

Udział metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs) w progresji czerniaka

***Aleksandra Zielińska, Małgorzata Latocha, Dariusz Kuśmierz, Elektra Sliupkas-Dyrda**

Zakład Biologii Komórki, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice
Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Małgorzata Latocha

MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPS) IN MELANOMA PROGRESSION

S u m m a r y

Melanoma (melanoma malignum) belongs to the group of neoplasms with extremely metastatic ability via lymphatic vessels as well as blood vessels. Many data suggest correlation between melanoma progression and proteolytic enzymes expression in cancer cells. The most important enzymes involved in melanoma progression are plasminogen activators and matrix metalloproteinases (MMPs).

MMPs are involved in physiological as well pathological processes and are engaged in remodeling and degradation of basement membrane and compounds of extracellular matrix. In cancer cells the changes in matrix metalloproteinases expression profile and changes of MMPs genes activity as well as the enzymatic activity of the proteinases are observed. It is assumed, the correlation exist between the expression profile as well as the expression level of MMPs enzymes and the stage of melanoma and the influence on prediction.

MMPs activity is regulated by interreaction with endogenous inhibitors: TIMP-1, -2, -3 and -4. The loss of balance between MMPs expression and the expression of TIMPs (tissue inhibitors of MMPs) is the reason of the excessive degradation of extracellular matrix compounds during tumor cells invasion. Melanoma cells may produce a number of MMPs, including: MMP-1, -2, -9, -13, -14 as well as their inhibitors: TIMP-1, -2, -3. Individual MMPs and TIMPs are engaged in different stages of melanoma progression. Therefore, those enzymes may be considered as potential melanoma biomarkers used in diagnosis and prediction of this cancer.

Key words: melanoma malignum, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, melanoma biomarker

WSTĘP

Czerniak (*melanoma malignum*) należy do grupy niezwykle inwazyjnych nowotworów o bardzo wysokiej zdolności tworzenia przerzutów drogą naczyń limfatycznych i krwionośnych. Wyniki prowadzonych badań sugerują, że w progresji czerniaka bardzo ważną rolę odgrywają różne układy enzymów proteolitycznych, do których należy system aktywatorów plazminogenu oraz rodzina metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs) (1).

Obecnie, zgodnie z rekomendacjami American Joint Committee on Cancer (AJCC), ocena i prognozowanie

przebiegu czerniaka oparte są na analizie głębokości naciekania, obecności owrzodzeń oraz liczby przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (2, 3). Dodatkowe kryteria prognostyczne to indeks mitotyczny, zwiększona objętości jądra komórkowego w stosunku do cytoplazmy komórki, występowanie ognisk satelitarnych, ocena węzła wartowniczego i inwazji węzłów chłonnych (3).

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej poprzez udział w degradacji składników macierzy pozakomórkowej, w tym błony podstawnej, zaangażowane są w proces inwazji komórek czerniaka (3). Dlatego też enzymy

te mogą być rozpatrywane jako potencjalne biomarkery czerniaka, a wiedza dotycząca ich zaangażowania w poszczególne etapy rozwoju tego nowotworu może przyczynić się do opracowania nowych metod diagnostycznych oraz metod pozwalających na prognozowanie.

CHARAKTERYSTYKA METALOPROTEINAZ

Metaloproteinazy (MMPs) stanowią liczną rodzinę enzymów proteolitycznych, których aktywność uzależniona jest od jonów Zn^{2+} i Ca^{2+} (4, 5). Biorą one udział w różnych procesach fizjologicznych oraz patologicznych. Zaangażowane są w procesy przebudowy i degradacji błony podstawnej oraz składników macierzy pozakomórkowej (ECM) (6). Do chwili obecnej scharakteryzowano 25 enzymów tej grupy (22 u człowieka) oraz ich 4 inhibitory (tkankowe inhibitory metaloproteinaz; TIMPs) (7, 8) (tab. 1). Ekspresja genów metaloproteinaz zachodzi niemal we wszystkich komórkach: w fibroblastach, keratynocytach, makrofagach, komórkach śródbłonna,

komórkach dendrytycznych Langerhansa, neuronach, komórkach mikrogleju, miocytach, a także w komórkach nacieku zapalnego: w monocytach, limfocytach T (8). Zwiększoną aktywność metaloproteinaz obserwuje się w różnych stanach patologicznych, m.in. w rozrostach nowotworowych, zapaleniu stawów, chorobach przyzębia, miażdżycy, kardiomiopatii rozrzeniowej, zawale mięśnia sercowego i chorobach skóry (9). W przypadku nowotworów, w większości których dochodzi do podwyższenia zarówno ekspresji, jak i aktywności metaloproteinaz, często wskazuje się na możliwość istnienia zależności poziomu ekspresji tych enzymów od stopnia zaawansowania nowotworu. Wyniki wielu badań wykazują negatywny wpływ zmiany profilu ekspresji MMPs na rokowanie, chociaż opisano także przypadki, np. w raku jelita grubego, gdzie zwiększona ekspresja wybranych metaloproteinaz (MMP-9, MMP-12) w komórkach nowotworowych związana jest z dłuższym czasem przeżycia i mniejszą zdolnością do przerzutowania (10).

