek adhezyjnych na powierzchni neutrofilii	NW	[2]
Reakcja skóry na wstrzyknięcie chemokiny CXCL6 (GCP-2)	neutrofile	↓	Odmrożony napływ neutrofilii jest obserwowany tylko u młodych zwierząt, być może na skutek kompensacji z wiekiem	NW	[23]

O różnej roli MMP-9 w przebiegu zapalenia tego samego narządu/tkanki w zależności od wywołującego je czynnika dowodzą także badania nad zapaleniem jamy otrzewnej u myszy MMP-9^{-/-}. Pierwsze wyniki badań nad tym zjawiskiem opublikowane w 1999 roku pokazywały, że żelatynaza B nie uczestniczy w napływie neutrofilów do otrzewnej, gdyż w 4 godzinie (jedynym badanym punkcie czasowym) zapalenia jamy otrzewnej wywołanego podaniem sterylnego medium tioglikolatu ich liczba jest taka sama jak u myszy dzikich [8]. Z kolei w przypadku dootrzewnowego podania bakterii *Escherichia coli* ogólnoustrojowe zapalenie (posocznica/sepsa) było istotnie osłabione u myszy bez MMP-9 [82]. W szczególności odnotowano obniżony napływ neutrofilów do jamy otrzewnej, któremu towarzyszył jednak wzrost syntezy CXCL1 (KC) i CXCL2 (MIP-2). Zaobserwowano więc to samo zjawisko dotyczące chemokin CXC, jak w przypadku zapalenia płuc po ekspozycji myszy MMP-9^{-/-} na ozon. Jednak w tym przypadku, pomimo wzrostu poziomu chemokin, napływ neutrofilów do otrzewnej był obniżony [82]. Co jednak zaskakujące, równocześnie wzrósł napływ neutrofilów do innych narządów: płuc i wątroby. Ponadto w trakcie posocznicy wywołanej przez *E. coli* wykazano, że u myszy MMP-9^{-/-} dochodzi do znacznych uszkodzeń wielu narządów ciała na skutek znacznie szybszego namnażania się bakterii i ich szybszego rozprzestrzeniania się po organizmie [82]. Chociaż nie udało się w pełni wyjaśnić przyczyn tego zjawiska (fagocytoza bakterii przez neutrofile nie była upośledzona), to uzyskane wyniki wskazują, że w tym przypadku żelatynaza B spełnia rolę ochronną, a zahamowanie jej aktywności jest niekorzystne.

W badaniach na modelu zapalenia jamy otrzewnej wywołanego podaniem zymosanu napływ neutrofilów do ogniska zapalnego również był osłabiony u myszy MMP-9^{-/-} (ryc. 2) [44]. Obniżeniu napływu neutrofilów nie towarzyszyły zmiany w poziomie cytokin prozapalnych (TNF- α) i chemokin (CXCL1/KC). Dalsze badania wykazały jednak, że na późnych etapach zapalenia otrzewnej liczba neutrofilii nie zmniejszała się u myszy MMP-9^{-/-} podczas gdy u myszy MMP-9^{+/+} dochodziło do spadku liczby neutrofilów, głównie na skutek ich wejścia w proces apoptozy (ryc. 2) [44].

Postawiono dwie hipotezy mogące wytłumaczyć to zjawisko: (1) część neutrofilów, bądź wszystkie komórki, ginie śmiercią apoptotyczną po wykonaniu swoich funkcji w ognisku zapalnym, ale na skutek zwiększonej aktywności innego enzymu o podobnej do żelatynazy B specyfice substratowej ciągle dochodzi do napływu neutrofilów do otrzewnej i/lub (2) proces apoptozy nie przebiega w sposób prawidłowy i u myszy MMP-9^{-/-} nie dochodzi do kontrolowanej śmierci neutrofilów. To ostatnie zjawisko zostanie szerzej omówione w odrębnym podrozdziale.

W celu zweryfikowania pierwszej z hipotez wyselekcjonowano enzym mogący potencjalnie kompensować aktywność MMP-9 czyli elastazę neutrofilową – NE (ang. *neutrophil elastase*). NE, podobnie jak MMP-9, jest wytwarzana w trakcie dojrzewania neutrofilów i magazynowana w ich ziarnistościach, skąd może być uwalniana po stymulacji komórki [21]. Substraty degradowane przez NE obejmują żelatynę, fibronektynę, laminę, proteoglikany, a więc takie, które budują błony podstawne i macierz zewnątrzkomórkową i które są równocześnie rozkładane przez żelatynazę B [110,111]. Ponadto istnieją doniesienia wskazujące na podobny czas



RYCINA 2. Schematyczne porównanie przebiegu najważniejszych etapów eksperymentalnego zapalenia jamy otrzewnej wywołanego zymosanem u myszy z wyłączonym genem kodującym MMP-9 (MMP-9^{-/-}) i myszy kontrolnych (MMP-9^{+/+}). Na wczesnych etapach zapalenia (górny panel) brak MMP-9 osłabia napływ neutrofilów do ogniska zapalnego u myszy MMP-9^{-/-}, co skutkuje obniżoną liczbą tych komórek w apogeum reakcji zapalnej (panel środkowy). Z czasem u myszy MMP-9^{-/-} dochodzi do wzrostu aktywności przynajmniej jednej proteazy (elastazy neutrofilowej, NE) co powoduje, że neutrofile ciągle napływają do jamy otrzewnej, a równocześnie mniej neutrofilów już obecnych w ognisku zapalnym ginie śmiercią apoptotyczną (panel dolny) (na podstawie [44,45,46,48])

uwalniania obu enzymów i ich wzajemną zależność, taką jak aktywacja przez NE pro-MMP-9 i równoczesne inaktywowanie jej naturalnego inhibitora TIMP-1, a z drugiej strony degradacja przez MMP-9 naturalnego inhibitora NE – α 1-antytrypsyny [21]. W badaniach na modelu zapalenia otrzewnej wywołanego przez zymosan wykazano, że u myszy MMP-9^{-/-} ekspresja NE na poziomie mRNA i białka oraz aktywność enzymatyczna tego białka są istotnie zwiększone na późnych etapach zapalenia. Badania z zastosowaniem selektywnego inhibitora NE potwierdziły, że istotnie wzrost ekspresji i aktywności elastazy neutrofilowej na późnych etapach zapalenia powoduje dalszy napływ neutrofilów do ogniska zapalenia. Nie jest to jednak jedyny mechanizm kompensacyjny, gdyż po zahamowaniu NE liczba neutrofilów u myszy MMP-9^{-/-} była ciągle dwukrotnie większa niż u myszy kontrolnych MMP-9^{+/+} [45] (ryc. 2 i 3).

Wpływ MMP-9 na apoptozę komórek

Jak wspomniano wcześniej, do zmian w przebiegu odczynu zapalnego u myszy pozbawionych MMP-9 może także dochodzić w wyniku zaburzeń w przebiegu procesu apoptozy komórek zapalnych. Apoptoza jest fizjologiczną, genetycznie regulowaną śmiercią komórki, niezbędną do prawidłowego funkcjonowania organizmu, gdyż umożliwia usunięcie komórki bez inicjowania reakcji zapalnej [10].

U myszy transgenicznych pozbawionych MMP-9 obserwowano zaburzenia w przebiegu apoptozy komórek. U zwierząt MMP-9^{-/-} stwierdzono między innymi opóźnienie w przebiegu apoptozy dojrzewających chondrocytów, co prowadziło do przerostu płytki wzrostu chrząstki w rozwijającej się kości u kilkutygodniowych myszy [102]. Z czasem u dojrzałych zwierząt proces ten ustaje, najprawdopodobniej na skutek rozwoju mechanizmów kompensujących. Również w trakcie rozwoju mózgu obserwowano osłabioną apoptozę komórek ziarnistych kory mózgu i neuronów Purkiniego [97]. Większość doniesień dotyczących zmian w przebiegu apoptozy komórek obserwowano w reakcjach zapalnych i stanach patologicznych. W przypadku eksperymentalnego modelu chronicznej niewydolności serca stwierdzono, że brak MMP-9 obniżał apoptozę komórek śródłonka wosierdziowego, a zjawisku temu towarzyszyło obniżenie poziomu aktywnej kaspazy-3 [78]. Podobne zjawisko zaobserwowano w przebiegu cukrzycy typu II, której to chorobie często towarzyszą zmiany w śródłonku naczyń, zwłaszcza wewnątrzsercowych [12].

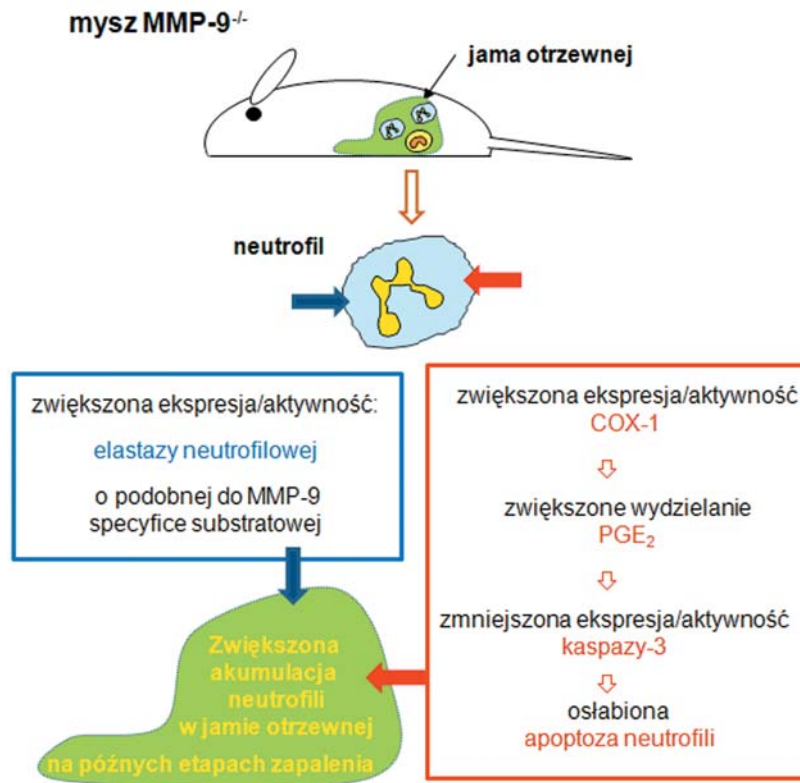
Z kolei podczas regeneracji wątroby, po jej częściowym eksperymentalnym usunięciu u myszy MMP-9^{-/-}, w przeciwieństwie do myszy dzikich, wykryto osłabioną apoptozę hepatocytów oraz osłabioną aktywność (ale nie ekspresję) kaspazy-3 [75]. Także w przypadku ostrego zapalenia wątroby wywołanego podaniem lipopolisacharydu (LPS) i galaktozaminy wykazano obniżenie liczby apoptotycznych hepatocytów i prawie całkowity brak aktywnej kaspazy-3 u myszy nieprodukujących żelatynazy B [106]. Kolejne doniesienie o zakłóceniach w przebiegu apoptozy pochodzi z badań nad utratą komórek zwojowych siatkówki oka, co ma miejsce m.in. w przebiegu jaskry [17]. U myszy dzikich MMP-9^{+/+}, u których wywołano objawy towarzyszące jaskrze (przez podwiązanie nerwu wzrokowego) zaobserwowano, że apoptoza komórek zwojowych siatkówki koreluje z rozkładem lamininy