Tabela 1. Klasyfikacja metaloproteinaz (7, 47, 48).

Grupa	MMPs	Nazwa alternatywna	Lokalizacja na ludzkim chromosomie	Substraty
Kolagenazy	MMP-1	Kolagenaza 1	11q22-23	Kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X, XI, żelatyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, tenascyna, vitronektyna, α 1-antychymotrypsyna, α 2-makroglobulina, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-2, pro-MMP-9, pro-TNF- α
	MMP-8	Kolagenaza 2	11q21-22	Kolagen typu I, II, III, agrekan, α 2-makroglobulina, fibrynogen
	MMP-13	Kolagenaza 3	11q22.3	Kolagen typu I, II, III, IV, VI, IX, XIV, żelatyna, agrekan, fibronektyna, tenascyna, α 2-makroglobulina, kazeina, czynnik krzepnięcia XII, fibrynogen, pro-MMP-9
	MMP-18	Kolagenaza 4	–	Kolagen typu I, żelatyna
Żelatynazy	MMP-2	Żelatynaza A	16q13	Kolagen typu I, II, III, IV, VII, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna, IGFBP, laminina, tenascyna, vitronektyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-9, pro-MMP-13, plazminogen, pro-TNF- α
	MMP-9	Żelatynaza B	20q11.2-q13.1	Kolagen typu IV, V, XI, XIV, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, IGFBP, laminina, vitronektyna, α 2-makroglobulina, endotelina, kazeina, fibryno-gen, IL-1 β , pro-MMP-2, plazminogen, pro-TNF- α
Stromelizyny	MMP-3	Stromelizyna 1	11q23	Kolagen typu III, IV, V, VII, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, IGFBP, laminina, osteonektyna, perlekan, tenascyna, vitronektyna, α 1-antychymotrypsyna, α 2-makroglobulina, kazeina, E-kadheryna, fibryna, fibrynogen, IL-1 β , pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, pro-TNF- α
	MMP-10	Stromelizyna 2	11q22.3-23	Kolagen typu III, IV, V, żelatyna, agrekan, elastyna, fibronektyna, kazeina, fibrynogen, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9
	MMP-11	Stromelizyna 3	22q11.2	IGFB, α 2-makroglobulina
Matrylizyny	MMP-7	Matrylizyna 1	11q21-22	Kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, tenascyna, vitronektyna, kazeina, E-kadheryna, fibrynogen, pro-MMP-1, pro-MMP-9, plazminogen, pro-TNF- α
	MMP-26	Matrylizyna 2	11p15	Kolagen typu IV, żelatyna, fibrynogen, fibronektyna, vitronektyna, kazeina, pro-MMP-9

Grupa	MMPs	Nazwa alternatywna	Lokalizacja na ludzkim chromosomie	Substraty
Metaloproteinazy błonowe	MMP-14	MT1-MMP	14q11-q12	Kolagen typu I, II, III, żelatyna, agrekan, entaktyna, fibronektyna, perlekan, vitronektyna, α 2-makroglobulina, CD44, czynnik XII, fibryna, fibrynogen, α v-integryna, pro-MMP-2, pro-MMP-13, tenascyna, pro-TNF- α
	MMP-15	MT2-MMP	15q13-q21	Agrekan, entaktyna, fibronektyna, laminina, perlekan, tenascyna, pro-MMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	8q21	Kolagen typu III, żelatyna, kazeina, fibronektyna, pro-MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	12q24.3	Żelatyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-2, pro-TNF- α
	MMP-24	MT5-MMP	20q11.2	Żelatyna, fibronektyna, pro-MMP-2
	MMP-25	MT6-MMP	16p13.3	Kolagen typu IV, żelatyna, fibronektyna, fibrynogen, fibryna, pro-MMP-2
Inne	MMP-12	Metaloelektaza	11q22.2-q22.3	Kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, vitronektyna, czynnik XII, α 2-makroglobulina, fibrynogen, IgG, plazminogen, pro-TNF- α
	MMP-19	–	12q14	Kolagen typu I, IV, żelatyna, fibronektyna, laminina, agrekan, entaktyna, tenascyna,
	MMP-20	Enamelizyna	11q22	Kolagen typu XVIII, amelogenina, agrekan
	MMP-21	XMMP	1p36	–
	MMP-22	CMMP	1p36.3	Żelatyna
	MMP-23	CA-MMP	1p36.3	Żelatyna
	MMP-27	CMMP	11q24	–
	MMP-28	Epilizyna	17q21.1	Kazeina