w ograniczającej je błonie podstawnej i wzrostem aktywności żelatynazy B [17]. Natomiast u myszy MMP-9^{-/-} prawie w ogóle nie stwierdzono obecności komórek apoptotycznych, rozkładu lamininy, czy uszkodzenia komórek [17].

Powyższe zjawiska dotyczyły zaburzeń w przebiegu apoptozy komórek nie przemieszczających się w organizmie (w przeciwieństwie do leukocytów). Jest to istotne ze względu na fakt, że macierz zewnątrzkomórkowa stanowi rodzaj rusztowania dla komórek tworzących tkanki i narządy. W takim przypadku sam fakt degradacji błon podstawnych lub ECM może wywołać apoptozę komórek [86]. Ponadto w większości opisanych przykładów u myszy MMP-9^{-/-} stwierdzono powiązanie pomiędzy upośledzoną apoptozą a zakłóceniami w ekspresji i/lub aktywacji kaspazy-3, która bezpośrednio inicjuje fragmentację DNA. Zwłaszcza znamienne jest to, że czasami wręcz nie obserwowano zmian w ekspresji, a tylko w aktywacji kaspazy-3 [75,106]. Sugeruje to, że kaspaza-3 może być jednym z substratów żelatynazy B.

W badaniach na eksperymentalnym modelu zapalenia jamy otrzewnej wywołanym zymosanem wykazano, że apoptoza zapalnych neutrofilów (w przeciwieństwie do makrofagów, mastocytów czy limfocytów T i B) jest istotnie obniżona na późnych etapach zapalenia jamy otrzewnej u myszy MMP-9^{-/-} (ryc. 2 i 3) [46,48]. Jedną z grup czynników sterujących wejściem na ścieżkę apoptotyczną są prostaglandyny, przy czym prostaglandyny prozapalne, takie jak PGE₂, hamują rozpoczęcie apoptozy, podczas gdy przeciwzapalne prostaglandyny, z PGD₂ na czele, inicjują ten proces [65]. Prostaglandyny powstają z kwasu arachidonowego pod wpływem aktywności enzymatycznej cyklooksygenaz – COX (ang. *cyclooxygenases*), enzymów występujących w dwóch wariantach – konstytutywnej (COX-1) i indukowalnej (COX-2) [85]. Podczas zapalenia jamy otrzewnej wywołanego zymosanem ekspresja genu i białka COX-1 oraz jego aktywność enzymatyczna była silniejsza u myszy MMP-9^{-/-}, a towarzyszył temu znaczący wzrost produkcji PGE₂ [48]. Selektywne zahamowanie COX-1 obniżało liczbę neutrofilów gromadzących się w otrzewnej oraz apoptotycznych leukocytów w ognisku zapalnym na późnych etapach zapalenia [48]. Ponadto u myszy MMP-9^{-/-} z zymosanowym zapaleniem otrzewnej stwierdzono anomalie na różnych etapach procesu apoptozy, w tym w ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2, pro-apoptotycznego Bax oraz kaspaz inicjujących apoptozę -8 i -9 [46].

Badania te wykazały więc, że w przebiegu zapalenia otrzewnej wywołanego zymosanem u myszy MMP-9^{-/-} dochodzi równocześnie do kilku zmian prowadzących do nadmiernej akumulacji neutrofilów na późnych etapach zapalenia (ryc. 3). Z czasem dochodzi do wzrostu ekspresji i aktywności elastazy neutrofilowej (NE), co prowadzi do zwiększonego napływu neutrofilów do otrzewnej [45]. Ponieważ jednak wzrost poziomu NE następuje na późnych etapach zapalenia, również napływ neutrofilów jest przesunięty w czasie. Równocześnie dochodzi do wzrostu ekspresji i aktywności COX-1, co prowadzi do wzrostu syntezy PGE₂ [48]. Prostaglandyna ta, działając antyapoptotycznie, hamuje ekspresję kaspazy-3 w neutrofilach. A to z kolei prowadzi do zahamowania ich śmierci w ognisku zapalnym (ryc. 3). Przyczyna wzrostu ekspresji COX-1 u myszy MMP-9^{-/-} nie jest jasna, zwłaszcza że u myszy geny kodujące oba enzymy występują na różnych chromosomach (MMP-9 na 2,



RYCINA 3 Mechanizmy towarzyszące reakcji zapalnej jamy otrzewnej u myszy z wyłączonym genem kodującym MMP-9 (MMP-9^{-/-}). U myszy MMP-9^{-/-} początkowo brak produkcji MMP-9 skutkuje obniżonym napływem neutrofilów do jamy otrzewnej stymulowanej zymosanem, jednak z czasem dochodzi do rozwoju mechanizmów kompensujących powodując zwiększoną, w stosunku do myszy kontrolnych, akumulację neutrofilów w ognisku zapalnym. Jest to spowodowane dwoma głównymi zjawiskami: (1) zwiększoną ekspresją i aktywnością elastazy neutrofilowej (NE), która umożliwia diapedezę/chemotaksję neutrofilów na późnych etapach zapalenia oraz (2) zmianami w ekspresji cyklooksygenazy 1 (COX-1), której zwiększona aktywność powoduje zwiększone wydzielanie anty-apoptotycznej prostaglandyny E₂ (PGE₂) hamując ekspresję/aktywność wykonawczej kaspazy-3. Powoduje to, że mniej neutrofilów obecnych w jamie otrzewnej ulega śmierci apoptotycznej [46,48]

COX-1 na 1). Jednak wzajemne powiązania ich ekspresji obserwowano już uprzednio, np. często opisywano obniżenie poziomu MMP-9 po zahamowaniu aktywności COX-2 [89].

Wszystkie powyższe doniesienia wskazują więc na udział MMP-9 w procesie apoptozy i sugerują, że kaspaza-3 jest tym elementem w szlaku apoptotycznym, który jest zależny od żelatynazy B. Udział MMP-9 w apoptozie potwierdzają też wyniki badań pokazujące, że TIMP-1, naturalny inhibitor żelatynazy B, chroni komórki przed tym rodzajem śmierci. Na przykład w badaniach nad odmiedniczkowym zapaleniem nerek wywołanym przez *Escherichia coli* wykazano, że podanie egzogenego TIMP-1 zwiększało właściwości bakteriobójcze neutrofilów, hamowało ich migrację oraz chroniło je przed wejściem w apoptozę [20].

ROZWÓJ MECHANIZMÓW KOMPENSUJĄCYCH U MYSZY MMP-9^{-/-}

U myszy transgenicznych nie wytwarzających danego białka stosunkowo często dochodzi do rozwoju mechanizmów kompensujących. Rozwój takich mechanizmów wskazuje na istnienie zjawiska redundancji, czyli możliwości wykonywania jednej funkcji przez więcej niż jedno białko, np. enzym. Z punktu widzenia funkcjonowania organizmu jest to zjawisko korzystne oznaczające, że w przypadku pojawiających się niedoborów (np. na skutek mutacji pojedynczych genów) organizm może funkcjonować prawie tak jak w przypadku syntezy danego białka. U myszy MMP-9^{-/-} często obserwowano rozwój mechanizmów kompensujących dotyczących głównie wzrostu aktywności innych MMP lub proteaz (np. [26,112], tab. 3). Równocześnie należy podkreślić, że u myszy MMP-9^{-/-} nie stwierdzono pojawienia się innych aberracji genetycznych. Dowodem na to są m.in. badania, w których przeszczepiano komórki zawierające żelatynazę B, a pochodzące od myszy dzikich (MMP-9^{+/+}) zwierzętom MMP-9^{-/-}, co prowadziło do odwrócenia efektu obserwowanego w tej ostatniej grupie zwierząt (np. [22,40]). Kolejnym dowodem na rozwój mechanizmów kompensujących u myszy MMP-9^{-/-} jest obserwacja pewnych objawów niedoboru enzymu u młodych, ale nie dorosłych zwierząt. Zjawisko takie obserwowano wielokrotnie i dotyczyło ono zarówno fizjologicznego rozwoju kości [102], oporności na rozwój autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia [25], jak i napływu neutrofilów w odpowiedzi na stymulację chemokinami [23]. Wreszcie rozwój mechanizmów kompensacyjnych można wykryć porównując wyniki uzyskane u myszy MMP-9^{-/-} z tzw. *double knockout mice*, czyli myszami, u których wyłączone są dwa geny, np. kodujący MMP-9 i MMP-2. Przykładowo, myszy MMP-9^{-/-}/MMP-2^{-/-} oraz pojedyncze *knockouty* pozbawione danej żelatynazy użyto w badaniach nad zwyrodnieniem plamki ocznej prowadzącym do ślepoty. U MMP-9^{-/-} i MMP-2^{-/-} proces ten był istotnie obniżony, podczas gdy u zwierząt MMP-9^{-/-}/MMP-2^{-/-} efekt ten był znacznie silniejszy [52]. Wyniki te wskazują, że w powyższym modelu brak jednej z żelatynaz był kompensowany przez drugi z enzymów.

PODSUMOWANIE

Pod względem budowy i funkcji wśród MMP wyróżnia się żelatynaza B. Jest ona niezbędna dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania niektórych układów, a także odgrywa istotną rolę w reakcjach zapalnych i patologicznych. Zazwyczaj jej rola polega na umożliwieniu napływu leukocytów zapalnych do miejsca zakażenia lub uszkodzenia tkanki przez degradację składników błon podstawnych i macierzy zewnątrzkomórkowej bądź aktywację cytokin i chemokin. Jednak w niektórych przypadkach MMP-9 chroni tkanki przed nadmiernym zniszczeniem, a wtedy wynika to z efektu przeciwnego – degradacji chemokin i ograniczenia napływu neutrofilów. Ponadto wykazano, że żelatynaza B odgrywa ważną rolę w apoptozie różnych typów komórek poprzez wpływ na aktywność kaspazy-3. Wiele z powyższych zależności odkryto dzięki badaniom na myszach transgenicznych z wyłączonym genem kodującym MMP-9. Ponadto przedstawione wyniki badań na myszach MMP-9^{-/-} sugerują, że w

przypadku stworzenia selektywnych inhibitorów żelatynazy B ich stosowanie musi być ściśle dostosowane do konkretnych reakcji zapalnych, gdyż w niektórych przypadkach może doprowadzić do pogłębienia stanów patologicznych.