FUNKCJA FIZJOLOGICZNA MMPs

Fizjologiczna rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej nadal nie jest dobrze poznana. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej zaangażowane są w przebieg dwóch bardzo ważnych procesów biologicznych: rozwoju embrionalnego oraz morfogenezy tkanek. Prawidłowy przebieg tych procesów wymaga naruszenia ciągłości błony podstawnej w celu umożliwienia migracji komórek oraz przebudowy mikrośrodowiska zewnątrzkomórkowego (11, 12). Podwyższona ekspresja większości metaloproteinaz jest charakterystyczna dla procesów związanych z rozrodem (m.in.: cykl menstruacyjny, owulacja, inwolucja macicy, piersi i gruczołu krokowego) (13). Matrylizyna, stromelizyna oraz żelatynaza A są produkowane podczas najbardziej aktywnych faz cyklu estrogenowego u myszy. Podwyższony poziom produkcji tych metaloproteinaz, łącznie z kolagenazą 2 i 3, obserwowany jest podczas poporodowej inwolucji macicy u myszy (14). MMP-9 odgrywa istotną rolę w licznych procesach rozwojowych. Badania wykazały, że u myszy pozbawionych genu *MMP9* dochodzi do wadliwego formowania się kości na podłożu chrzęstnym. Dochodzi tu do zahamowania apoptozy chondrocytów oraz nieprawidłowego tworzenia się naczyń krwionośnych (15). Również celowana inaktywacja genu *MT1-MMP* (MMP-14) u myszy prowadzi do powstania nieprawidłowości w obrębie szkieletu, tkanki łącznej oraz

unaczyniania, prowadzących do przedwczesnej śmierci organizmu (16). Z kolei MMP-2 oraz MMP-3 biorą udział w regulacji szlaku morfogenezy gruczołu sutkowego w okresie dojrzewania płciowego (17). MMP-2 i MMP-9, pobudzając różnicowanie adipocytów, przyczyniają się również do rozrostu i odkładania się tkanki tłuszczowej (adipogeneza). Jednak pojawiają się doniesienia, że inne MMPs wpływają hamująco na ten proces. Zwiększoną adipogenezę podczas inwolucji gruczołu sutkowego obserwuje się u myszy pozbawionych genu *MMP3* (17).

Metaloproteinazy zaangażowane są również w takich procesach jak gojenie ran oraz przebudowa tkanek, którym towarzyszy migracja keratynocytów do brzegów rany w celu wytworzenia nabłonka w obrębie uszkodzonej powierzchni. Badania przeprowadzone na kulturach komórkowych wykazały, że do migracji keratynocytów niezbędna jest aktywność proteolityczna MMP-1 (18).

Wiele spośród metaloproteinaz ECM jest produkowanych przez komórki śródbłonka. MMPs odgrywają rolę w formowaniu się nowych naczyń krwionośnych, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (19). U myszy pozbawionych genu *MMP2* dochodzi do zmniejszenia unaczynienia w porównaniu z dzikim typem myszy. Natomiast u myszy pozbawionych równocześnie genu *MMP2* i *MMP9* obserwuje się silnie osłabioną neowaskularyzację naczyń. Wskazuje to na efekt synergiczny obu tych proteaz w procesie unaczyniania (20).

Aktywność katalityczna MMP-2, MMP-9, MMP-13 oraz MT1-MMP (MMP-14) może być hamowana przez endogenne inhibitory angiogenezy – endostatynę. Metaloproteiny, pełniąc funkcję okołokomórkowych fibrolizyn podczas neowaskularyzacji, mogą również regulować proces angiogenezy (19). Wiele metaloproteinaz wykazuje również podwójne, przeciwstawne funkcje w zależności od sytuacji: aktywuje czynniki proangiogenne lub aktywuje inhibitory angiogenezy (19).