LITERATURA

- [1] ALBAICETA GM, GUTIERREZ-FERNANDEZ A, PARRA D, ASTUDILLO A, GARCIA-PRieto E, TABOADA F, FUEYO A. Lack of matrix metalloproteinase-9 worsens ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; **294**: L535–543.
- [2] ALLPORT JR, LIM YC, SHIPLEY JM, SENIOR RM, SHAPIRO SD, MATSUYOSHIN, VESTWEBER D, LUSCINSKAS FW. Neutrophils from MMP-9- or neutrophil elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow *in vitro*. *J Leukoc Biol* 2002; **71**: 821–828.
- [3] ANDREWS KL, BETSUYAKU T, ROGERS S, SHIPLEY JM, SENIOR RM, MINER JH. Gelatinase B (MMP-9) is not essential in the normal kidney and does not influence progression of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Am J Pathol* 2000; **157**: 303–311.
- [4] ASAMI M, WANG X, MORI T, SUMII T, JUNG JC, MOSKOWITZ MA, FINI ME, LO EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; **21**: 7724–7732.
- [5] AURELIL, GIOIAM, CERBARAI, MONACO S, FASCIGLIONE GF, MARINI S, ASCENZI P, TOPAI A, COLETTA M. Structural bases for substrate and inhibitor recognition by matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2008; **15**: 2192–2222.
- [6] BAUER EA, EISEN AZ, JEFFREY JJ. Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta* 1970; **206**: 152–160.
- [7] BETSUYAKU T, SHIPLEY JM, LIU Z, SENIOR RM. Gelatinase B deficiency does not protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chest* 1999; **116**: 17S–18S.
- [8] BETSUYAKU T, SHIPLEY JM, LIU Z, SENIOR RM. Neutrophil emigration in the lungs, peritoneum, and skin does not require gelatinase B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **20**: 1303–1309.
- [9] BIENIASZ M, BARTKOWIAK J, SZEMRAJ J. Ekspresja genów kodujących białka morfogenetyczne kości, metaloproteinazy i inhibitory metaloproteinaz w nowotworach płuc i ich znaczenie rokownicze. *Post Biochem* 2008; **54**: 82–90.
- [10] BLANK M, SHILOH Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 2007; **6**: 686–695.
- [11] BRINCKERHOFF CE, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 207–214.
- [12] CAMP TM, TYAGI SC, SENIOR RM, HAYDEN MR, TYAGI SC. Gelatinase B (MMP-9) an apoptotic factor in diabetic transgenic mice. *Diabetologia* 2003; **46**: 1438–1445.
- [13] CASTANEDA FE, WALIA B, VIJAY-KUMAR M, PATEL NR, ROSER S, KOLACHALA VL, ROJAS M, WANG L, OPREA G, GARG P, GEWIRTZ AT, ROMAN J, MERLIN D, SITARAMAN SV. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 2005; **129**: 1991–2008.
- [14] CATALDO DD, TOURNOY KG, VERMAELEN K, MUNAUT C, FOIDART JM, LOUIS R, NOEL A, PAUWELS RA. Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *Am J Pathol* 2002; **161**: 491–498.
- [15] CATANIA JM, CHEN G, PARRISH AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F905–911.
- [16] CAUWE B, VAN DEN STEEN PE, OPDENAKKER G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; **42**: 113–185.
- [17] CHINTALA SK, ZHANG X, AUSTIN JS, FINI ME. Deficiency in matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) protects against retinal ganglion cell death after optic nerve ligation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 47461–47468.
- [18] CHO A, REIDY MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* 2002; **91**: 845–851.

- [19] CHRISTIAENS I, ZARAGOZA DB, GUILBERT L, ROBERTSON SA, MITCHELL BF, OLSON DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* 2008; **79**: 50–57.
- [20] CHROMEK M, TULLUS K, LUNDAHL J, BRAUNER A. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects them from apoptosis, and blocks their transmigration during inflammation. *Infect Immun* 2004; **72**: 82–88.
- [21] CHUA F, LAURENT GJ. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc* 2006; **3**: 424–427.
- [22] CRAMER DE, WAGNER S, LI B, LIU J, HANSEN R, RECA R, WU W, SURMA EZ, LABER DA, RATAJCZAK MZ, YAN J. Mobilization of hematopoietic progenitor cells by yeast-derived beta-glucan requires activation of matrix metalloproteinase-9. *Stem Cells* 2008; **26**: 1231–1240.
- [23] D'HAESE A, WUYTS A, DILLEN C, DUBOIS B, BILLIAU A, HEREMANS H, VAN DAMME J, ARNOLD B, OPDENAKKER G. In vivo neutrophil recruitment by granulocyte chemotactic protein-2 is assisted by gelatinase B/MMP-9 in the mouse. *J Interferon Cytokine Res* 2000; **20**: 667–674.
- [24] DUBOIS B, ARNOLD B, OPDENAKKER G. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest* 2000; **106**: 627–628.
- [25] DUBOIS B, MASURE S, HURTENBACH U, PAEMEN L, HEREMANS H, VAN DEN OORD J, SCIOT R, MEINHARDT T, HAMMERLING G, OPDENAKKER G, ARNOLD B. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1507–1515.
- [26] DUCHARME A, FRANTZ S, AIKAWA M, RABKIN E, LINDSEY M, ROHDE LE, SCHOEN FJ, KELLY RA, WERB Z, LIBBY P, LEE RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000; **106**: 55–62.
- [27] EDELBLUM KL, YAN F, YAMAOKA T, POLK DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 413–424.
- [28] EGEBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 161–174.
- [29] FLANNERY CR. MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front Biosci* 2006; **11**: 544–569.
- [30] GALIS ZS, JOHNSON C, GODIN D, MAGID R, SHIPLEY JM, SENIOR RM, IVAN E. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 2002; **91**: 852–859.
- [31] GOMIS-RUTH FX, MASKOS K, BETZ M, BERGNER A, HUBER R, SUZUKI K, YOSHIDA N, NAGASE H, BREW K, BOURENKOV GP, BARTUNIK H, BODE W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; **389**: 77–81.
- [32] GREENWALD SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol* 2007; **211**: 157–172.
- [33] GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; **48**: 1014–1022.
- [34] HAMADA T, FONDEVILA C, BUSUTTL RW, COITO AJ. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2008; **47**: 186–198.
- [35] HARPER E, BLOCH KJ, GROSS J. The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry* 1971; **10**: 3035–3041.
- [36] HRABEC E, NADUK J, STREK M, HRABEC Z. Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory. *Post Biochem* 2007; **53**: 37–45.
- [37] HUHTALA P, TUUTILA A, CHOW LT, LOHI J, KESKI-OJA J, TRYGGVASON K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 16485–16490.
- [38] IYER V, PUMIGLIA K, DIPERSIO CM. Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1185–1195.
- [39] JIANG Y, MUSCHEL RJ. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 1910–1914.
- [40] JOHNSON C, GALIS ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 54–60.
- [41] KJELDSEN L, JOHNSEN AH, SENGELOV H, BORREGAARD N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10425–10432.

- [42] KOLACZKOWSKA E. Zapalenie (ostre) jako reakcja korzystna dla organizmu – historia badań a najnowsze osiągnięcia. *Kosmos* 2007; **56**: 27–38.
- [43] KOLACZKOWSKA E, ARNOLD B, OPDENAKKER G. Gelatinase B/MMP-9 as an inflammatory marker enzyme in mouse zymosan peritonitis: comparison of phase-specific and cell-specific production by mast cells, macrophages and neutrophils. *Immunobiology* 2008; **213**: 109–124.
- [44] KOLACZKOWSKA E, CHADZINSKA M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PLYTYCZ B, OPDENAKKER G, ARNOLD B. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. *Immunobiology* 2006; **211**: 137–148.
- [45] KOLACZKOWSKA E, GRZYBEK W, VAN ROOIJEN N, PICCARD H, PLYTYCZ B, ARNOLD B, OPDENAKKER G. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 2009; **85**: 374–381.
- [46] KOLACZKOWSKA E, KOZIOLA, PLYTYCZ B, ARNOLD B, OPDENAKKER G. Altered apoptosis of inflammatory neutrophils in MMP-9-deficient mice is due to lower expression and activity of caspase-3. *Immunol Lett* 2009; **126**: 73–82.
- [47] KOLACZKOWSKA E, LELITO M, KOZAKIEWICZ E, VAN ROOIJEN N, PLYTYCZ B, ARNOLD B. Resident peritoneal leukocytes are important sources of MMP-9 during zymosan peritonitis: superior contribution of macrophages over mast cells. *Immunol Lett* 2007; **113**: 99–106.
- [48] KOLACZKOWSKA E, PLYTYCZ B, ARNOLD B, PICCARD H, OPDENAKKER G. Increased cyclooxygenase activity impairs apoptosis of inflammatory neutrophils in mice lacking gelatinase B/matrix metalloproteinase-9. *Immunology* 2009; **128**: e262–e274.
- [49] KOLACZKOWSKA E, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, CHADZINSKA M, PLYTYCZ B, VAN ROOIJEN N, OPDENAKKER G, ARNOLD B. Enhanced early vascular permeability in gelatinase B (MMP-9)-deficient mice: putative contribution of COX-1-derived PGE₂ of macrophage origin. *J Leukoc Biol* 2006; **80**: 125–132.
- [50] KOLACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 33–42.
- [51] KORPOS E, WU C, SOROKIN L. Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Curr Pharm Des* 2009; **15**: 1349–1357.
- [52] LAMBERT V, WIELOCKXB, MUNAUT C, GALOPIN C, JOST M, ITOH T, WERB Z, BAKER A, LIBERT C, KRELL HW, FOIDART JM, NOEL A, RAKIC JM. MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *Faseb J* 2003; **17**: 2290–2292.
- [53] LANONE S, ZHENG T, ZHU Z, LIU W, LEE CG, MA B, CHEN Q, HOMER RJ, WANG J, RABACH LA, RABACH ME, SHIPLEY JM, SHAPIRO SD, SENIOR RM, ELIAS JA. Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest* 2002; **110**: 463–474.
- [54] LARSEN PH, DASILVA AG, CONANT K, YONG VW. Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice. *J Neurosci* 2006; **26**: 2207–2214.
- [55] LIN CC, KUO CT, CHENG CY, WU CY, LEE CW, HSIEH HL, LEE IT, YANG CM. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal* 2009; **21**: 1652–1662.
- [56] LINN R, DUPONT BR, KNIGHT CB, PLAETKE R, LEACH RJ. Reassignment of the 92-kDa type IV collagenase gene (*CLG4B*) to human chromosome 20. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **72**: 159–161.
- [57] MAINARDI CL, HIBBS MS, HASTY KA, SEYER JM. Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Coll Relat Res* 1984; **4**: 479–492.
- [58] MAJNO G, JORIS I. Cells, tissues, and disease: principles of general pathology. Oxford, Blackwell, 2004.
- [59] MALIK M, BAKSHI CS, MCCABE K, CATLETT SV, SHAHA, SINGH R, JACKSON PL, GAGGAR A, METZGER DW, MELENDEZ JA, BLALOCK JE, SELLATI TJ. Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of *Francisella tularensis*. *J Immunol* 2007; **178**: 1013–1020.
- [60] MALLA N, SJOLI S, WINBERG JO, HADLER-OLSEN E, UHLIN-HANSEN L. Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. *Connect Tissue Res* 2008; **49**: 180–184.
- [61] MCQUIBBAN GA, GONG JH, TAM EM, MCCULLOCH CA, CLARK-LEWIS I, OVERALL CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; **289**: 1202–1206.