TKANKOWE INHIBITORY MMPS (TIMPS)

Aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej jest regulowana poprzez interakcje z ich naturalnymi inhibitorami: TIMP-1, -2, -3, oraz -4. W warunkach *in vitro* inhibitory te wykazują zdolność hamowania aktywności wszystkich metaloproteinaz, z wyjątkiem MMPs błonowych: MT1-MMP (MMP-14) oraz MT3-MMP (MMP-16). Jednak, w przypadku różnych TIMPs stwierdzono nieco odmienne preferencje co do interakcji z poszczególnymi MMPs. Przykładowo, TIMP-1 preferencyjnie tworzy kompleks z pro-MMP-9, podczas gdy TIMP-4 oraz TIMP-2 (za pośrednictwem MT1-MMP) z pro-MMP-2 (21).

Z wyjątkiem TIMP-3, który związany jest z ECM (7), pozostałe TIMPs występują w formie rozpuszczalnej w większości tkanek oraz płynów fizjologicznych (22, 23). Na podwyższenie ekspresji TIMP-1 oraz TIMP-3 wpływają różne czynniki wzrostu, cytokiny, retinoidy, glikokortykosteroidy. Natomiast ekspresja TIMP-2 zachodzi głównie w sposób konstytutywny (24, 25).

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz pełnią ważną funkcję w wielu procesach biologicznych takich jak: rozwój płodu, angiogeneza, artretyzm, nowotworzenie. Ponadto wykazano, że TIMPs biorą udział w regulacji migracji komórek, hamowaniu angiogenezy oraz indukowaniu lub przeciwdziałaniu apoptozie (26). Utrzymywanie się odpowiedniej równowagi pomiędzy różnymi TIMPs może stanowić kluczowy czynnik decydujący o potencjale proteolitycznym komórek. Zachwianie równowagi pomiędzy aktywnością TIMPs i MMPs powiązane jest z nadmierną degradacją składników macierzy pozakomórkowej w procesie inwazji guza. TIMP-1 (EPA, inhibitor kolagenazy) i TIMP-2 mogą również pobudzać wzrost różnych typów komórek w sposób niezależny od MMPs (27).

MMPS I TIMPS W PROCESIE NOWOTWOROWYM

W prawie wszystkich typach nowotworów ludzkich obserwuje się podwyższoną ekspresję oraz aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. Zjawisko to związane jest z zaawansowanym stadium choroby, podwyższoną zdolnością do inwazji i przerzutowania oraz z krótszym czasem przeżycia (10).

Liczne badania potwierdziły negatywny wpływ zmiany profilu ekspresji MMPs na rokowanie. Jednak, w niektórych przypadkach, podwyższona ekspresja specyficznych metaloproteinaz związana jest z korzystnym rokowaniem, jak np. w raku jelita grubego podwyższona ekspresja MMP-12 w komórkach nowotworowych związana jest z dłuższym czasem przeżycia, a ekspresja MMP-9 w makrofagach infiltrujących guz związana jest z mniejszą zdolnością do przerzutowania (28-30).

Badania kliniczne wykazały również powiązanie pomiędzy wysokim poziomem TIMP-1 i -2 a niekorzystnym rokowaniem dla pacjenta. Przyczyną wzrostu stężenia TIMPs jest prawdopodobnie podwyższona ekspresja MMPs oraz próba utrzymania równowagi pomiędzy ekspresją MMPs i TIMPs w procesie nowotworowym (10).

TIMPs mogą również sprzyjać progresji nowotworu poprzez udział w hamowaniu apoptozy komórek nowotworowych (TIMP-1 i -2), pobudzanie wzrostu komórek nowotworowych (TIMP-2 i -3), udział w zapoczątkowaniu angiogenezy guza (TIMP-1 powodujący stymulację wydzielania VEGF) (31). TIMPs oprócz zdolności hamowania aktywności MMPs wykazują wiele właściwości biologicznych niezależnych od tych enzymów (np. wpływ na podwyższenie poziomu antyapoptotycznego białka BCL-XL (32)) oraz działanie podobne do tego, jakie wykazują czynniki wzrostu (33). Doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że wbrew swojej nazwie TIMPs są też aktywatorami MMPs (np. TIMP-2 jest ważnym aktywatorem MMP-2) (34).