- [62] MEIGHAN SE, MEIGHAN PC, CHOUDHURY P, DAVIS CJ, OLSON ML, ZORNES PA, WRIGHT JW, HARDING JW. Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem* 2006; **96**: 1227–1241.
- [63] MENG N, LI Y, ZHANG H, SUN XF. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histol Histopathol* 2008; **23**: 1003–1010.
- [64] MICHALUK P, KOLODZIEJ L, MIODUSZEWSKA B, WILCZYNSKI GM, DZWONEK J, JAWORSKI J, GORECKI DC, OTTERSEN OP, KACZMAREK L. Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem* 2007; **282**: 16036–16041.
- [65] MILLER SB. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum* 2006; **36**: 37–49.
- [66] MOCCHEGIANI E, COSTARELLI L, GIACCONI R, CIPRIANO C, MUTI E, MALAVOLTA M. Zinc-binding proteins (metallothionein and alpha-2 macroglobulin) and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2006; **41**: 1094–1107.
- [67] MUNAUT C, SALONURMI T, KONTUSAARI S, REPONEN P, MORITA T, FOIDART JM, TRYGGVASON K. Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem* 1999; **274**: 5588–5596.
- [68] MURPHY G, NAGASE H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; **29**: 290–308.
- [69] NAGASE H, BARRETT AJ, WOESSNER JF, JR. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992; **1**: 421–424.
- [70] NAGY V, BOZDAGI O, MATYNIAA, BALCERZYK M, OKULSKI P, DZWONEK J, COSTA RM, SILVA AJ, KACZMAREK L, HUNTLEY GW. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* 2006; **26**: 1923–1934.
- [71] NAIR RR, SOLWAY J, BOYD DD. Expression cloning identifies transgelin (SM22) as a novel repressor of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) expression. *J Biol Chem* 2006; **281**: 26424–26436.
- [72] NOBLE LJ, DONOVAN F, IGARASHI T, GOUSSEV S, WERB Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci* 2002; **22**: 7526–7535.
- [73] NUTTALL RK, SAMPIERI CL, PENNINGTON CJ, GILL SE, SCHULTZ GA, EDWARDS DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett* 2004; **563**: 129–134.
- [74] ODAKA C, TANIOKA M, ITOH T. Matrix metalloproteinase-9 in macrophages induces thymic neovascularization following thymocyte apoptosis. *J Immunol* 2005; **174**: 846–853.
- [75] OLLE EW, REN X, MCCLINTOCK SD, WARNER RL, DEGRACIAS MP, JOHNSON KJ, COLLETTI LM. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2006; **44**: 540–549.
- [76] OPDENAKKER G, DILLEN C, FITEN P, MARTENS E, VAN AELST I, VAN DEN STEEN PE, NELISSEN I, STARCKX S, DESCAMPS FJ, HU J, PICCARD H, VAN DAMME J, WORMALD MR, RUDD PM, DWEK RA. Remnant epitopes, autoimmunity and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1760**: 610–615.
- [77] OPDENAKKER G, VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, VAN COILLIE E, MASURE S, PROOST P, VAN DAMME J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 851–859.
- [78] OVECHKIN AV, TYAGI N, RODRIGUEZ WE, HAYDEN MR, MOSHAL KS, TYAGI SC. Role of matrix metalloproteinase-9 in endothelial apoptosis in chronic heart failure in mice. *J Appl Physiol* 2005; **99**: 2398–2405.
- [79] PELUS LM, BIAN H, KING AG, FUKUDA S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. *Blood* 2004; **103**: 110–119.
- [80] RA HJ, PARKS WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; **26**: 587–596.
- [81] RATZINGER G, STOITZNER P, EBNER S, LUTZ MB, LAYTON GT, RAINER C, SENIOR RM, SHIPLEY JM, FRITSCH P, SCHULER G, ROMANI N. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* 2002; **168**: 4361–4371.