UDZIAŁ MMPS W PROGRESJI CZERNIAKA

Komórki czerniaka wykazują zdolność do produkcji wielu metaloproteinaz ECM, w tym: MMP-1, -2, -9, -13, -14, -21 oraz ich inhibitorów: TIMP-1, -2, i -3 (1). Obecnie uważa się, że w rozwoju czerniaka największe znaczenie odgrywają metaloproteiny: MMP-2 oraz MMP-9. Wykazano, że ekspresja oraz aktywacja tych proteaz jest związana z inwazyjnym i przerzutującym fenotypem czerniaka (1). Metaloproteiny te są konstytutywnie ekspresjonowane w złośliwych postaciach czerniaka, a poziom ich ekspresji jest silnie związany z atypią melanocytów i odróżnicowaniem się komórek w obrębie znamion barwnikowych (35). Wykazano, że w ludzkich i mysich liniach komórkowych czerniaka podwyższona ekspresja MMP-2, MMP-9, a także MMP-14 (MT1-MMP) związana jest z inwazyjną postacią nowotworu (36). Wzrost MMP-2 w znacznym stopniu powiązany jest z przerzutowaniem drogą krwionośną. W klasyfikacji Clarka i Breslowa wskazuje się na związek pomiędzy wysokim poziomem ekspresji MMP-2, a niskim współczynnikiem przeżycia i jest on szczególnie charakterystyczny dla pacjentów płci męskiej (1). Badania prowadzone przez Zuckera i Cao (37) wykazały, że MMP-2 nie jest wykrywalna w ludzkim czerniaku *in situ*, ale wysoki poziom aktywnej formy tego enzymu obecny jest w obszarze macierzy guza pierwotnego w zaawansowanych postaciach czerniaka oraz w samych przerzutach. Wyniki te potwierdzają badania Vaisanen i wsp. (38), wskazujące na to, że wzmożona ekspresja MMP-2 jest cechą charakterystyczną dla inwazyjnych postaci czerniaka i stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy. Podwyższony poziom ekspresji mRNA MMP-2 oraz białka został również zaobserwowany w przypadku najbardziej agresywnych linii komórkowych czerniaka (MV3, BLM) oraz w wywodzących się z nich ksenograftach (39). Mechanizm aktywacji pro-MMP-2 nie jest w pełni poznany. Aktywna forma MMP-2 w sposób bezpośredni reguluje adhezję komórek czerniaka oraz ich rozprzestrzenianie się do ECM, ułatwiając w ten sposób proces migracji oraz inwazji (39).

Wykazano, że podwyższona ekspresja MMP-14 powoduje aktywację MMP-2 na powierzchni komórki czerniaka. Aktywność MMP-2 jest również regulowana obecnością TIMP-2. Z jednej strony inhibitor ten może hamować MMP-2 i w ten sposób wpływać na ograniczenie wzrostu guza oraz inwazję. Z drugiej zaś strony TIMP-2 może być zaangażowany w sposób bezpośredni w aktywację MMP-2 poprzez formowanie kompleksu z MMP-14, stanowiącego receptor dla MMP-2 na powierzchni komórki. Tak więc skoordynowana ekspresja MMP-2, MMP-14 oraz TIMP-2 prowadzi do aktywacji MMP-2, a wzrost stężenia wymienionych metaloproteinaz oraz inhibitora charakterystyczny jest także dla innych ludzkich nowotworów (1, 39).

Hipoteza dotycząca zależności aktywacji MMP-2 od nadekspresji MMP-14 została również potwierdzona w badaniach przeprowadzonych przez Kurschata i wsp. (40). Wykazali oni, że w nieprawidłowych melanocytach ludzkich podwyższenie ekspresji zarówno MMP-2, jak i MMP-14 następowało wraz z progresją nowotworu, a analiza zymograficzna *in situ* potwierdziła obecność aktywnej formy MMP-2 na granicy komórek guza i otaczającej je macierzy. Ponadto wykazano, że komórki guza, które wytwarzają jednocześnie MMP-2 i MMP-14 są często umiejscowione na granicy pomiędzy zrębem a czołem przemieszczających się komórek inwazyjnych guza (40). Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu dla MMP-2 potwierdziły, że synteza MMP-2 jest konieczna by mogło dojść do powstania przerzutu (1). Iida i wsp. (41) wykazali, że MMP-14 ułatwia inwazję komórek czerniaka poprzez matrygel, podwyższa ich zdolność do migracji poprzez lamininę 1, wpływa korzystnie na wzrost guza w kulturach komórkowych *in vitro* oraz sprzyja formowaniu kolonii komórek czerniaka w żelu agarozowym. Co więcej, wpływ MMP-14 na podwyższenie zdolności inwazyjnych czerniaka oraz na wzrost guza nie jest zależny od działania inhibitorów MMPs (41).

Udział MMP-9 w progresji czerniaka nadal pozostaje niewyjaśniony – (uzyskane dotychczas dane są sprzeczne). Doświadczenia przeprowadzone na liniach czerniaka wyprowadzonych z zaawansowanych postaci nowotworu wykazały ekspresję MMP-9. Natomiast nie zaobserwowano takiego zjawiska w przypadku linii komórkowych uzyskanych z wczesnych postaci czerniaka (6). Badania prowadzone przez van den Oorda i wsp. (42), dowodzą z kolei, że u ludzi MMP-9 ulega ekspresji najprawdopodobniej wyłącznie w horyzontalnej fazie wzrostu guza pierwotnego nie przekraczającego grubości 1,6 mm. W tych pracach nie zaobserwowano ekspresji metaloproteinazy-9 w przerzutach czerniaka (42). Jednak Nikkola i wsp. (43) twierdzą, że wysoki poziom MMP-9 w surowicy jest charakterystyczny dla pacjentów z rozległymi przerzutami i o ogólnie krótszym czasie przeżycia.

W modelach doświadczalnych, w których implantowano tkankę nowotworową gryzoniom, MMP-9 identyfikowana była w obrębie wytworzonego guza tylko wówczas, gdy jego komórki wywodziły się z zaawansowanych zmian czerniakowych (1, 36). Co więcej, w przypadku organizmów konstytutywnie ekspresyjujących MMP-9, obserwowano zwiększenie kolonizacji płuc i tworzenie przerzutów, a w sytuacji gdy myszy nie posiadały genu

dla MMP-9 praktycznie nie dochodziło do tworzenia ognisk wtórnych nowotworu. Obserwacje te sugerują, że MMP-9 (produkowana zarówno przez komórki neoplastyczne, jak i przez komórki zrębu) odgrywa ważną rolę w powstawaniu przerzutów. Ponadto wskazuje się, że ekspresja MMP-9 jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych ulegających spontanicznym przerzutom do węzłów chłonnych i płuc. Tak więc wydaje się, że proces selekcji komórek dających przerzuty *in vivo* faworyzuje te subklony komórek, które ekspresyjują MMP-9 (106, 108).

Ważną rolę w rozwoju czerniaka przypisuje się również MMP-1 i MMP-3. Durko i wsp. (35) wykazali, że degradacja kolagenu typu I i IV oraz inwazja komórek czerniaka poprzez matrygel zależne są od ekspresji MMP-1. Nikkola i wsp. (43) wykazali korelację pomiędzy wysokim poziomem MMP-1 i MMP-3 w komórkach guza a krótszym czasem przeżycia: w przypadku identyfikacji podwyższonego poziomu ekspresji MMP-1 i MMP-3 w komórkach guza czas przeżycia pacjentów był znacząco krótszy w porównaniu do chorych, u których w komórkach guza nie identyfikowano zmian ekspresji ww. metaloproteinaz. Podobną zależność zaobserwowano również w przypadku wysokiego poziomu ekspresji MMP-13; dla pacjentów, u których w komórkach ogniska przerzutowego guza identyfikowano podwyższony poziom MMP-13, czas przeżycia był krótszy. Ponadto Nikkola i wsp. wykazali, że jednoczesne podwyższenie poziomu ekspresji MMP-1, MMP-3 oraz MMP-13 powiązane jest z obecnością melaniny w komórkach guza.

W procesie rozwoju czerniaka prawdopodobnie znacznie odgrywa również metaloproteinaza 21 (MMP-21). Kuivanen i wsp. (2) wykazali obecność MMP-21 zarówno w wycinkach tkanek zawierających komórki czerniaka, jak i w komórkach czerniaka *in vitro*. Badania wykazały, że ekspresja tej metaloproteinazy zachodzi częściej w komórkach nowotworowych pochodzących z nieprzerzutujących postaci czerniaka, co może sugerować, że zwiększona produkcja MMP-21 zachodzi we wczesnych etapach progresji czerniaka. Wydaje się więc, że metaloproteinaza 21 mogłaby być rozpatrywana jako potencjalny marker transformacji nowotworowej melanocytów (2).

Z uwagi na właściwości TIMPs równowaga pomiędzy poziomem aktywnych MMPs oraz ich inhibitorami może być krytycznym punktem dla progresji nowotworowej. Wykazano np. że nadekspresja TIMP-1, TIMP-2 i TIMP-3 może być przyczyną zahamowania proteolizy macierzy pozakomórkowej i w konsekwencji inwazji czerniaka. Z drugiej strony badania *in situ* wykazały, że indukcja TIMP-1 oraz TIMP-3 następuje w późnym etapie progresji guzów melanocytarnych, co jest wynikiem złożonego oddziaływania systemu MMPs/TIMPs. Podwyższona ekspresja TIMPs może hamować proces przerzutowania, ale jednocześnie może wskazywać na złe rokowania, ponieważ TIMPs mogą działać stymulująco na wzrost komórek ludzkiego czerniaka (1). Z drugiej zaś strony TIMPs wykazują zdolność do hamowania unaczynienia guza. Sugeruje się, że działanie antyangiogenne TIMP-2 może polegać na mechanizmie zależnym od MMPs, który moduluje interakcje typu gospodarz-guz (45). Wykazano,

że w antyangiogennym działaniu TIMP-2 częściowo pośredniczy proces indukcji kinazy MKP-1, która hamuje kinazę p38MAP (44).

Jak dotychczas nie potwierdzono powiązania pomiędzy ekspresją TIMP-1 lub -2 z aktywacją MMP-2 i MMP-9 w modelach *in vivo* (36). Morrisom i wsp. (45) zademonstrowali istnienie niezależnej od TIMP-2 komórkowej drogi aktywacji MMP-2, w którą zaangażowana jest metaloproteinaza błonowa: MMP-15 (MT2-MMP). Wskazuje się tu jednak na konieczność przeprowadzenia dalszych badań, których celem byłoby dokładne określenie roli TIMPs i MT-MMPs w aktywacji MMP-2 (36).

Badania przeprowadzone przez Wandela i wsp. (46) potwierdzają hipotezę, że w indukcję potencjału proteolitycznego komórek guza zaangażowane są również komórki zrębu. Ekspresja MMPs może zatem zachodzić nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w otaczających je fibroblastach, co wskazuje na udział tych komórek w procesie progresji czerniaka (1). Wandel i wsp. (46) wykazali, że w fibroblastach zlokalizowanych w sąsiedztwie zmian czerniakowych *in vivo* oraz w fibroblastach stymulowanych pożywką pochodzącą z hodowli komórek czerniaka *in vitro* (zawierającą rozpuszczalne czynniki wydzielane przez komórki czerniaka: cytokiny, czynniki wzrostu) dochodzi do zwiększenia ekspresji mRNA MMP-1 oraz białka. Ponadto, zaobserwowano powiązanie tego zjawiska z inwazyjnością guza (46).

WNIOSKI

W świetle przedstawionych danych wydaje się, że metaloproteinazy ECM pełnią ważną rolę w rozwoju procesu nowotworowego, w tym również czerniaków. Zaburzenie profilu ekspresji MMPs ma wpływ nie tylko na wzrost *in situ* samego guza, lecz także na umiejscowienie i sposób indukcji procesu przerzutowania. Sugeruje to, że różne MMPs mogą odgrywać różną rolę na poszczególnych etapach powstawania przerzutów czerniaka (36). Zwraca się tu szczególną uwagę na MMP-1, -2, -9, -14, -21 oraz TIMP-1, -2.

Wiedza na temat udziału MMPs oraz ich inhibitorów (TIMPs) w rozwoju czerniaka może przyczynić się, w przyszłości, do opracowania nowych biomarkerów czerniaka użytecznych w praktyce klinicznej. □

Piśmiennictwo

1. Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC: Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005; 87: 307-314. 2. Kuivanen T, Ahokas K, Virolainen S et al.: MMP-21 is upregulated at early stages of melanoma progression but disappears with more aggressive phenotype. *Virchows Arch* 2005; 447: 954-960. 3. Clark WH Jr, From L, Bernardino EH: Histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-727. 4. Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Review article. *Pathology* 1999; 189: 300-308. 5. Dziankowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Żebrowska A: Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry. *Alerg Astma Immun* 2004; 9: 71-79. 6. Widel MS, Widel M: Mechanizmy przerzutowania i molekularne markery progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego. *Post Hig Med Dośw* 2006; 60: 453-470. 7. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S: The role of matrix Metallopro-

teinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006; 85: 22-32. 8. Bogaczewicz J, Jasielski P, Mosiewicz A et al.: Rola metaloproteaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteaz w inwazji nowotworów pochodzenia neuroepitelialnego. *Neurol Neurochir Pol* 2006; 40: 404-412. 9. Żebrowska A, Bogdańska M, Waszczykowska E: Metaloproteinazy i adamaliny w patomechanizmie pemfigoidu. *Post Dermatol Alergol* 2005; 22: 283-287. 10. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev* 2000; 2: 161-174. 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. Knorr E, Schmidtberg H, Vilcinskas A, Altincicek B: MMPs Regulate both development and immunity in the tribolium model insect. *PLoS One* 2009; 4: 4751e. 13. Curry TE Jr, Osteen KG: The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrinology* 2003; 24: 428-465. 14. Balbin M, Fueyo A, Knauper V et al.: Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem* 1998; 273: 23959-23968. 15. Vu TH, Shipley J M, Dergers G et al.: MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93: 411-422. 16. Zhou Z, Apte SS, Soininen R et al.: Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4052-4057. 17. Wiseman BS, Sternichy MD, Lund LR et al.: Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* 2003; 162: 1123-1133. 18. Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z: Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol* 2001; 152: 693-703. 19. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD et al.: The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 1997; 137: 1445-1457. 20. Folgueras AL, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C: Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 411-424. 21. Giarnieri E, Alderisio M, Mancini R et al.: Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) expression in adenocarcinoma pleural effusions. *Oncol Rep* 2008; 19: 483-487. 22. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573. 23. Gomez D, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122. 24. Leco K, Khokha R, Pavloff N et al.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 9352-9360. 25. Kerkela E, Saarialho-Kere U: Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003; 12: 109-125. 26. Zafarullah M, Su S, Martel-Pelletier J et al.: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 1996; 60: 211-217. 27. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-283. 28. Henriot P, Blavier L, DeClerck YA: Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 1999; 107: 111-119. 29. Yang W, Arie S, Gorrin-Rivas MJ et al.: Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer* 2001; 91: 1277-1283. 30. Takeha, S, Fujiyama Y, Bamba T et al.: Stromal expression of MMP-9 and urokinase receptor is inversely associated with liver metastasis and with infiltrating growth in human colorectal cancer: a novel approach from immune/inflammatory aspect. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 72-81. 31. Jiang, Y, Wang M, Celiker MY et al.: Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery.

- Cancer Res 2001; 61: 2365-2370. **32.** Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A: Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). J Cell Sci 1994; 107: 2373-2379. **33.** Yoshiji H, Harris SR, Raso E et al.: Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. Int J Cancer 1998; 75: 81-87. **34.** Wang Z, Juttermann, R, Soloway PD: TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. J Biol Chem 2000; 275: 26411-26415. **35.** Durko M, Navab R, Shibata HR, Brodt P: Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1. Biochim Biophys Acta 1997; 1356: 271-280. **36.** Hofmann UB, Eggert AAO, Blass K et al.: Expression of matrix metalloproteinase in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. Cancer Res 2003; 63: 8221-8225. **37.** Zucker S, Cao J: Measurement of matrix metalloproteinases in serum of patients with melanoma: snarled in technical pitfalls. Commentary on Nikkola et al., p. 5158. Clin Cancer Res 2005; 11: 5069-5070. **38.** Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T: Matrix metalloproteinase-2 (72kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumor progression and may have prognostic value. J Pathol 1996; 180: 283-289. **39.** Hofmann UB, Westphal JR, Wass ET et al.: Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. Br J Cancer 1999; 81: 774-782. **40.** Kurshat P, Wickenhauser C, Groth W et al.: Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by *in situ* zymography. J Pathol 2002; 197: 179-187. **41.** Iida J, Wilhemson KL, Price MA et al.: Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. J Invest Dermatol 2004; 122: 167-176. **42.** van den Oord JJ, Paemen L, Opendakker G, De Wolf-Peeters C: Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. Short Communication. Am J Pathol 1997; 151: 665-670. **43.** Nikkola J, Vihnen P, Vlaykova T et al.: High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. Int J Cancer 2002; 97: 432-438. **44.** Seo DW, Li H, Guedez L et al.: TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. Cell 2003; 114: 171-180. **45.** Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF et al.: Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. J Biol Chem 2001; 276: 47402-47410. **46.** Wandel E, Raschke A, Hildebrandt G et al.: Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells *in vitro*. Arch Dermatol Res 2002; 293: 601-608. **47.** Visse R, Nagase H: Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function and biochemistry. Circ Res 2003; 92: 827-839. **48.** Łapka A, Goździalska A, Jaśkiewicz J: Rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w nowotworach piersi, ze szczególnym uwzględnieniem roli żelatynazy A oraz żelatynazy B. Post Biol Komórki 2006; 33: 683-695.

nadesłano: 21.05.2014

zaakceptowano do druku: 26.06.2014

Adres do korespondencji:
*Aleksandra Zielińska
Zakład Biologii Komórki
Śląski Uniwersytet Medyczny
ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec
tel.: +48 (32) 364-12-12
e-mail: azielinska@sum.edu.pl