- [82] RENCKENS R, ROELOFS JJ, FLORQUIN S, DE VOS AF, LIJNEN HR, VAN'T VEER C, VAN DER POLL T. Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs host defense against abdominal sepsis. *J Immunol* 2006; **176**: 3735–3741.
- [83] REPONEN P, SAHLBERG C, HUHTALA P, HURSKAINEN T, THESLEFF I, TRYGGVASON K. Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Biol Chem* 1992; **267**: 7856–7862.
- [84] RONCO P, CHATZIANTONIOU C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. *Kidney Int* 2008; **74**: 873–878.
- [85] ROUZER CA, MARNETT LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009; **50** Suppl: S29–34.
- [86] ROWE RG, WEISS SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 560–574.
- [87] SALONURMI T, PARIKKA M, KONTUSAARI S, PIRILAE, MUNAUT C, SALO T, TRYGGVASON K. Overexpression of TIMP-1 under the MMP-9 promoter interferes with wound healing in transgenic mice. *Cell Tissue Res* 2004; **315**: 27–37.
- [88] SANTANA A, MEDINA C, PAZ-CABRERA MC, DIAZ-GONZALEZ F, FARRE E, SALAS A, RADOMSKI MW, QUINTERO E. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 6464–6472.
- [89] SHAKIBAEIM, JOHN T, SCHULZE-TANZIL G, LEHMANN I, MOBASHERIA. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 2007; **73**: 1434–1445.
- [90] SHUBAYEV VI, ANGERT M, DOLKAS J, CAMPANA WM, PALENSCAR K, MYERS RR. TNFalpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci* 2006; **31**: 407–415.
- [91] SOPATA I, DANCEWICZ AM. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta* 1974; **370**: 510–523.
- [92] STRONGINAY, COLLIERI, BANNIKOV G, MARMER BL, GRANT GA, GOLDBERG GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5331–5338.
- [93] SU J, PALEN DI, LUCCHESI PA, MATROUGUI K. Mice lacking the gene encoding for MMP-9 and resistance artery reactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1177–1181.
- [94] SZYMANSKA H. Genetycznie zmodyfikowane myszy jako modele do badań w onkologii. *Post Hig Med Dosw* 2007; **61**: 639–645.
- [95] TANAKA A, YAMANE Y, MATSUDA H. Mast cell MMP-9 production enhanced by bacterial lipopolysaccharide. *J Vet Med Sci* 2001; **63**: 811–813.
- [96] TAYLOR JL, HATTLE JM, DREITZ SA, TROUDT JM, IZZO LS, BASARABA RJ, ORME IM, MATRISIAN LM, IZZO AA. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2006; **74**: 6135–6144.
- [97] VAILLANT C, MEISSIREL C, MUTIN M, BELIN MF, LUND LR, THOMASSET N. MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 2003; **24**: 395–408.
- [98] VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; **37**: 375–536.
- [99] VAN DEN STEEN PE, PROOST P, WUYTS A, VAN DAMME J, OPDENAKKER G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; **96**: 2673–2681.
- [100] VAN LINT P, LIBERT C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; **82**: 1375–1381.
- [101] VAN WART HE, BIRKEDAL-HANSEN H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5578–5582.
- [102] VU TH, SHIPLEY JM, BERGERS G, BERGER JE, HELMS JA, HANAHAHAN D, SHAPIRO SD, SENIOR RM, WERB Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; **93**: 411–422.

- [103] WARNER RL, BELTRAN L, YOUNKIN EM, LEWIS CS, WEISS SJ, VARANI J, JOHNSON KJ. Role of stromelysin 1 and gelatinase B in experimental acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **24**: 537–544.
- [104] WEGLARCZYK P. Genetyka molekularna. Warszawa, Polskie Wydawnictwo Naukowe, 2007.
- [105] YAN C, WANG H, BOYD DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha-induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 1164–1172.
- [106] YAN C, ZHOU L, HAN YP. Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure. *Liver Int* 2008; **28**: 959–971.
- [107] YAN L, BORREGAARD N, KJELDSEN L, MOSES MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37258–37265.
- [108] YANG Z, STRICKLAND DK, BORNSTEIN P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 2001; **276**: 8403–8408.
- [109] YOON HK, CHO HY, KLEEBERGER SR. Protective role of matrix metalloproteinase-9 in ozone-induced airway inflammation. *Environ Health Perspect* 2007; **115**: 1557–1563.
- [110] YOUNG RE, THOMPSON RD, LARBI KY, LA M, ROBERTS CE, SHAPIRO SD, PERRETTI M, NOURSHARGH S. Neutrophil elastase (NE)-deficient mice demonstrate a nonredundant role for NE in neutrophil migration, generation of proinflammatory mediators, and phagocytosis in response to zymosan particles *in vivo*. *J Immunol* 2004; **172**: 4493–4502.
- [111] YOUNG RE, VOISIN MB, WANG S, DANGERFIELD J, NOURSHARGH S. Role of neutrophil elastase in LTB4-induced neutrophil transmigration *in vivo* assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. *Br J Pharmacol* 2007; **151**: 628–637.
- [112] ZEISBERG M, KHURANAM, RAO VH, COSGROVE D, ROUGIER JP, WERNER MC, SHIELD CF, 3RD, WERB Z, KALLURI R. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med* 2006; **3**: e100.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 10.01. 2010 r.

Przyjęto: 18.02.2010 r.

Elżbieta Kołaczowska

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński, ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków

e-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl