

LUCYNA GRĘBECKA

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckeigo PAN
Zakład Biochemii Komórki
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

MIGRACJA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W ORGANIZMIE

Zdolność do samodzielnej migracji jest jedną z cech stanowiących o inwazyjnym fenotypie komórek wielu nowotworów złośliwych (MAREEL i współaut. 1993). Komórki takie, wywędrowując z litego guza pierwotnego poruszają się ruchem ameboidalnym (ENTERLINE i COMAN 1950). Ruch ameboidalny polega na tworzeniu się i zanikaniu pseudopodiów —przejściowych struktur lokomotorycznych. Komórki w trakcie migracji stale nawiązują i zrywają kontakty z podłożem (RAZ i współaut. 1986). Stosunek między siłą adhezji do podłoża a siłami generującymi dynamikę nibynózek decyduje o tym, czy i z jaką prędkością porusza się komórka (DIMILLA i współaut. 1993). O kierunku migracji decyduje morfologiczna polaryzacja komórki. To, że komórki nowotworowe nie wytwarzają stałych struktur lokomotorycznych, wydaje się zrozumiałe. Komórki te bowiem pochodzą

Słownik skrótów: α_2 -antyplazmina — inhibitor plazminy; CD44 — błonowy proteoglikan należący do hialadheryn (receptorów wiążących się z HA); ChIMP — inhibitor metaloproteaz (TIMP-3) produkowany przez fibroblasty zarodka kurzego; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa albo substancja lub istota międzykomórkowa; EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy; FGFb — zasadowy, fibroblastowy czynnik wzrostowy; FN — fibronektyna; GAG — glikozaminoglikany; GP — glikoproteiny; GPI — glikozylofosfatydyloinozytol; HA — kwas hialuronowy (wolny albo sole); LN — laminina; MMP — metaloproteazy; MMP1 — kolagenaza interstycjalna; MMP2 — żelatynaza A (kolagenaza IV, 72 kD); MMP3 — stromelizyna 1 (ST1); MMP5 — kolagenaza neutrofilowa (czasem oznaczana MMP8); MMP7 — matrylizyna (PUMP1); MMP9 — żelatynaza B (kolagenaza IV, 92 kD); MMP10 — stromelizyna 2 (ST2); MT MMP — metaloproteaza macierzy typu błonowego; PA1-1, PA1-2 — szybkie inhibitory metaloproteaz; PDGF — czynnik wzrostowy z płytek krwi; PG — proteoglikany; PKC — białkowa kinaza C; pl — plazmina; plg — plazminogen; PUMP1 — matrylizyna (MMP7); RHAMM — receptor HA zawartego w ECM ważny dla ruchliwości komórek; ST3 — stromelizyna 3; TGF α — transformujący czynnik wzrostowy; TIMP1 — tkankowy inhibitor metaloproteaz 1; TIMP2 — tkankowy inhibitor metaloproteaz 2; TIMP3 — ChIMP; TN — tenascyna; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; TSP — trombospondyna; uPA — urokinaza, aktywator plazminogenu; uPAR — receptor urokinazy.

z różnych tkanek, w których ich funkcje nie wymagają zdolności do ruchu. Ruchem ameboidalnym poruszają się jednak również takie komórki prawidłowe, jak białe ciała krwi, których funkcje w organizmie wiążą się bezpośrednio ze zdolnością do samodzielnej migracji. Fakt, że i te komórki nie wykształciły stałych struktur lokomotorycznych pozwala przypuszczać, że ruch ameboidalny jest nie tylko formą ruchu dostępną, przejściowo lub na stałe, nieomal dla wszystkich komórek tkankowych (STOKER i GHERARDI 1991). Prawdopodobnie jest on również formą ruchu najlepiej dostosowaną do warunków środowiska, w którym komórki migrują. W obu przypadkach — komórek prawidłowych i nowotworowych — mamy do czynienia z takimi samymi, a często nawet tymi samymi (PAWELEC i BOXBERGER 1994) szlakami wędrówek oraz z dwoma podstawowymi rodzajami środowisk: środowiskiem płynnym i macierzą zewnątrzkomórkową.¹

ŚRODOWISKO PŁYNNE

Środowisko płynne stanowią płyny ustrojowe; krew i limfa. Krażące w nich komórki prawidłowe i nowotworowe, kuliste, o nieregularnie pofałdowanej powierzchni (ryc. 1 D) są unoszone biernie z prędkością w przybliżeniu równą prędkości przepływu cieczy w naczyniu o danym przekroju. Duże komórki i agregaty komórek płyną środkiem naczynia, komórki mniejsze zbliżają się do jego ścian i mogą nawiązać z nimi kontakt. Umożliwia to komórce opuszczenie naczynia, czyli ekstrakwazację (ryc. 1 E) i dalszą wędrówkę już w innym środowisku. Podczas transportu w układzie krwionośnym i limfatycznym komórki ruchliwe zachowują się podobnie, jak nieruchliwe erytrocyty czy trombocyty. Zarówno więc obecność w komórce stałych lub przejściowych struktur lokomotorycznych, jak i wynikająca stąd zdolność komórki do samodzielnego ruchu nie wydają się mieć żadnego znaczenia w toku biernego transportu.

ECM (EXTRACELLULAR MATRIX)²

ECM wypełnia przestrzeń między komórkami. Jest ona rusztowaniem organizującym i podtrzymującym komórki, tkanki i narządy (LIN i BISSELL 1993), a zwłaszcza stanowi zrąb tkanek łącznych. ECM występuje zarówno w organizmach roślinnych, jak i w zwierzęcych, u kręgowców i bezkręgowców. Uważa się, że ECM powstała w trakcie łączenia się organizmów jednokomórkowych w kolonie, nie wyklucza się jednak i możliwości wyodrębnienia się ECM podczas podziału wielojądrowych syncytiów na domeny komórkowe i pozakomórkowe (HAR-EL i TANZER 1993).

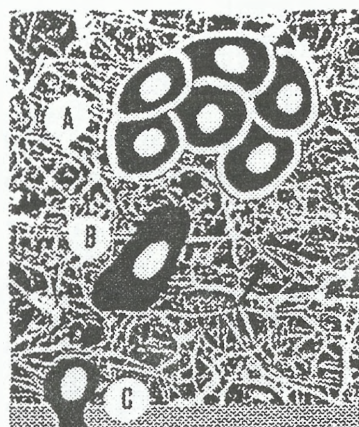
¹ Patrz ECM w słowniku skrótów.

² Macierz zewnątrzkomórkowa albo istota lub substancja międzykomórkowa (porównaj OSTROWSKI i KAWIAK 1990).

Szczególną formę ECM stanowi błona podstawna (basement membrane, BM), przede wszystkim jednak termin ECM jest wiązany z interstycjalną stromą (LIOTTA i współaut. 1991). W tym środowisku komórki przemieszczają się czynnie (ryc. 1 B, F). Ameboidalny ruch komórek migrujących przez ECM, dający w przypadku komórek nowotworowych lokalne inwazje i odległe przerzuty, zachodzi w wyniku ciągłych interakcji pomiędzy komórką a otaczającym ją środowiskiem, czyli składnikami ECM (BUCK i współaut. 1985, LIOTTA i współaut. 1986, BUCK i HORWITZ 1987, JULIANO 1987, HART i współaut. 1989, AKIYAMA i współaut. 1990, MONSKY i CHEN 1993, MONTGOMERY i współaut. 1993, STETLER-STEVENS i współaut. 1993 a, b). Dlatego środowisko to wymaga znacznie dokładniejszej charakterystyki niż krążące w naczyniach płyny ustrojowe.

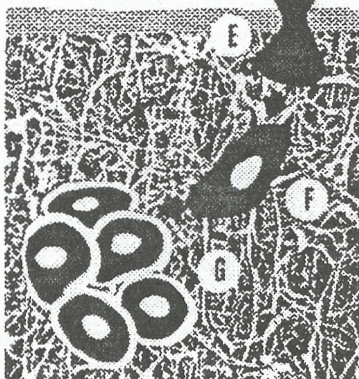
ZNACZENIE STRUKTURY ECM DLA MIGRACJI KOMÓRKOWEJ

W skład ECM wchodzi różne makro- i mikrocząsteczki w ilościach charakterystycznych dla danej tkanki i narządu (RAGHOW 1994). Część składników



ECM pochodzi z krwi i limfy, a część jest wytwarzana przez: a) komórki parenchymy, b) komórki stanowiące stały element samej ECM, jak fibroblasty, c) komórki przebywające w ECM przejściowo — makrofagi, granulocyty, komórki nowotworowe i inne. Wymienione komórki nie tylko syntetyzują i wydzielają składniki ECM. Mogą one również modyfikować istniejące już elementy ECM (SHIRASUNA i współaut. 1993), powodując, na przykład, ich rozpad czy polimeryzację.

Komórki nowotworowe i prawidłowe mogą oddziaływać na elementy ECM bezpośrednio, mogą jednak także pobudzać do takiego działania inne komórki. Przykładem tego może być między innymi wzmocnienie pod wpływem komórek raka piersi produkcji fibronektyny i kolagenów I, III i IV przez fibroblasty (NOEL i współaut. 1992), tenascyny pod wpływem neoplastycznych komórek nabłonkowych (ERICKSON i BOURDON 1989) czy stymulacja fibroblastów do syntezy kwasu hialuronowego w wyniku kontaktu z komórkami czerniaka lub raka płuc (KNUDSON i współaut. 1984). Warto tu



Ryc. 1. Etapy tworzenia przerzutu: A — kolonia pierwotna, B — utrata połączeń międzykomórkowych, odrywanie się komórek i ich migracja w ECM, C — przedostawanie się komórek do wnętrza naczyń, D — bierny transport komórek w naczyniach, E — wydostawanie się komórek z naczyń, F — migracja w ECM, G — utworzenie przerzutu. Tło stanowi zdjęcie ECM, w które wrysowano w tej samej skali komórki nowotworowe, zaznaczone na czarno z białymi jądrami.

wspomnieć również, że wydzielaniu przez komórki nowotworowe licznych enzymów modulujących ECM, o których będzie mowa dalej, towarzyszy równie często pobudzanie wydzielania takich enzymów przez inne komórki (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a, MATRISIAN 1992, MIGNATTI i RIFKIN 1993, BORCHERS i współaut. 1994). Komórki nowotworowe mogą to powodować wydzielając specyficzne dla danego enzymu czynniki stymulujące, jak w przypadku stromelizyny 3, kolagenazy interstycjalnej czy żelatynazy A (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a, BASSET i współaut. 1990, MULLER i współaut. 1993). Stymulacja może też jednak wynikać z wydzielania przez komórki prawidłowe i nowotworowe czynników wzrostowych, TGF α , PDGF, FGF, EGF, a także innych niespecyficznych czynników modulujących między innymi biosyntetyczną aktywność sąsiadujących komórek ECM (KOVACS 1991, WOESSNER 1991, MAUVIEL 1993).

Uważa się, że dla istnienia ECM jest konieczna dynamiczna równowaga pomiędzy syntezą i rozpadem jej składników (MATRISIAN 1992).

SKŁADNIKI ECM ISTOTNE DLA MIGRACJI KOMÓRKOWEJ

Ważne z punktu widzenia migracji komórek strukturalne elementy ECM to: a) glikoproteiny wpływające na adhezję komórek, b) kolageny i elastyna tworzące włókniste rusztowanie ECM, c) proteoglikany ułatwiające migrację komórkową przez tworzenie w ECM uwodnionych domen. Oczywiście zdarzają się wyjątki od tej ogólnej klasyfikacji, na przykład nie wszystkie kolageny tworzą struktury fibrylarne, mogą je zaś tworzyć niektóre glikoproteiny.

Glikoproteiny (GP)

Glikoproteiny są zbudowane z krótkich rozgałęzionych łańcuchów oligosacharydowych połączonych kowalencyjnie z rdzeniem białkowym. Do ważniejszych glikoprotein wpływających na adhezję komórek należą:

a) Fibronektyna (FN). Jest wielofunkcyjną glikoproteiną występującą w osoczu oraz w ECM, szczególnie w jej warstwie bezpośrednio otaczającej komórkę, pełniącą kluczową rolę w interakcjach między komórką i ECM. Fibronektyna ułatwia wiązanie komórek między innymi do kolagenów, żelatyn i fibryny, a także umożliwia rozplaszczanie komórek; stymuluje ruchliwość działając na komórki chemotaktycznie i haptotaktycznie. FN zawiera liczne funkcjonalne domeny, z sekwencją RGD (arginina, glicyna, asparagina) rozpoznawane przez integryny: $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha w \beta 3$, $\alpha v \beta 6$ oraz fibrynogen, witronektynę i czynnik von Willebrandta. Posiada również domeny wiążące heparynę, kolagen, fibrynę a także proteoglikany, CD44 i syndekan (VENSTROM i REICHARDT 1993). FN jest dimerem o ciężarze 250 kD. Podjednostki są połączone mostkiem siarkowym w zakończeniach karboksylowych.

b) Trombospondyna (TSP). Podobnie jak fibronektyna jest glikoproteiną wielofunkcyjną i składnikiem ECM. Posiada domeny wiążące się między innymi z integrynami powierzchni komórek nabłonkowych, mięśni gładkich i czerniaka. Wiąże się z fibrynogenem, FN, kolagenami, heparyną i lamininą. TSP może wiązać i aktywować plazminogen i jego tkankowy aktywator (VISCHER i współaut. 1988, SAGE i BORNSTEIN 1991, VENSTROM i REICHARDT 1993). TSP jest homotrimerem o ciężarze 450 kD. Występują w niej sekwencje homologiczne do EGF,

do których przylegają domeny antyadhezywne (SCOTT-BURDEN 1994). Ma też trzy domeny wiążące się z powierzchnią komórkową (YAMADA i KLEINMAN 1992).

c) Laminina (LN). Jest przede wszystkim stałym składnikiem błony podstawnej. Większość komórek ruchliwych, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych ma receptory lamininowe. Częsteczki lamininy mogą łączyć się ze sobą tworząc sieć. Normalna błona podstawna składa się z połączonych sieci lamininy i kolagenu IV (YURCHENCO i SCHITTNY 1990). Istnieją jednak również błony podstawne, w których kolagen IV nie występuje, a podstawę strukturalną stanowi tylko sieć lamininowa (YURCHENCO i współaut. 1992, MOSHER i współaut. 1992). TRYGGVASON (1993) uważa, że podczas morfogenezy LN tworzy rusztowanie błony podstawnej, które później zostaje uzupełnione siecią kolagenu IV i innymi stałymi składnikami BM. Laminina jest zbudowana z trzech łańcuchów peptydowych (850 kD), kodowanych przez osobne geny.

d) Tenascyna (TN). Tenascyna ma co najmniej dwie domeny adhezywne z sekwencją RGD i dwie domeny antyadhezywne przylegające do sekwencji homologicznej do EGF (PRIETO i współaut. 1992). Komórki wiążą się najsilniej, gdy kontaktują się tylko z domenami adhezywnymi całej cząsteczki lub z fragmentem, który zawiera tylko taką domenę. Natomiast, gdy komórka kontaktuje się tylko z antyadhezywnymi domenami tenascyny, pozostaje okrągła i nie przylega do podłoża (VENSTROM i REICHARDT 1993). Wielu autorów wskazuje na funkcjonalny antagonizm pomiędzy tenascyną i fibronektyną (m.in. CHIGUET-EHRISMANN 1990). W przeciwieństwie do FN, która wzmacnia adhezję i powoduje rozplaszczanie komórek, TN wywołuje ich zaokrąglenie i oderwanie od podłoża. Postuluje się więc, że rola TN w migracji komórek nowotworowych mogłaby polegać na ułatwianiu ich odrywania się od fibronektyny w zrębie guza (ERICKSON i BOURDON 1989, SAGE i BORNSTEIN 1991). ERICKSON (1993) proponuje przestrzeny mechanizm utrudniania adhezji przez TN; ta rozgałęziona sześcioramienna cząsteczka wiążąc się z podłożem zarówno odsuwałaby cząsteczki FN, jak też maskowała miejsca ich wiązania z powierzchnią komórki.

Kolageny i elastyna

Powszechnie przyjęta definicja określa kolageny jako strukturalne białka ECM zawierające jedną lub więcej domen o charakterystycznej budowie potrójnej helisy (LINSENMEYER 1981). Prawie wszystkie kolageny tworzą wielkocząsteczkowe agregaty, które częściowo są stabilizowane przez oddziaływania między domenami helikoidalnymi.

Dotychczas zidentyfikowano 19 typów kolagenów. Tworzą one różne układy przestrzenne: a) włókienka (fibryle) znajdujące przede wszystkim w tkance łącznej; tworzą je kolageny fibrylarne typów I, II, III, V, XI. b) warstwy znajdujące między innymi w błonie podstawnej, a także w kutikuli i w organicznym szkieletie zewnętrznym gąbek; tworzą je kolageny typów IV, VIII, X. c) kolageny z nieciągłą potrójną helisą łączące włókienka z innymi elementami ECM; są to kolageny typów IX, XII, XIV. d) kolagen VII, wiążący włókienka błony podstawnej nabłonka z włóknkami kolagenowymi przylegającej ECM, e) kolagen VI tworzący cienkie paciorkowate włókienka, które wiążą się z innymi włóknkami oraz z powierzchnią komórek (VAN DEN REST i GARRONE 1991). Funkcje i rozmiesz-

czenie w tkankach kolagenów XV–XIX (MAYNE i BREWTON 1993) nie zostały jeszcze szczegółowo opisane.

Struktury kolagenowe, zarówno fibrylarne, jak i niefibrylarne składają się z cząsteczek połączonych wiązaniami kowalencyjnymi. Zapewnia to mechaniczną stabilność tkanek (HAR-EL i TANZER 1993). W ECM występują przede wszystkim fibrylarne kolageny tworzące jej podstawę strukturalną. W utworzoną przez nie sieć mogą być wbudowywane inne elementy ECM w zależności od tego, jakimi właściwościami cechuje się dana tkanka.

W przypadku tkanek sprężystych budujących między innymi ściany dużych naczyń tętniczych, pęcherzyków płucnych czy niektórych wiązań istotnym składnikiem ECM jest elastyna. Elastyna jest glikoproteiną o ciężarze 72 kD. Rozpuszczalny prekursor elastyny, tropoelastyna, jest produkowana przez fibroblasty i komórki mięśni gładkich. Po przedostaniu się do przestrzeni okołokomórkowej tropoelastyna wraz z innymi cząsteczkami, jak na przykład fibryliną, tworzą elastyczne włókienka (FRANZBLAU i FARIS 1981, MCGOWAN 1992).

Zarówno kolageny jak glikoproteiny wiążą się z wieloanionowymi polisacharydami — proteoglikanami.

Proteoglikany (PG), glikozaminoglikany (GAG), sole kwasu hialuronowego (HA)

Proteoglikany są podklasą glikoprotein, białkami glikozyłowanymi. Są składnikami zarówno okołokomórkowej, jak i zewnątrzkomórkowej macierzy. Wiążą się one z prawie wszystkimi elementami ECM. Wiele z nich jest związanych również z błoną komórkową i występuje jako receptory, między innymi dla czynników wzrostowych (RUOSLAHTI 1989, RUOSLAHTI i YAMAGUCHI 1991) oraz innych cytokin i składników ECM. Niektóre proteoglikany mogą pełnić funkcję modulatorów czynników wzrostowych tworząc z nimi kompleksy i chroniąc je przed degradacją (RUOSLAHTI i YAMAGUCHI 1991), inne kontrolują aktywność proteaz. Proteoglikany są zbudowane z rdzenia białkowego, z dołączonym kowalencyjnie jednym lub wieloma łańcuchami glikozaminoglikanów — polisacharydów zawierających aminocukry.

Glikozaminoglikany są liniowymi polimerami, zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych jednostek, które składają się z heksozaminy naprzemiennie z kwasem uronowym lub cukrem obojętnym (słownictwo według GAMIAN 1992). Taka budowa powoduje liniowe uporządkowanie grup anionowych, a więc i ładunków ujemnych w cząsteczkach (HASCALL i HASCALL 1981). Glikozaminoglikany ECM to przede wszystkim: siarczyn heparanu, chondroityny, dermatanu i keratanu oraz sole kwasu hialuronowego (HA). Z wyjątkiem HA łańcuchy GAG nie występują w tkankach osobno, lecz są związane z rdzeniem białkowym przez oligosacharyd o strukturze odmiennej od jednostek powtarzających się w łańcuchu (RUOSLAHTI 1988). Własności i funkcje proteoglikanów zależą od proporcji ich białkowych i węglowodanowych składników (RUOSLAHTI i YAMAGUCHI 1991, HARDINGHAM i FOSANG 1992, WIGHT i współaut. 1992, HAR-EL i TANZER 1993).

Agrekan i inne proteoglikany o dużej zawartości GAG tworzą uwodnione domeny ECM. Wynika to z przyciągania jonów dodatnich przez ujemnie naładowane cząsteczki PG; takie przesunięcie równowagi osmotycznej powoduje napływ cząsteczek wody z sąsiadujących obszarów. Wokół powstałych w ten sposób domen uwodnionych tworzą się więc równocześnie domeny o wysokim stężeniu

znajdujących się w nich makrocząsteczek, co zwiększa możliwość ich wzajemnych oddziaływań (HARDINGHAM i FOSANG 1992).

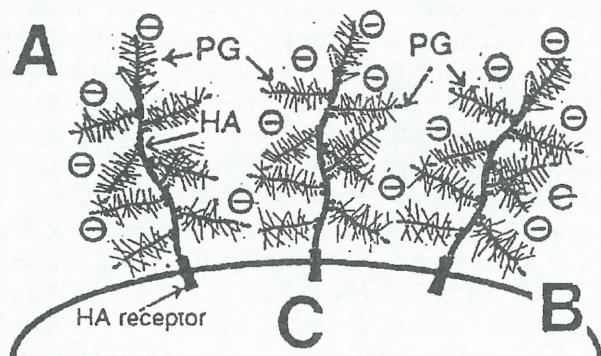
W przeciwieństwie do gęstych, włóknistych obszarów ECM, które stabilizują komórki, uwodnione luźne mikrośrodowiska tworzone przez proteoglikany ułatwiają migrację komórkom ruchliwym. Szczególnie ważną rolę pełnią tu sole kwasu hialuronowego (WIGHT i współaut. 1992, LAURENT i FRASER 1992). Wzrost stężenia soli HA wiąże się ze wzrostem ruchliwości komórek w danym miejscu, natomiast rozpad cząsteczek HA pod wpływem hialuronidazy stopuje lokomocję.

Interesującą hipotezę dotyczącą udziału proteoglikanów w powiększaniu przestrzeni zawartej pomiędzy komórkami i włóknistymi elementami ECM podaje TOOLE (1981). Przedstawia się ona następująco: uwodnione sole HA wywierają ciśnienie na przylegające komórki i strukturalne elementy ECM. Przeciwdziałają temu, zapobiegając pęcznieniu, takie czynniki ograniczające, jak: a) mechaniczne połączenia utrzymujące sąsiadujące struktury w stałej odległości; b) redukcja, bądź całkowite zniesienie przez kationy ujemnych ładunków GAG; c) interakcje między łańcuchami GAG powodujące kondensację i uporządkowanie materiału w obrębie każdej cząsteczki oraz ściśsze upakowanie cząsteczek sąsiadujących. Zakłócenia w działaniu czynników ograniczających umożliwiają rozluźnienie konstrukcji HA, a w konsekwencji jego pęcznienie i powiększanie się dystansu między rozdzielanymi przez HA strukturalnymi składnikami ECM. Powstająca w ten sposób przestrzeń ułatwia swobodną migrację komórek (TOOLE 1981).

Receptory komórkowe wiążące się z solami kwasu hialuronowego w zewnątrzkomórkowej macierzy mogą być również proteoglikanami. Wśród nich proteoglikan CD44, należący do rodziny hialadheryn, jest znajdowany na powierzchni komórek ruchliwych zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych (SHERMAN i współaut. 1994). Uważa się, że ekspresja CD44 w komórkach jest dodatnio skorelowana z ich zdolnością do tworzenia przerzutów (MERZAK i współaut. 1994, PONTA 1994). Domena cytoplazmatyczna CD44 może być połączona z aktywną cytoszkieletem komórkowego. W komórkach czerniaka stwierdzono zależność między istnieniem połączeń CD44 z cytoszkieletem a ruchliwością komórek. W momencie zaniku tych połączeń komórki tracą zdolność do lokomocji (THOMAS i współaut. 1992). Połączenia między CD44 na powierzchni komórki i HA w ECM są stosunkowo słabe (w porównaniu na przykład z połączeniami typu kontaktów ogniskowych, w których biorą udział integryny — ALBELDA i BUCK 1990). Dla lokomocji może to być jednak korzystne. W ruchu ameboidalnym ważna jest bowiem zarówno łatwość nawiązywania kontaktów, jak i ich zrywania. Kompleksy CD44/HA ulegać mogą internalizacji i następnie rozpadowi pod wpływem kwaśnych hydrolaz. Stopień degradacji HA, jak również jej ograniczenie tylko do określonych miejsc w ECM są ważne dla kontroli migracji komórkowej. Hipotezy dotyczące udziału proteoglikanów w adhezji komórek i ich migracji są stosunkowo dobrze udokumentowane (CAMP i współaut. 1991, LAURENT i FRASER 1992, THOMAS i współaut. 1992, UNDERHILL 1992, HERRLICH i współaut. 1993, KNUDSON i KNUDSON 1993).

Ostatnio wysuwa się także hipotezę, że proteoglikany otaczające powierzchnię komórki biorą udział w porządkowaniu kolagenów i glikoprotein ECM. Proteoglikanowy płaszcz komórkowy (coat) przytrzymuje nowo powstałe kolage-

ny i fibronektynę, a skupianie się ich we włókna może być ułatwiane przez giętkie i ruchliwe kompleksy powierzchniowe HA/agrekan (ryc. 2), wystające daleko poza powierzchnię komórki (LEE i współaut. 1993). Proteoglikany związane z powierzchnią komórki i daleko poza nią wysunięte mogą zarazem przeszkadzać w wiązaniu sąsiadujących ze sobą komórek przez E-kadheryny, a także w kontakcie komórek z podłożem (VLEMINCKS i współaut. 1994).



Ryc. 2. Kompleksy proteoglikanów na powierzchni komórki (według LEE i współaut. 1993, zmodyfikowany). A — środowisko, B — błona plazmatyczna, C — cytoplazma, HA — sole kwasu hialuronowego, PG — proteoglikany, Θ — ładunki ujemne.

PROTEOLIZA SKŁADNIKÓW ECM PODCZAS MIGRACJI KOMÓREK

Rusztowanie ECM jest zbudowane z włókien kolagenowych. Przestrzeń pomiędzy nimi jest wypełniona glikoproteinami tworzącymi przede wszystkim spoiwo (ANDERSON 1976). Pozostałą część ECM stanowią uwodnione proteoglikany umożliwiające dyfuzję cząsteczek przedostających się z krwi i limfy (cytokiny, hormony i inne) i ułatwiające ruch komórek. Warunkiem migracji komórki przez te trójwymiarowe struktury macierzy jest jej kontrolowana adhezja do elementów fibrylarnych, sterowanie ruchem w określonym kierunku oraz torowanie sobie drogi, za pomocą enzymów proteolitycznych.

WARUNKI MIGRACJI KOMÓREK PRZECZ ECM

Adhezja

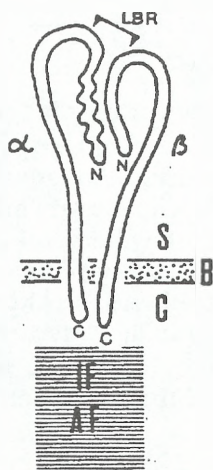
Warunkiem migracji i wzrostu komórek jest ich zdolność do adhezji. Brak adhezji uniemożliwia migrację, lecz zbyt silna adhezja ją ogranicza (DIMILLA i współaut. 1993, GIANCOTTI i MAINIERO 1994). Zarówno kolageny, jak glikoproteiny i proteoglikany mają punkty przyczepu dla migrujących komórek prawidłowych i neoplastycznych. Receptory komórkowe wiążące się z ligandami ECM to przede wszystkim integryny i proteoglikany powierzchniowe (ryc. 3, 4, tab. 1). Utworzone przez nie (i przez inne cząsteczki) połączenia między komórką i ECM mogą być rozkładane przez różne enzymy, w tym proteazy (tab. 2). Działają one w miejscach przylegania komórki do podłoża, kontrolując adhezję i reorganizując aktynowy cytoszkielet (POLLANEN i współaut. 1988). Hamowanie aktywności tych enzymów specyficznymi inhibitorami utrzymuje adhezję komórek nowotworowych, natomiast znosi ich inwazyjność (ruchliwość).

Tabela 1

Niektóre proteoglikany powierzchniowe i integryny wiążące komórki z poszczególnymi elementami ECM
(Dane według: DAVID 1993, LAHAV 1993, TURLEY i współaut. 1993, VENSTROM i REICHARDT 1993, SHERMAN i współaut. 1994)

Elementy ECM	Powierzchnia komórki	
	Proteoglikany	Integryny
Glikoproteiny		
FN	siarczan heparanu, CD44, syndekan	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$
LN	siarczan heparanu, CD44, dystroglikan	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$
TSP	siarczan heparanu, syndekan	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_x\beta_1$, $\alpha_v\beta_x$
TN	siarczan heparanu, syndekan	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_x\beta_1$
Kolageny	siarczan heparanu, CD44, syndekan	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_3\beta_1$
Proteoglikany	hialadhedryny	różne integryny
HA	CD44, RHAMM	

Istnieje silna korelacja między zmianami w cytoszkielecie aktywowym i indukcją ekspresji genów kodujących proteazy tak ważne w lokomocji komórek, jak kolagenazy i stromelizyny (WERB i współaut. 1989). Ekspresja genów kodujących enzymy istotne w regulacji adhezji komórkowej może być indukowana *via* cytoszkieleł przez samą adhezję komórki do poszczególnych elementów ECM, przez krążące w ECM cytokiny, jak również przez fragmenty zdegradowanych



Ryc. 3. Schemat budowy cząsteczki integryny (według ALBELDA i BUCK 1990, zmodyfikowany). α , β — podjednostki heterodimeru, N — zakończenie aminowe, C — zakończenie karboksylowe, LBR — region wiążący integrynę z ligandem, S — środowisko, B — błona plazmatyczna, C — cytoplazma, IF — filamenty pośrednie, AF — filamenty aktywne.

uprzednio składników ECM (WERB i współaut. 1989, JULIANO i HASKILL 1993, MAUVIEL 1993). Fragmenty te mogą też polaryzować komórkę i w rezultacie sterować jej ruchem.

Tabela 2

Enzymy degradujące ECM

(Dane według: WOESSNER 1991, MATRISIAN 1992, MAUVIEL 1993, MIGNATTI i RIFKIN 1993)

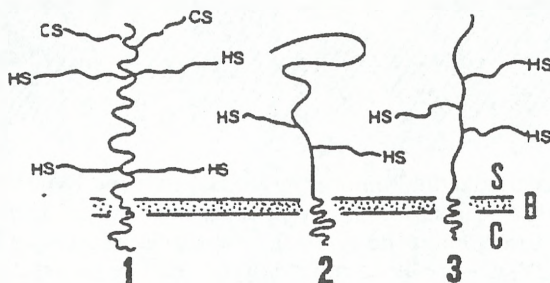
Enzym	Substrat							Inne funkcje: aktywuje
	Kolageny	Żela- tyny	Elas- tyna	FN	LN	Rdzeń PG	GAG	
uPA tPA plazmina		+		+	+	+		plazminogen, MMP2 plazminogen prokolagenazy elastazy, uPA
Katepsyny B L D	I-V, IX, XI + I, III	+ + +	+ +	+	+	+		uPA, prokolagenazy
Kolagenazy MMP1 MMP5 (8?) kolagenaza 3	I-III, V, VII, X I-III ?	+ + ?						
Żelatynazy MMP2 MMP9	IV, V, VII, X, XI IV, V, VII, X	+ +	+ +	+				
Stromelizyny MMP3 (+ST1) MMP10 (=ST2) ST3 MMP7	III-V, IX III-V, IX ? IV	+ + ? +		+	+	+		MMP1, MMP2 MMP1, MMP2 prokolagenazy
MT MMP								MMP2
Metaloelastaza		+	+	+		+		uPA
Glikozydazy							+	

Chemotaksja i haptotaksja

Migracja komórki nowotworowej czy prawidłowej w danym kierunku jest wynikiem interakcji cząsteczek atraktanta z jego specyficznym receptorem na powierzchni komórki, przekazania sygnału do wnętrza komórki, a następnie reorganizacji cytoszkieletu. Jeżeli cząsteczki atraktanta występują w roztworze, kierunkowy ruch w stronę ich rosnącego stężenia określa się jako chemotaksję. Gdy wbudowane są one w podłoże, analogiczne zjawisko nosi nazwę haptotaksji. W obu przypadkach komórka podąża w kierunku rosnącego gradientu atraktanta, przy czym w drugim przypadku jest to równoznaczne z migracją w kierunku zwiększającej się adhezji. Kończy się to zatrzymaniem komórki w tym miejscu, w którym siła adhezji przewyższy siłę motoryczną generowaną we wnętrzu komórki.

Można przyjąć, że komórka rozpoczynająca migrację w ECM początkowo kieruje się głównie gradientem rosnącej adhezji (haptotaksja), której źródło

stanowią adhezywne domeny cząsteczek ECM (FURCHT i współaut. 1984). Ponieważ lokomocji towarzyszy częściowa degradacja tych cząsteczek i przechodzenie ich fragmentów do płynu interstycjalnego, stopniowo w zachowaniu komórki zaczyna przeważać odpowiedź chemotaktyczna (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a). Chemotaksję komórek prawidłowych i nowotworowych mogą wywoływać różne cytokiny (RUSCIANO i BURGER 1992) oraz produkty proteolizy takich składników ECM jak: LN, FN, kolagen IV, witronektyna i TNS, podczas gdy cząsteczki te w formie nietkniętej stymulują migrację na drodze haptotaksji (TARABOLETTI i współaut. 1987, AZNAVOORIAN i współaut. 1990, KLOMINEK i współaut. 1993).



Ryc. 4. Schemat budowy trzech wybranych proteoglikanów powierzchniowych (kombinowany na podstawie RUOSLAHTI 1988, RUOSLAHTI 1989 oraz HARDINGHAM i FOSANG 1992). 1 — syndekan, 2 — CD44, 3 — błonowy proteoglikan zawierający heparanu siarczan, CS — chondroityny siarczan, HS — heparanu siarczan, S — środowisko, B — błona plazmatyczna, C — cytoplazma.

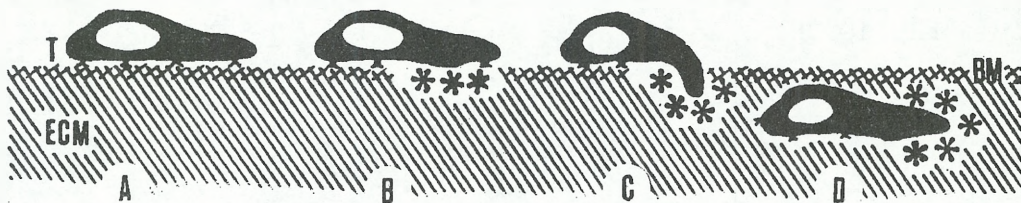
W prawidłowych komórkach ruchliwych, jakimi są leukocyty, w odbiorze bodźca pozytywnego (atraktanta) i przekazaniu sygnału do wnętrza komórki pośredniczy białko G. Wydaje się, że w przypadku komórek nowotworowych występują także inne drogi przekazywania sygnałów stymulujących ruchliwość. Dawałoby to komórce nowotworowej znaczną przewagę nad innymi komórkami poruszającymi się w ECM i odbierającymi z niej sygnały (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a).

Torowanie przejść przez ECM

ECM stanowi gęstą sieć splątanych elementów strukturalnych i przedostanie się przez nią jest szczególnie trudne dla komórek o niskim stopniu deformowalności, a do takich należą komórki nowotworowe. Proteoliza ECM może być zatem jednym z mechanizmów niezbędnych dla utorowania drogi migrującym w ECM komórkom.

Klasyycznym tego przykładem jest przedostawanie się komórek przez błonę podstawną, która jest jedną z form ECM, a zarazem jedną z ważniejszych barier na drodze migrujących komórek (LIOTTA i współaut. 1984, 1986). Jest to proces trójstopniowy polegający na: a) przyłączeniu się migrującej komórki do lamininy BM przez receptory lamininowe na powierzchni komórki; b) rozkładaniu kolagenu IV tworzącego podstawę strukturalną BM; c) przedostawaniu się komórki przez utworzoną w ten sposób lukę w błonie podstawnej (ryc. 5). Warto w związku z tym dodać, że inwazyjne komórki nowotworowe charakteryzuje

wielokrotny wzrost liczby receptorów lamininowych (BARSKY i współaut. 1984, MARTIN i TIMPL 1987). Uważa się też, że wiązanie z LN może stymulować w komórce produkcję żelatynazy A rozkładającej kolagen IV, drugi główny składnik błony podstawnej (KANEMOTO i współaut. 1990). Te komórki, które nie syntetyzują odpowiednich enzymów i nie degradują błony podstawnej, mają znacznie zmniejszone możliwości tworzenia metastaz. Komórki takie zatrzymane zostają bowiem przy błonie podstawnej, która staje się dla nich barierą nie do przebycia.



Ryc. 5. Schemat przechodzenia komórek przez BM (według LIOTTA 1984). A — komórka (T) nawiązuje kontakt z lamininą błony podstawnej (BM) za pośrednictwem powierzchniowych receptorów lamininowych, B — wydzielą żelatynazę A, która rozkłada cząsteczki kolagenu IV, C — przedostaje się przez przerwę powstałą w BM, D — rozpoczyna migrację w ECM.

Rolę pomocniczą mogą w takich przypadkach odgrywać leukocyty (ryc. 6). Według KRAMER i NICOLSON (1979) komórki nowotworowe mogą zatrzymywać się do 24 godzin pomiędzy komórkami śródbłonna a błoną podstawną. Jeżeli w pobliżu przez ścianę naczynia przedostaje się w tym czasie jakaś ruchliwa komórka prawidłowa, tworzy się przejście dla czekającej komórki nowotworowej. Podobnie, przechodzenie leukocytów przez modelowe błony podstawne zwiększa liczbę przedostających się przez nie komórek nowotworowych (LIOTTA 1984). Leukocyty, gdy towarzyszą komórkom nowotworowym, zwiększają o 50% swoją produkcję żelatynazy i heparanazy, co właśnie ułatwia komórkom nowotworowym przedostawanie się przez BM (WELCH i współaut. 1989).

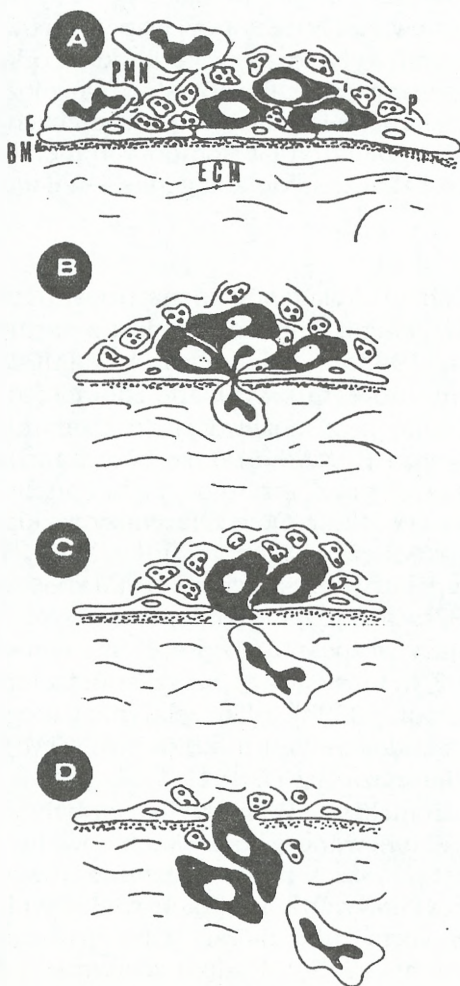
Trójstopniowy model Liott'y przechodzenia komórek przez błonę podstawną stosuje się również do migracji komórek przez trójwymiarowe struktury ECM. Są one gęsto utkane i często prawie równie trudne do sforsowania, jak błona podstawna. Prawidłowe komórki ruchliwe, jak makrofagi czy granulocyty, degradują więc ECM, by dotrzeć do ognisk zapalnych. Powodowane przez nie uszkodzenia są jednak minimalne, bo aktywność proteolityczna prowadząca do tworzenia nieciągłości w ECM (oraz regulująca adhezję) jest precyzyjnie kontrolowana. Dzieje się tak również w przypadku komórek nowotworowych. W ich migracji przez ECM również współdziałają specyficzne proteazy (tab. 2) o określonym rozmieszczeniu i czasie działania, regulowane przez odpowiednie aktywatory i inhibitory.

W ostatnim dziesięcioleciu zgromadzono wiele dowodów świadczących o tym, że w migracji komórek prawidłowych i w inwazji nowotworowej bardzo ważną rolę grają enzymy z rodziny metaloproteaz oraz urokinazą — aktywator plazminogenu i produkt jej działania — plazmina. Obie grupy enzymów są kontrolowane na wielu poziomach, włączając w to aktywację i transkrypcję genów,

translację, sekrecję proenzymów, wiązanie proenzymów do powierzchni komórki i elementów ECM, blokowanie ich przez specyficzne inhibitory oraz degradację bądź usuwanie czynnych enzymów. Wiele enzymów współdziała ze sobą. Klasycznym tego przykładem jest aktywacja metaloproteaz przez plazminę należącą do grupy proteaz serynowych.

METALOPROTEAZY (MMP)

Enzymy te znane od 30 lat (GROSS i LAPIERE 1962) charakteryzują się obecnością w cząsteczce atomu cynku. Syntetyzowane są w formie proenzymów, jako takie wiązane z powierzchnią komórki i najczęściej tam aktywowane. Fizjologicznie są unieczynniane głównie przez tkankowe inhibitory metaloproteaz (TIMP). Metaloproteazy dzieli się w zależności od rodzaju substratu, jaki rozkładają na: kolagenazy, żelatynazy i stromelizyny.



Ryc. 6. Przedostawanie się komórek nowotworowych przez błonę podstawną (BM) w ślad za komórkami normalnymi. Schemat sporządzony według opisu HILGARD i HELLMANN 1983. A — komórki nowotworowe wprowadzone drogą iniekcji do naczyń adhegują w żyłkach powłósczkowych do komórek śródbłonnka (E), po czym zostają otoczone przez płytki krwi (P) i fibrynę; wokół tak powstałego skrzepu gromadzą się leukocyty polimorfonuklearne (PMN). B — PMN przeciskają się pomiędzy dwiema sąsiadującymi komórkami śródbłonnka i degradują BM. C — komórki nowotworowe dążą w ślad za leukocytami korzystając z wytworzonej przez nie przerwy w BM. D — przerwa powiększa się, komórki nowotworowe wydostają się z naczynia i podejmują wędrówkę przez ECM, która zakończy się utworzeniem przerzutu (porównaj ryc. 1).

Kolagenazy

Znane są dwie kolagenazy rozcinające włókienka kolagenowe. Są to: kolagenaza interstycjalna (MMP-1) o ciężarze 54.1 kDa i kolagenaza neutrofilowa (MMP-5) o ciężarze 53.4 kDa. Oba enzymy przecinają łańcuchy kolagenów: I, II, III, VII i X w domenach helikoidalnych (MATRISIAN 1992, MIGNATTI i RIFKIN 1993). W wyniku cięcia, które następuje blisko końca karboksylowego cząsteczki, powstają dwa fragmenty o proporcjach 1:3. Te fragmenty ulegają dalszej proteolizie, która może być prowadzona przez inne enzymy (GROSS 1981, TRYGGVASON i współaut. 1987).

Kolagenazę interstycjalną syntetyzują przede wszystkim makrofagi i fibroblasty, a kolagenazę neutrofilową granulocyty obojętnochłonne. Kolagenazę interstycjalną, której poziom zwiększa się w komórkach wielu nowotworów człowieka (OSSOWSKI 1992, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a), znajduje się również w fibroblastach ECM bezpośrednio otaczających przemieszczające się komórki nowotworowe, co pozwala przypuszczać, że produkcja tego enzymu może być przez komórki nowotworowe stymulowana. NABESHIMA i współpracownicy (1991) odkryli i częściowo scharakteryzowali wytwarzany w komórkach raka płuc czynnik stymulujący produkcję kolagenazy przez fibroblasty. Być może czynnik ten stymuluje też syntezę i wydzielanie żelatynazy A i stromelizyny (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a). Ostatnio odkryto w komórkach niektórych nowotworów piersi nową metaloproteazę zaliczoną do kolagenaz — kolagenazę 3 (według URIA i współaut. 1994).

Żelatynazy

Te enzymy są specyficzne przede wszystkim dla kolagenów zdenaturowanych (stąd nazwa), a także kolagenów, w których domena helikoidalna jest z natury nieciągła (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b). Żelatynaza A (MMP-2) o ciężarze 72 kDa była pierwszym enzymem, któremu przypisano zdolność do rozkładania cząsteczek kolagenu IV i wiązano ją z możliwością przenikania komórek nowotworowych przez BM. Żelatynaza B (MMP-9) o ciężarze 92 kDa występuje, podobnie jak żelatynaza A, w makrofagach, granulocytach, epiteliocytach i komórkach nowotworowych (MATRISIAN 1992). Obie żelatynazy rozkładają oprócz kolagenów zdenaturowanych również kolagen IV, VII i X w ich domenach helikoidalnych (BERNHARD i współaut. 1994), elastynę (MATRISIAN 1992) i fibronektynę (MIGNATTI i RIFKIN 1993). Od innych metaloproteaz różnią się między innymi tym, że mają przylegający bezpośrednio do atomu cynku region homologiczny do jednej z domen FN, który wiąże się z substratem (MATRISIAN 1992, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b). Tylko żelatynazy mogą się łączyć, jeszcze w formie proenzymów, z endogennymi inhibitorami (TIMP). Prożelatynaza A łączy się z TIMP-2, a prożelatynaza B z TIMP-1.

Zarówno żelatynaza A jak i B (a także stromelizyna 2 i matrylizyna) były po raz pierwszy zidentyfikowane, oczyszczone i sklonowane w komórkach nowotworowych. Obecnie występowanie żelatynaz jest powszechnie stwierdzone zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w prawidłowych komórkach ruchliwych. Znajduje się je w większości inwazyjnych form raka piersi, jelita grubego, pęcherza i płuc (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b). Poziom żelatynaz jest skorelowany ze stopniem inwazyjności komórek (ZUCKER i współaut. 1987, 1993,

DAVIES i współaut. 1993, WATANABE i współaut. 1993, BERNHARD i współaut. 1994). Żelatynaza A może też być syntetyzowana i wydzielana przez komórki stromy przylegające do frontów inwazji nowotworowej (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a).

Stromelizyny

Do tej grupy należą cztery enzymy: stromelizyna 1 (ST-1, MMP-3), stromelizyna 2 (ST-2, MMP-10), stromelizyna 3 (ST-3) i matrylizyna (MMP-7).

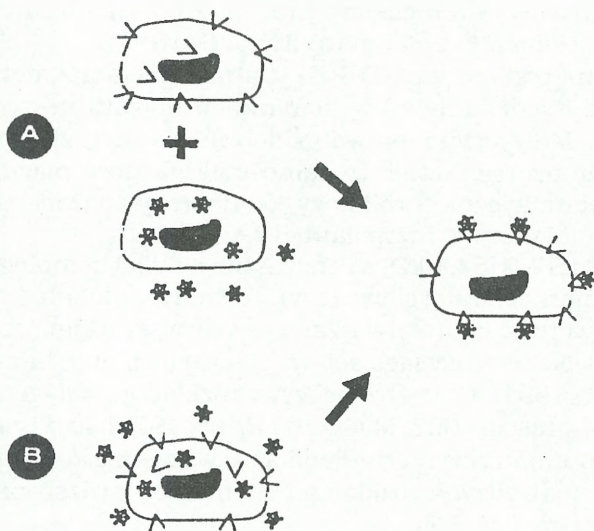
Matrylizyna (uprzednio znana pod nazwą PUMP-1) jest najmniejszą z metaloproteaz (29.7 kD). Występuje między innymi w komórkach nowotworowych (rak żołądka i jelita grubego). Matrylizyna prawdopodobnie może rozkładać elastynę (MATRISIAN 1992), może też regulować działalność aktywatora plazminogenu oddzielając domenę katalityczną urokinazy od domeny wiążącej się z receptorem powierzchniowym (MARCOTTE i współaut. 1992).

Stromelizyny ST-1 (54.0 kD) i ST-2 (54.1 kD) są enzymami o dużej homologii. Występują między innymi w komórkach raka głowy i szyi. Towarzyszą lokalnemu wzrostowi inwazyjności tego nowotworu. Są wytwarzane przede wszystkim przez fibroblasty stromy guza przyległe do nieciągłości w otaczającej guz błonie podstawnej (POLETTE i współaut. 1991). Obie stromelizyny rozkładają kolageny: III (MATRISIAN 1992), IV, V i IX (MATRISIAN 1992, MIGNATTI i RIFKIN 1993), lecz tylko w domenach globularnych. Wraz z matrylizyną rozkładają też wszystkie kolageny zdenaturowane. Stromelizyny i matrylizyna rozkładają też białkowy rdzeń proteoglikanów i niektóre glikoproteiny (LN, FN).

Ostatnio wiele uwagi poświęca się stromelizynie 3. Enzym ten został odkryty w komórkach pochodzących z biopsji inwazyjnego raka piersi (BASSET i współaut. 1990). Stromelizynę 3 syntetyzują fibroblasty otaczające migrujące komórki nowotworowe. Poziom RNA ST-3 maleje wraz ze wzrostem odległości wytwarzających go fibroblastów od czoła inwazji nowotworu. MULLER i współpracownicy (1993) stwierdzili obecność RNA ST-3 i białka ST-3 również w komórkach stromy raka głowy i szyi. Jak w poprzednim przypadku enzym ten był syntetyzowany przez fibroblasty. Sądzi się więc, że synteza ST-3 odbywa się pod kontrolą komórek nowotworowych, a ściślej dyfundującego czynnika wytwarzanego przez nie bezpośrednio lub pośrednio. Tak więc komórki nowotworowe mogą przeprowadzać degradację ECM za pomocą prawidłowych komórek stromy, które w ten sposób przygotowują im przejście.

W większości komórek nowotworowych ekspresja genów kodujących metaloproteazy nie jest stała, lecz indukowana różnymi aktywatorami, jak czynniki wzrostowe lub inne cytokiny (MATRISIAN 1990, MAUVIEL 1993). Podobnie różne aktywatory mogą wywoływać syntezę i wydzielanie przez komórki nowotworowe czynników stymulujących inne komórki. Coraz więcej zwolenników znajduje też pogląd, że metaloproteazy, włączając ST-3 (w raku głowy i szyi) oraz interstycjalną kolagenazę i żelatynazę A (w raku skóry) mogą być traktowane jako pochodzący ze stromy parakrynn³ czynnik, konieczny w progresji złośliwych nowotworów pochodzenia nabłonkowego. Wystarczy więc, by komórka nowotworowa

miała receptory dla określonej metaloproteazy oraz mogła stymulować jej syntezę i wydzielanie przez otaczające prawidłowe komórki stromy, by zyskała możliwość degradacji określonego składnika ECM. Wydaje się, że w migracji komórek nowotworowych parakrynnie i autokrynnie⁴ czynniki (ryc. 7) są równie ważne i być może stanowią rozwiązania alternatywne.



Ryc. 7. Parakrynnny i autokrynnny sposób przekazywania i przechwytywania ligandów. A — komórka syntetyzuje i wydziela do środowiska cząsteczki, które są przechwytywane i wiązane przez sąsiednie komórki niezdolne do ich wytwarzania, ale wyposażone w odpowiednie receptory. B — komórka wytwarzająca i wydzielająca określone cząsteczki sama je wiąże do własnej powierzchni, gdyż zarazem posiada specyficzne dla nich receptory powierzchniowe.

W stromie raka piersi stwierdzono współwystępowanie stromelizyny 3 i tenascyny (BASSET i współaut. 1990). Tenascyna jest tą glikoproteiną, która prawdopodobnie — przez swoje własności antyadhezywne — ułatwia komórkom guza odrywanie się i podnosi ich inwazyjność. Tenascyna jest syntetyzowana i wydzielana przez fibroblasty stymulowane między innymi przez neoplastyczne komórki nabłonka (ERICKSON i BOURDON 1989).

Ostatnio (SATO i współaut. 1994) odkryto i opisano nową metaloproteazę, którą określono jako „membrane-type matrix metalloprotease” (MT-MMP). Ten enzym o ciężarze 66 kD jest integralnym białkiem błonowym o domenie transmembranowej. Występuje w komórkach inwazyjnego raka płuc, a głównym jego zadaniem jest aktywacja prożelatynazy A. MT-MMP ściśle ogranicza aktywność proteolityczną żelatynazy do bezpośredniego sąsiedztwa błony komórkowej, gdyż na niej właśnie odbywa się aktywacja tego enzymu również wtedy, gdy jest on syntetyzowany przez komórki stromy i wydzielany do środowiska. Sekwencja zjawisk przedstawiać się wtedy może następująco: komórki nowotworowe stymulują fibroblasty do produkcji żelatynazy A, jako proenzym pojawia się ona w stromie, wiązana przez receptor na powierzchni komórki nowotworowej ulega tam aktywacji przez MT-MMP. Powoduje to punktową degradację kolagenów (przede wszystkim kolagenu IV).

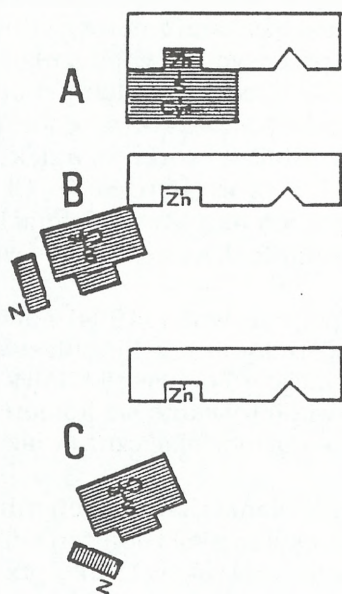
⁴

Wydzielane przez tę samą komórkę.

REGULACJA AKTYWNOŚCI METALOPROTEAZ

Aktywacja proenzymów

Wszystkie znane metaloproteazy są wydzielane w postaci nieaktywnych proenzymów. Dopiero po aktywacji zyskują zdolność degradowania składników ECM. W przypadku metaloproteaz rolę fizjologicznych aktywatorów pełnią przede wszystkim urokinaza i plazmin. Aktywowanie MMP odbywa się poprzez zakłócenie interakcji cysteiny z atomem cynku w cząsteczce. Zachodzące w cząsteczkach metaloproteaz zmiany konformacyjne prowadzą do autokatalitycznego odcięcia domeny propeptydowej i powstania czynnej formy enzymu (LIOTTA i współaut. 1991, WOESSNER 1991, KLEINER i STETLER-STEVENSON 1993, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b) (ryc. 8). Ponieważ zarówno prometaloproteazy, jak urokinaza i plazmina, są związane z błoną komórkową, aktywacja najczęściej zachodzi na powierzchni komórki lub w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Często jest ograniczona do określonych regionów powierzchni komórki —inwadopodiów—których zadaniem jest intensywna degradacja ECM umożliwiającą komórce migrację (CHEN 1992, MONSKY i CHEN 1993, MONSKY i współaut. 1993). Aktywacja prożelatyny, ściśle ograniczona do miejsc kontaktu komórki z BM, może prowadzić do miejscowej proteolizy kolagenu IV i utworzenia przejścia dla migrującej komórki. Wzrost aktywności proteolitycznej komórek może też być wynikiem interakcji pomiędzy samymi metaloproteazami. Na przykład, stromelizyna podnosi aktywność kolagenazy interstycjalnej i żelatyny A (MATRISIAN 1992, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b).



Ryc. 8. Aktywacja żelatyny A. A — propeptyd zawierający cysteinę jest związany poprzez siarkę z atomem Zn w katalitycznie czynnej domenie enzymu; maskując Zn blokuje on aktywność żelatyny. B — aktywator (plazmina, tripsyna) powoduje zerwanie połączenia cysteiny z Zn; wywołana tym zmiana konformacyjna cząsteczki enzymu prowadzi do odsłonięcia domeny katalitycznej zawierającej cynk. C — następuje autokatalityczne odcięcie propeptydu.

Aktywacja jednej z ważniejszych metaloproteaz, żelatyny A, może również zachodzić niezależnie od systemu urokinaza/plazminogen/plazmin w obecności inhibitorów proteaz serynowych za pomocą wspomnianej już proteazy MT-MMP.

Istnienie niezależnego od proteaz serynowych powierzchniowego mechanizmu specyficznej proteolizy pojedynczego elementu ECM może mieć ważne fizjologiczne następstwa. Taki mechanizm pozwala na szczególnie subtelną kontrolę degradacji ECM i ograniczenie do minimum powstających uszkodzeń.

Aktywacja metaloproteaz jest jednym z czynników potrzebnych, aby komórka mogła uzyskać fenotyp inwazyjny.

Inhibicja metaloproteaz i ich proenzymów

Sama aktywacja metaloproteaz nie wystarcza dla osiągnięcia przez komórkę wysokiego stopnia inwazyjności. W przypadku ruchliwych komórek prawidłowych tkankowe inhibitory metaloproteaz kontrolują ich aktywność w określonych miejscach. W przypadku komórek nowotworowych poziom aktywnych metaloproteaz również musi znajdować się pod kontrolą, ponieważ nadmierna proteoliza ECM może tak samo utrudniać migrację, jak zbyt słaba degradacja zewnątrzkomórkowej macierzy. Prowadzi ona bowiem z jednej strony do zniszczenia ECM, w tym i proteoglikanów tworzących środowisko sprzyjające migracji, a z drugiej strony przeciwdziała nawiązywaniu przez komórki kontaktów z podłożem (lub zbyt szybko je niszczy), co też utrudnia lokomocję. Wykazano, że podczas gdy w komórkach nowotworowych, syntetyzujących niewielkie ilości proteaz degradujących ECM dodatek inhibitora znosił ich inwazyjność, w przypadku komórek wytwarzających duże ilości proteaz taki sam dodatek inhibitora ją wzmacniał (TSUBOI i RIFKIN 1990). Tak więc inwazyjny fenotyp komórek nowotworowych wynika również z odpowiedniej proporcji aktywnych proteaz i ich inhibitorów na powierzchni komórki i w środowisku.

Tkankowy inhibitor metaloproteaz, TIMP-1, jest glikoproteiną o ciężarze 25–36 kDa, tworzącą nieodwracalne kompleksy z cząsteczkami interstycjalnej kolagenazy, stromelizyn, aktywnej żelatynazy B i jej proenzymu. Syntetyzuje go i wydzielają fibroblasty, komórki śródbłónki, komórki mięśni gładkich i chondrocyty. Drugi inhibitor metaloproteaz, TIMP-2 o ciężarze 20–24 kDa, chociaż podobny do TIMP-1 jest immunologicznie odrębny. TIMP-2 tworzy kompleksy z proenzymem żelatynazy A, podobnie jak TIMP-1 z prożelatynazą B. Oba inhibitory blokują wszystkie znane metaloproteazy w ich aktywnych formach, a łącząc się z prożelatynazą A lub B zapobiegają ich autoaktywacji (HAYAKAWA 1994).

STASKUS i współpracownicy (1991) oraz URIA i współpracownicy (1994) zidentyfikowali trzeci tkankowy inhibitor metaloproteaz, izolowany z fibroblastów zarodka kurzego (CHIMP-3) oraz komórek inwazyjnego raka piersi (TIMP-3) o ciężarze 22 kDa. Przypuszcza się, że TIMP-3 ułatwia odrywanie się komórek nowotworowych od elementów ECM i przyspiesza zmiany morfologiczne związane z transformacją komórek (HAYAKAWA 1994).

Wykazano, że podniesienie poziomu syntezy i wydzielania tkankowych inhibitorów metaloproteaz znosi inwazyjność komórek nie tylko przez obniżenie ich ruchliwości. Zgodnie z wynikami DECLERCK'a i współpracowników (1992) przypuszcza się, że zwiększenie produkcji inhibitora metaloproteaz w inwazyjnych i metastatycznych fibroblastach transformowanych onkogenem *ras* powoduje drastyczne ograniczenie procesów proteolitycznych wokół kolonii nowotworowej. W rezultacie gromadzi się tam nadmiar składników ECM, co utrudnia komórkom

nowotworowym przedostanie się na teren prawidłowej tkanki okołonowotworowej, a więc hamuje inwazję już na jej wczesnym etapie.

Inhibitory metaloproteaz znajdują się w ECM, osoczu i płynach interstycjalnych. Dlatego mogą one łatwo docierać do enzymów znajdujących się na powierzchni komórek. Związanie z receptorem powierzchniowym może chronić niektóre enzymy przed działaniem inhibitorów. Istnieją także dodatkowe mechanizmy zabezpieczające proteazy przed działaniem ich inhibitorów. Należy do nich między innymi usytuowanie kolagenazy po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, co chroni ten enzym przed zetknięciem z inhibitorem obecnym w środowisku (DECLERCK i współaut. 1992). Podobnie, otaczanie przez miejsca kontaktowe inwadopodiów, w których są nagromadzone enzymy proteolityczne i które intensywnie degradują ECM, utrudnia masowy napływ inhibitorów i unieczynnianie enzymów (MONSKY i CHEN 1993). Natomiast kontrolowana aktywność inhibitorów minimalizuje uszkodzenia ECM ściśle ograniczając miejsce i stopień degradacji jej struktur.

ROLA SYSTEMU UROKINAZA/PLAZMINOGEN/PLAZMINA

Cykl aktywacji plazminogenu i rola urokinazy

Plazminogen (90 kD) jest jednym z białek biorących udział w kontrolowanej proteolizie wewnątrz- i zewnątrznaczyniowej. Występuje w osoczu i w ECM, gdzie pełni ważną rolę w adhezji i migracji komórek. W cząsteczce plazminogenu można wyróżnić między innymi 5 domen typu zwanych kringle oraz trypsynopodobną domenę proteolityczną (MCLEAN i współaut. 1987). Plazminogen wiąże się z receptorami powierzchniowymi o niskiej specyficzności (PLOW i współaut. 1986, HAJJAR 1991, VAHERI 1992). Wiąże się też z okołokomórkowymi elementami ECM: glikozaminoglikanami i fibryną (MIGNATTI i RIFKIN 1993) oraz z fibronektyną, lamininą i witronektyną oraz trombospondyną (MOSCATELLI i RIFKIN 1988, VAHERI i współaut. 1992).

Aktywacja plazminogenu jest jednym z ważniejszych indukowanych, zewnątrzkomórkowych systemów proteolitycznych, związanych z kontrolą interakcji komórek nowotworowych z ECM (BLASI 1993). Aktywacja plazminogenu w wyniku proteolizy zachodzi głównie na powierzchni komórki. W czasie tej reakcji zarówno plazminogen, jak i jego aktywatory (przede wszystkim urokinaza) są związane ze swymi receptorami (STEPHENS i współaut. 1989, MCLEAN i współaut. 1987, MENHART i współaut. 1993). Produkt reakcji, plazmina, też pozostaje na powierzchni, związana z błoną komórkową, co chroni ją przed działaniem inhibitora, α 2-antyplazminy obecnej w środowisku. Okołokomórkowe rozmieszczenie elementów systemu urokinaza/plazminogen/plazmina przedstawia tabela 3. Plazmina jest proteazą serynową o bardzo szerokim spektrum działania. Może rozkładać takie składniki ECM jak fibronektyna i laminina, rdzeń białkowy proteoglikanów i zdenaturowane kolageny (tab. 2). Ponadto plazmina aktywuje metaloproteazy i elastazę oraz niektóre czynniki wzrostowe.

Jedną z ważniejszych funkcji plazminy jest aktywacja urokinazy, która sama jest aktywatorem plazminogenu. Z trzech fizjologicznych aktywatorów plazminogenu, streptokinaza jest wytwarzana przez bakterie, a dwa pozostałe: uroki-

naza (uPA, UK) i tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) są endogenne. Charakterystyczne w ich budowie są domeny kringle (MCMULLEN i FUJIKAWA 1985). Znajduje się je w wielu białkach związanych z koagulacją i fibrynolizą krwi. Odpowiedzialne są między innymi za wiązanie z fibrynogenem, fibryną, α 2-antyplazminą, trombospondyną, a także różnymi rodzajami komórek (MENHART i współaut. 1993). Pomimo pewnego podobieństwa obu endogennych aktywatorów (ryc. 9) urokinaza wydaje się pełnić o wiele ważniejszą rolę w skomplikowanej sekwencji procesów prowadzących do powstania przerzutu.

Tabela 3

Okołokomórkowe rozmieszczenie elementów cyklu urokinaza/
plazminogen/plazmina (według VAHERI i współaut. 1992)

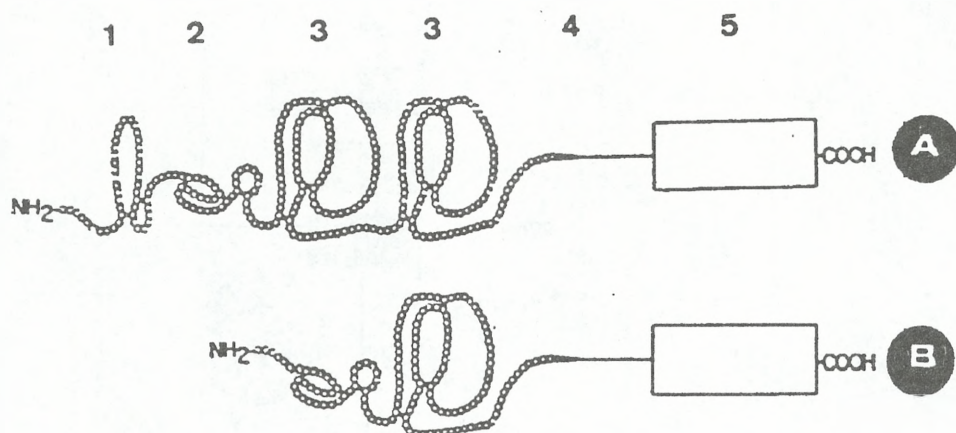
Element cyklu uPA/plg/pl	Rozmieszczenie
pro-uPA	kontakty ogniskowe, kontakty międzykomórkowe, zakończenia microspikes
aktywna uPA	kontakty ogniskowe, kontakty międzykomórkowe, zakończenia microspikes
uPAR	kontakty ogniskowe, kontakty międzykomórkowe, zakończenia microspikes
plg	równomierne na spodniej powierzchni komórki
PAI- 1	równomierne w podłożu pod komórką, wyłączając kontakty ogniskowe

Wysoki poziom ekspresji genu kodującego urokinazę wykazano różnymi metodami w większości badanych komórek ruchliwych, nowotworowych i prawidłowych (MONSKY i CHEN 1993). Stwierdzono też, że zakłócenia w działaniu urokinazy mogą zapobiec tworzeniu metastaz (CROWLEY i współaut. 1993).

Pro-urokinaza, zbudowana z pojedynczego łańcucha peptydowego, może być syntetyzowana przez prawidłowe komórki ruchliwe, komórki nowotworowe lub przez komórki stromy otaczające nowotwór (PYKE i współaut. 1991, CHEN 1992, BLASI 1993). W tym ostatnim przypadku przechwytyują ją ze środowiska i wiążą komórki nowotworowe mające na powierzchni receptory urokinazy (ryc. 7 A). Receptory te występują u komórek o własnościach inwazyjnych, lecz nie ma ich na powierzchni stacjonarnych komórek prawidłowych (BIANCHI i współaut. 1994). Natomiast prawidłowe komórki migrujące, jak monocyty czy granulocyty, mogą mieć od 10 000 do 250 000 receptorów urokinazy (BLASI 1993).

Receptor urokinazy wiąże zarówno urokinazę, jak i jej prekursor (ZHANG i współaut. 1993). Receptor jest glikoproteiną o ciężarze 55–65 kDa. Łączy się z błoną komórkową przez kowalencyjne wiązanie z GPI — glikozylofosfatydyloinozytolem (FAZIOLI i BLASI 1994). Takie połączenie zapewnia kompleksowi urokinaza-receptor swobodne przemieszczanie się w błonie komórkowej (VAHERI i współaut. 1992). Urokinaza aktywowana na drodze ograniczonej proteolizy składa się z dwóch łańcuchów — A i B. Łańcuch A zbudowany jest z jednej domeny kringle oraz znajdującej się w pobliżu końca aminowego domeny EGF-podobnej, przez którą urokinaza łączy się z receptorem powierzchniowym. Łańcuch B urokinazy jest aktywny katalitycznie.

Najważniejszym aktywatorem urokinazy jest plazmina (ryc. 10). Pojawiają się doniesienia także o innych aktywatorach urokinazy jak: elastaza (MAKOVICH i OWEN 1989), katepsyna B i serynowa proteaza błonowa występująca w fibroblastach transformowanych wirusem Rous (MIGNATTI i RIFKIN 1993).



Ryc. 9. Schemat budowy cząsteczek aktywatorów plazminogenu: tPA (A) i urokinazy (B). 1 — domena FN, 2 — domena czynnika wzrostowego, 3 — domena kringle, 4 — regiony łączące, 5 — region katalityczny.

Aktywacja urokinazy (podobnie jak plazminogenu) zachodzi na powierzchni komórki. Tempo aktywacji przez plazminę urokinazy związanej z receptorami powierzchniowymi jest około 20 razy wyższe niż urokinazy w roztworze. W związku z tym badano występowanie i lokalizację receptorów urokinazy oraz receptorów plazminy i plazminogenu na powierzchni tych samych komórek (nowotworowych i zarodkowych — PLOW i współaut. 1986, ZHANG i współaut. 1993). Stwierdzono, że oba rodzaje receptorów nie tylko występują na powierzchni tych samych komórek, ale również bezpośrednio ze sobą sąsiadują w ich przednich krawędziach. Ułatwia to ogniskowe aktywowanie urokinazy przez plazminę oraz aktywowanie plazminogenu przez urokinazę. Ponieważ w tej drugiej reakcji powstaje plazmina, cykl się zamyka (ryc. 10).

Aktywowana urokinaza bardzo wolno oddysocjuje od swego receptora i pozostaje czynna na powierzchni komórkowej przez 4–6 godzin. Związanie z receptorem nie powoduje jej internalizacji. Dopiero związanie powierzchniowej urokinazy z szybko działającym inhibitorem PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1) hamuje aktywność proteolityczną urokinazy i powoduje internalizację całego kompleksu receptor-urokinaza-inhibitor (CUBELLIS i współaut. 1990). Pomimo tego, że internalizacji ulega cały kompleks, tylko urokinaza i jej inhibitor są rozkładane w lizosomach. Receptor zaś powraca na powierzchnię (ryc. 10), co pozwala komórce na szybkie przegrupowanie receptorów urokinazy, a więc na szybkie zmiany rozmieszczenia na powierzchni komórek regionów o wysokiej aktywności proteolitycznej. Może to być jedną z ważniejszych funkcji inhibitora urokinazy.

Są tego liczne dowody. Stwierdzono między innymi wzrost poziomu aktywności urokinazy w migrujących komórkach śródbłonna, podczas gdy po ich zatrzymaniu spadał on do wartości wyjściowej (PEPPER i współaut. 1987). Urokinaza stymuluje chemotaksję granulocytów (GUDEWICZ i GILBOA 1987). Podniesiony poziom ekspresji urokinazy charakteryzuje komórki większości nowotworów złośliwych, a przerzuty mogą być skutecznie hamowane przez inhibitory urokinazy (OSSOWSKI 1992). Sądzi się (QUAX i współaut. 1991), że urokinaza działa w stosunkowo wczesnych stadiach tworzenia przerzutu, tych które wiążą się z ruchliwością komórek i degradacją ECM (porównaj ryc. 1 A, B).

Rozmieszczenie urokinazy i jej receptorów na powierzchni komórki jest charakterystyczne z punktu widzenia lokomocji. Znajduje się je na spodniej stronie strefy czołowej migrujących fibroblastów i komórek nowotworowych (POLLANEN i współaut. 1987) oraz w miejscach ich kontaktu z podłożem (MANGEL 1990, VAHERI i współaut. 1992), lecz nie odkryto ich w inwadopodiach (CHEN 1992) — porównaj tabela 3. CHEN przypuszcza więc, że system aktywacji plazminogenu bierze udział przede wszystkim w regulacji adhezji do podłoża (zrywanie kontaktów), a nie w intensywnej proteolizie ECM zachodzącej przy powierzchni inwadopodiów (torowanie przejścia). Podobne wnioski można wysnuć ze schematu przedstawionego przez BLASI (1993). Schemat ten pokazuje, jak cykl aktywacji/inaktywacji plazminogenu przez urokinazę i inhibitor PAI-1 w migrującej komórce może wpływać na jej kontakty z podłożem.

Związanie urokinazy z jej komórkowym receptorem stymuluje migrację komórek i potęguje ich reakcje chemotaktyczne. Ponieważ receptor urokinazy wiąże się z błoną przez GPI, który nie ma połączeń z cytoszkieletem odpowiedzialnym za ruchliwość komórek, przypuszcza się, że receptor ten tworzy kompleks z innymi białkami, z których przynajmniej jedno ulega istotnym zmianom w następstwie przyłączenia urokinazy do receptora (BUSO i współaut. 1994).

Ekspresja urokinazy w komórce może być wywołana przez wiele czynników takich jak cytokiny, CAMP, prostaglandyny, UV. Cytokiny i hormony kontrolują także ekspresję receptorów urokinazy. Ekspresję urokinazy można też wywoływać w komórkach nowotworowych przez zerwanie połączeń międzykomórkowych, tworzonych przez cząsteczki E-kadheryny. Zerwanie tych połączeń w wyniku wprowadzenia do środowiska odpowiednich przeciwciał powoduje reorganizację aktywnego cytoszkieletu tych komórek, co indukuje ekspresję genu kodującego urokinazę (FRIXEN i NAGAMINE 1993, BOTTERI i współaut. 1990). Prowadzi to więc do współdziałania dwóch elementów fenotypu metastatycznego: utraty połączeń międzykomórkowych i podjęcia syntezy urokinazy, a przy tym pojawiają się one we właściwej kolejności. Najpierw działa czynnik umożliwiający migrację (przez uwolnienie komórek), potem czynnik, który ją ułatwia (przez kontrolę adhezji i torowanie przejść).

WYSTĘPOWANIE I WSPÓŁDZIAŁANIE ENZYMÓW DEGRADUJĄCYCH ECM

Ruchliwość komórek połączona z ich zdolnością do proteolizy składników ECM jest jedną z podstawowych cech inwazyjnego fenotypu komórek nowotwo-

rowych (MATRISIAN 1992). Proteoliza jest konieczna, aby komórki rakowe mogły penetrować interstycjum dokonując inwazji tkanki okołonowotworowej oraz tworząc odległe przerzuty (STETLER-STEVENSON 1993a).

Pierwsze obserwacje dotyczące proteolitycznych zdolności komórek nowotworowych datują się od czasów, kiedy podczas prób prowadzenia hodowli komórek używano jako podłoża skrzepów. Zwrócono wtedy uwagę, że komórki nowotworowe rozpuszczają takie podłoża. FISCHER (1925) wysunął na podstawie swoich badań hipotezę, że zjawisko to może być wynikiem degradacji stromy pod wpływem substancji wydzielanej przez inwazyjny nowotwór. Później Fischer i inni badacze postulowali, że liza skrzepu przez komórki nowotworowe może wiązać się z aktywacją obecnego w osoczu (i w skrzepie) plazminogenu i działaniem produktu jego aktywacji — plazminy.

Przez wiele lat obserwacje te nie budziły szczególnego zainteresowania. Renesans badań nad tym zjawiskiem nastąpił w latach 70-tych, kiedy zauważono, że wirusowa transformacja hodowanych komórek tkankowych wywołuje gwałtowny wzrost ich zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej, spowodowany aktywacją plazminogenu (QUINGLEY i współaut. 1974). W wyniku dalszych badań w tym kierunku stwierdzono, że i inne proteazy serynowe, a także metaloproteazy oraz glikozydazy również towarzyszą komórkom transformowanym i nowotworowym. Okazało się też, że wzmożona zewnątrzkomórkowa aktywność proteolityczna charakteryzuje także migrujące komórki zarodkowe, leukocyty, komórki biorące udział w gojeniu rany i inne ruchliwe komórki prawidłowe.

Współczesne badania nad mechanizmami interakcji proteaz z elementami ECM podczas inwazji nowotworowej skupiają się wokół dwóch problemów: lokalizacji tych enzymów i ich współdziałania.

LOKALIZACJA ENZYMÓW

CHEN i współpracownicy (1984, 1985), CHEN i CHEN (1987), CHEN (1989, 1992), MONSKY i CHEN (1993), oraz MONSKY i współpracownicy (1993) wykazali, że degradacja fibronektyny i innych elementów ECM zachodzi w miejscach kontaktów migrujących komórek z podłożem, co wskazuje na przestrzenne ograniczenie proteolizy ECM do okolic bezpośrednio sąsiadujących z błoną komórkową. JONES i DECLERCK (1980) wykazali również, że degradacja glikoprotein, kolagenu i elastyny w ECM komórek mięśni gładkich zachodzi tylko wtedy, gdy komórki nowotworowe są osadzone bezpośrednio na albo w ECM. Gdy fragmenty ECM zawieszano w środowisku, nie następowała degradacja kolagenów ani elastyny. Degradacja jest więc ograniczona przestrzennie i wymaga bezpośredniego kontaktu tych białek z powierzchnią komórki. Zarówno wymienieni badacze, jak i wielu innych autorów (TRYGGVASON i współaut. 1987, ZUCKER i współaut. 1987, MOSCATELLI i RIFKIN 1988, MONSKY i CHEN 1993, MIGNATTI i RIFKIN 1993, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a i b), zgodnie lokalizują enzymy degradujące ECM na powierzchni migrujących przez nią komórek prawidłowych i nowotworowych.

Według MOSCATELLI i RIFKIN (1988) taka lokalizacja ma następujące znaczenie: a) związany z błoną proenzym łatwiej ulega aktywacji, a enzym może być

bardziej aktywny niż ten sam enzym swobodny w ECM. Sąsiedztwo proenzymów i ich aktywatorów na powierzchni komórki umożliwia i przyspiesza proces aktywacji; b) dzięki związaniu z receptorem powierzchniowym enzym może być chroniony przed inaktywacją przez inhibitor; c) związanie enzymów z powierzchnią komórki może prowadzić do ich gromadzenia się i skupiania w określonych miejscach; nagromadzenie i ko-lokalizacja na powierzchni komórki enzymów rozkładających ten sam substrat zwiększa prędkość degradacji tego jednego substratu; w przypadku enzymów rozkładających różne składniki ECM oznacza to koncentrację elementów biorących udział w wielostopniowej degradacji ECM, co usprawnia i przyspiesza ten proces; d) zatrzymanie enzymów przy błonie komórkowej ogranicza proteolizę tylko do bezpośredniego sąsiedztwa komórki, co pozwala na jej kontrolę i przestrzenne ograniczenie.

WSPÓLDZIAŁANIE ENZYMÓW

Badania dotyczące współdziałania enzymów pokazały między innymi, że działają one w określonej kolejności. Wynikać to może z kolejności ich aktywacji. Przykładem tego może być opisywana, między innymi przez VAN ASWEGEN i DU PLESSIS (1992), typowa sekwencja aktywacji proteaz: aktywacja plazminogenu przez uPA, po czym aktywowanie kolagenazy przez produkt pierwszej reakcji — plazminę. W rezultacie najpierw ulegają degradacji glikoproteiny (rozkładane przez plazminę), a następnie kolageny rozkładane przez kolagenazę.

Kolejność tę potwierdzają MONTGOMERY i współpracownicy (1993). Autorzy ci stwierdzili na powierzchni komórek czerniaka M24met występowanie interstycjalnej kolagenazy, żelatynazy A i B, stromelizyny i urokinazy (ta ostatnia znajdowała się również w środowisku). Po użyciu specyficznych inhibitorów (TIMP-2 i uPAI-1) udało im się pokazać kolejność degradacji poszczególnych elementów ECM (BM i interstycjum) przez komórki M24met. Zależny od urokinazy i plazminy rozpad glikoprotein zawsze wyprzedzał działanie metaloproteaz.

Prawdopodobnie ta kolejność jest związana z budową ECM. Glikoproteiny ECM otaczają rusztowanie kolagenowe i chronią je przed proteolizą. Dlatego usunięcie glikoprotein jest konieczne, aby powierzchniowe kolagenazy komórek nowotworowych miały dostęp do swego substratu. Proteoliza obu tych składników ECM narusza jej ciągłość strukturalną w wystarczającym stopniu, by mogła nastąpić infiltracja przez komórki nowotworowe (JONES i DECLERCK 1980).

Funkcje urokinazy i stymulowanej przez nią aktywacji plazminogenu wzbudziły już zainteresowanie klinicystów (JANICKE i współaut. 1994). Można spodziewać się, że wyniki prac w tym kierunku pozwolą na zastosowanie inhibitorów tego enzymu jako pomocniczego środka w leczeniu nowotworów (FAZIOLI i BLASI 1994). Podobne nadzieje budzą badania inhibitorów metaloproteaz (TROLL i współaut. 1984, HENDRIX i współaut. 1990, KENNEDY 1994, VASSALI i PEPPER 1994). W obu przypadkach dokładniejsze poznanie mechanizmów ułatwiających poruszanie się komórek nowotworowych w organizmie może pomóc w konstruowaniu skutecznych barier na ich drodze.

MIGRATION OF THE TUMOUR CELLS

Summary

The environment of each individual cell in the tissue of the body is formed by extracellular matrix (ECM). The macromolecules that make up the ECM can be grouped into: 1. fiber forming elements as collagens and elastin, 2. glycoproteins, and 3. proteoglycans. The normal and neoplastic migrating cells need to "carve a path" through the surrounding matrix to reach their destination. Recently, experiments employing model systems for the study of cell invasion, have allowed a more direct evaluation of the role of proteolytic enzymes in this process and have characterized the interactions of various degradative enzymes with each other and with their inhibitors. Neoplastic and normal migrating cells elaborate a vast array of proteases that enable them to proteolytically digest the underlying adhesion molecules. In doing this, the tumour cells disrupt the interactive interactions holding them in place, so they are free to degrade and migrate through the basement membrane and interstitial stroma. All the major classes of secreted proteases (mainly the metalloproteases and plasminogen activator —urokinase) are reported to be associated with the plasma membrane. This cell surface localisation is an essential feature in the control of cell migration, invasion and metastasis.

LITERATURA

- AKIYAMA S. K., NAGATA K., YAMADA K. M., 1990. *Cell surface receptors for extracellular matrix components*. Bloch. Biophys. Acta 1031, 91-110.
- ALBELDA S. M., BUCK C. A. 1990. *Integrins and other cell adhesion molecules*. FASEB J. 4, 2868-2880.
- ANDERSON J. C., 1976. *Glycoproteins of the connective tissue matrix*. Int. Connect. Tiss. Res. 7, 251-322.
- AZNAVOORIAN S., STRACKE M. I., KRUTZSCH H., SCHIFFMANN E., LIOTTA L. A., 1990. *Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells*. J. Cell Biol. 110, 1427-1438.
- BARSKY S. H., RAO C. N., HYAMS D., LIOTTA L. A., 1984. *Characterization of a laminin receptor from human breast carcinoma tissue*. Breast Canc. Res. Treat. 4, 181-188.
- BASSET P., BELLOCQ J. P., WOLF C., STOLL J., HUTIN P., LIMACHER J. M., PODHAJECER O. L., CHENARD M. P., RIO M. C., CHAMBON P., 1990. *A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas*. Nature 348, 699-703.
- BERNHARD R. J., GRUBER S. B., MUSCHEL R. J., 1994. *Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase, collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4293-4297.
- BIANCHI E., COHEN R. L., THOR A. T., TODD R. F., MIZUKAMI I. F., LAWRENCE D. A., LJUNG B. M., 1994. *The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue*. Canc. Res. 54, 861-866.
- BLASI F., 1993. *Urokinase and urokinase receptor: a paracrine- autocrine system regulating cell migration and invasiveness*. BioEs. 15, 105-111.
- BORCHERS A. H., POWELL M. B., FUSENIG N. E., BOWDEN G. T., 1994. *Paracrine factor and cell-cell contact-mediated induction of protease and c-ets gene expression in malignant keratinocyte/dermal cocultures*. Exp. Cell Res. 213, 143-147.
- BOTTERI F. M., BALMER-HOFER K., RAJPUT P., NAGAMINE Y., 1990. *Disruption of cytoskeletal structures results in the induction of the urokinase-type plasminogen activator gene expression*. J. Biol. Chem. 265, 13327-13333.
- BUCK C. A., HORWITZ A. F., 1987. *Cell surface receptors for extracellular matrix molecules*. Ann. Rev. Cell Biol. 3, 179-205.
- BUCK C. A., KNUDSEN K. A., DAMSKY C. H., DECKER C. L., GREGGS R. R., DUGGAN K. E., BORYCZKO D., HORWITZ A. F., 1985. *Integral membrane protein complexes in cell-matrix adhesion*. [W:] *The cell in contact*. EDELMAN G. M. i THIERY J.-P. (red.) John Wiley and Sons, New York, 345-364.
- BUSO N., MASUR S. K., LAZEGA D., WAXMAN S., OSSOWSKI L., 1994. *Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells*. J. Cell Biol. 126, 259-270.

- CAMP R. L., KRAUS T. A., PURE E., 1991. Variation in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *J. Cell Biol.* 115, 1283–1292.
- CHEN W.-T., 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusion formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* 251, 167–185.
- CHEN W.-T., 1992. Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumor invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 802–809.
- CHEN W.-T., OLDEN K., BERNARD B. A., CHU F. F., 1984. Expression of transformation —associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.* 98, 1546–1555.
- CHEN W.-T., CHEN J. M., PARSONS S. J., PARSONS J. T., 1985. Local degradation of fibronectin in sites of expression of the transforming gene product pp60src. *Nature (London)* 316, 156–158.
- CHEN J. M., CHEN W.-T., 1987. Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cell. *Cell* 48, 193–203.
- CHIQUET-EHRSMANN R., 1990. What distinguishes tenascin from fibronectin. *FASEB J.* 4, 2598–2604.
- CROWLEY C. W., COHEN R. L., LUCAS B. K., LIU G., SHUMAN M. A., LEVINSON A. D., 1993. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5021–5025.
- CUBELLIS M. V., WUN T.-C., BLASI F., 1990. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 9, 1079–1085.
- DAVID G., 1993. Integral membrane heparan sulphate proteoglycans. *FASEB J.* 7, 1023–1030.
- DAVIES B., WAXMAN J., WASAN H., ABEL P., WILLIAMS G., KRAUSZ T., NEAL D., THOMAS D., HANBY A., BALKWILL F., 1993. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Canc. Res.* 53, 5365–5369.
- DECLERCK Y. A., PEREZ N., SHIMADA H., BOONE T. C., LANGLEY K. E., TAYLOR S. M., 1992. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Canc. Res.* 52, 701–708.
- DIMILLA P. A., STONE J. A., QUINN J. A., ALBELDA S. M., LAUFFENBURGER D. A., 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J. Cell Biol.* 122, 729–737.
- ENTERLINE H. T., COMAN D. R., 1950. The amoeboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* 3, 1033–1038.
- ERICKSON H. P., 1993. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 869–876.
- ERICKSON H. P., BOURDON M. A., 1989. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 71–92.
- FAZIOLI F., BLASI F., 1994. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy? *TIPS* 15, 25–29.
- FISCHER A., 1925. Tissue culture. *Studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro*. Levin and Munksgaard. Copenhagen.
- FRANZBLAU C., FARIS B., 1981. *Elastin*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press. New York and London, 65–93.
- FRIXEN U. H., NAGAMINE Y., 1993. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Canc. Res.* 53, 3618–3623.
- FURCHT L. T., MCCARTHY J. B., PALM S. L., BASARA M. L., ENENSTEIN I., 1984. Peptide fragments of laminin and fibronectin promote migration (haptotaxis and chemotaxis) of metastatic cells. [W:] *Basement membranes and cell movement*, Ciba Foundation Symp. 108, Pitman, London, 130–145.
- GAMIAN A., 1992. Stłownictwo glikoprotein, glikopeptydów i peptydoglikanów. *Postępy Biochemii* 38, 81–87.
- GIANCOTTI F. G., MAINIERO F., 1994. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Bioch. Biophys. Acta* 1198, 47–64.
- GROSS J., 1981. An assay on biological degradation of collagen. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 217–258.
- GROSS J., LAPIERE C. M., 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1197–1204.
- GUDEWICZ P. W., GILBOA N., 1987. Human urokinase-type plasminogen activator stimulates chemotaxis of human neutrophils. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 147, 1176–1181.
- HAJJAR K. A., 1991. The endothelial cell tissue plasminogen activator receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 21962–21970.
- HARDINGHAM T. E., FOSANG A. J., 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6, 861–870.

- HAR-EL B., TANZER M. L., 1993. *Extracellular matrix 3: Evolution of the extracellular matrix in invertebrates*. FASEB J. 7, 1115-1123.
- HART I. R., GOODE N. T., WILSON R. E., 1989. *Molecular aspects of metastatic cascade*. Bloch. Biophys. Acta 989, 65-84.
- HASCALL V. C., HASCALL G. K., 1981. *Proteoglycans*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.), Plenum Press, New York and London, 39-63.
- HAYAKAWA T., 1994. *Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity*. Cell Str. Funct. 19, 109-114.
- HENDRIX M. J. C., WOOD W. R., SEFTOR E. A., LOTAN D., NAKAJIMA M., MISIOROWSKI R. L., SEFTOR R. E. B., STETLER-STEVENSON W. G., BEVACQUA S. J., LIOTTA L. A., SOBEL M. E., RAZ A., LOTAN R. 1990. *Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor*. Canc. Res. 50, 4121-4130.
- HERRLICH P., ZOLLER M., PALS S. T., PONTA H., 1993. *CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes*. Immunol. Today 14, 395-399.
- HILGARD P., HELLMANN K., 1983. *Invasion and metastases as targets for tumour therapy. An overview* [W:] *The control of tumour growth and its biological bases*. DAVIES W., MALTONI C., TANNEBERGER S. (red.), Akademie-Verlag Berlin, 33-41.
- HYNES R. O., 1981. *Fibronectin and its relation to cellular structure and behavior*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 295-334.
- JANICKE F., PACHE L., SCHMITT M., ULM K., THOMSEN C., PRECHTL A., GRAEFF H., 1994. *Both the cytosol and detergent extracts of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1*. Canc. Res. 54, 2527-2530.
- JONES P. A., DECLERCK Y. A., 1980. *Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic human tumor cells*. Canc. Res. 40, 3222-3227.
- JOUANNEAU J., MOENS G., BOURGEOIS Y., POUPON M. F., THIERY J.-P., 1994. *A minority of carcinoma cells producing acidic fibroblast growth factor induces a community effect for tumor progression*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 286-290.
- JULIANO R. L., 1987. *Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis*. Bloch. Biophys. Acta 907, 261-278.
- JULIANO R. L., HASKILL S., 1993. *Signal transduction from extracellular matrix*. J. Cell Biol. 120, 577-585.
- KANEMOTO T., REICH R., ROYCE L., 1990. *Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2279-2283.
- KENNEDY A. R., 1994. *Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors*. Canc. Res. (suppl.) 54, 1999-2005.
- KLEINER D. E. Jr., STETLER-STEVENSON W. G., 1993. *Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases*. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 891-897.
- KLOMINEK J., ROBERT K.-H., SUNDQVIST K.-G., 1993. *Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance*. Canc. Res. 53, 4376-4382.
- KNUDSON C. B., KNUDSON W., 1993. *Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease*. FASEB J. 7, 1233-1241.
- KNUDSON W., BISWAS C., TOOLE B. B., 1984. *Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6767-6771.
- KOVACS E. J., 1991. *Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue*. Immunol. Today 12, 17-23.
- KRAMER R. H., NICOLSON G. L., 1979. *Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: a model for metastatic invasion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5704-5708.
- LAHAV J., 1993. *The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology*. Bloch. Biophys. Acta 1182, 1-14.
- LAURENT T. C., FRASER R. E., 1992. *Hyaluronan*. FASEB J. 6, 2397-2404.
- LEE G. M., JOHNSTONE B., JACOBSON K., CATERSON B., 1993. *The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells*. J. Cell Biol. 123, 1899-1907.
- LIN C. Q., BISSELL M. J., 1993. *Multi-faced regulation of cell differentiation by extracellular matrix*. FASEB J. 7, 737-743.

- LINSENMAYER T. F., 1981. *Collagen* [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 5-37.
- LIOTTA L. A., 1984. *Final general discussion* [W:] *Basement membranes and cell movement*, Ciba Foundation Symp. 108, Pitman, London, 269.
- LIOTTA L. A., RAO C. N., BARSKY S. H., BRYANT G., 1984. *The laminin receptor and basement membrane dissolution: role in tumour metastasis* [W:] *Basement membranes and cell movement*, Ciba Foundation Symp. 108, Pitman, London, 146-162.
- LIOTTA L. A., WEWER U. M., RAO C. N., BRYANT G., 1985. *Laminin receptor* [W:] *The cell in contact*. EDELMAN G. M. i THIERY J.-P. (red.) John Wiley and Sons, New York, 333-344.
- LIOTTA L. A., RAO C., WEWER U. M., 1986. *Biochemical interaction of tumor cells with the basement membrane*. *Ann. Rev. Bioch.* 55, 1037-1057.
- LIOTTA L. A., STEEG P. S., STETLER-STEVENSON W. G., 1991. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. *Cell* 64, 327-336.
- MAKOVICH R., OWEN W. G., 1989. *An elastase-dependent pathway of plasminogen activation*. *Biochemistry* 28, 4517-4522.
- MANGEL W. F., 1990. *Better reception for urokinase*. *Nature* 344, 488-489.
- MARCOTTE P. A., KOZAN I. M., DORWIN S. A., RYAN J. M., 1992. *The matrix metalloproteinase pump-1 catalyze formation of low molecular WEIGHT (Pro)urokinase in cultures of normal human kidney cells*. *J. Biol. Chem.* 267, 13803-13806.
- MAREEL M. M., VAN ROY F. M., BRACKE M. E., 1993. *How and when do tumor cells metastasize*. *Crit. Rev. Oncogen.* 4, 559-594.
- MARTIN G. R., TIMPL R., 1987. *Laminin and other basement membrane components*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 57-85.
- MATRISIAN L. M., 1990. *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling*. *Trends Genet.* 6, 121-125.
- MATRISIAN L. M., 1992. *The matrix-degrading metalloproteinases*. *BioEss.* 14, 455-463.
- MAUVIEL A., 1993. *Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression*. *J. Cell. Bioch.* 53, 288-295.
- MAYNE R., BREWTON R. G., 1993. *New members of the collagen superfamily*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 883-890.
- MCDONALD J. A., 1988. *Extracellular matrix assembly*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 183-207.
- MCGOWAN S. E., 1992. *Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair*. *FASEB J.* 6, 2895-2903.
- MCLEAN J. W., TOMLISON J. E., KUANG W.-J., EATON D. L., CHEN E. Y., FLESS G. M., SCANU A. M., LAWN R. M., 1987. *cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen*. *Nature* 300, 132-137.
- McMULLEN B. A., FUJIKAWA K., 1985. *Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor)*. *J. Biol. Chem.* 260, 5328-5334.
- MENHART N., MCCANCE S. G., SEHL L. C., CASTELLINO F. J., 1993. *Functional independence of the kringle 4 and kringle 5 region of human plasminogen*. *Biochem.* 32, 8799-8806.
- MERZAK A., KOOCHECKPOUR S., PILKINGTON G. J., 1994. *CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro*. *Canc. Res.* 54, 3988-3992.
- MIGNATTI P., RIFKIN D. B., 1993. *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion*. *Physiol. Rev.* 73, 161-195.
- MIGNATTI P., ROBBINS E., RIFKIN D. B., 1986. *Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade*. *Cell* 47, 487-498.
- MONSKY W. L., CHEN W.-T., 1993. *Proteases of cell adhesion proteins in cancer*. *Canc. Biol.* 4, 251-258.
- MONSKY W. L., KELLY T., LIN C.-Y., YEH Y., STETLER-STEVENSON W. G., MUELLER S. C., CHEN W.-T., 1993. *Binding and localization of M_r72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia*. *Canc. Res.* 53, 3159-3164.
- MONTGOMERY A. M. P., DECLERCK Y. A., LANGLEY K. E., REISFELD R. A., MUELLER B. M., 1993. *Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways*. *Canc. Res.* 53, 693-700.
- MOSCATELLI D., RIFKIN D. B., 1988. *Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis*. *Bioch. Biophys. Acta* 948, 67-85.
- MOSHER D. F., SOTTILE J., WU C., MCDONALD J. A., 1992. *Assembly of extracellular matrix*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 810-818.
- MULLER D., WOLF C., ABECCASSI J., MILLON R., ENGELMAN A., BRONNER G., ROUYER N., RIO M.-C., EBER M., MATHLIN G., CHAMBON P., BASSET P., 1993. *Increased stromelysin 3 gene expression is*

- associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Canc. Res.* 53, 165-169.
- MYOHANEN H. T., STEPHENS R. W., HEDMAN K., TAPIOVAARA H., RONNE E., HOYER-HANSEN G., DANO K., VAHERI A., 1993. *Distribution and lateral mobility of the urokinase-receptor complex at the cell surface.* *J. Hist. Cytoch.* 41, 1291-1301.
- NABESHIMD K., LANE W. S., BISWAS C., 1991. *Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor.* *Arch. Bioch. Biophys.* 285, 90-96.
- NOEL A., MUNAUF C., BOULVAIN A., CALBERG-BACQ C. M., LAMBERT C. A., NUSGENS B., LAPIERE C. M., FOIDART J. M., 1992. *Modulation of collagen and fibronectin synthesis in fibroblasts by normal and malignant cells.* *J. Cell. Bioch.* 48, 150-161.
- OSSOWSKI L., 1992. *Invasion of connective tissue by human carcinoma cell lines: requirement for urokinase, urokinase receptor and interstitial collagenase.* *Canc. Res.* 52, 6754-6760.
- OSTROWSKI K., KAWIAK J. (red.), 1990. *Cytofizjologia.* PZWL, Warszawa.
- PAWELEC, D. N., BOXBERGER H.-J., 1994. *Defined tumor cell-host interactions are necessary for malignant growth.* *Crit. Rev. Oncogen.* 5, 69-105.
- PEPPER M. S., VASSALI J. D., MONTESANO R., ORCI L., 1987. *Urokinase-type plasminogen activator in induced in migrating capillary endothelial cells.* *J. Cell Biol.* 105, 2535-2541.
- PLOW E. F., FREANEY D. E., PLESCIA J., MILES L. A., 1986. *The plasminogen system and cell surface: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type.* *J. Cell Biol.* 103, 2411-2420.
- POLETTE M., CLAVEL C., MULLER D., ABECASSIS J., BINNIGER I., BIRENBOUT P., 1991. *Detection of mRNAs encoding collagenase 1 and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by in situ hybridization.* *Inv. Met.* 11, 76-83.
- POLLANEN J., SAKSELA O., SALONEN E.-M., ANDREASEN P., NIELSEN I. S., DANO K., VAHERI A., 1987. *Distinct localization of urokinase-type plasminogen activator and its type 1 inhibitor under cultured human fibroblasts and sarcoma cells.* *J. Cell Biol.* 106, 124-132.
- POLLANEN J., HEDMAN K., NIELSEN L. S., DANO K., VAHERI A., 1988. *Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts.* *J. Cell Biol.* 106, 87-95.
- PONTA H., SLEEMAN J., HERRLICH P., 1994. *Tumor metastasis formation: cell-surface proteins confer metastasis-promoting or -suppressing properties.* *Bioch. Acta* 1198, 1-10.
- PRIETO A. L., ANDERSSON-FISONE C., CROSSIN K. L., 1992. *Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytactin.* *J. Cell Biol.* 119, 663-678.
- PYKE C., KRISTENSEN P., RALFKIAER E., GRONDAHL-HANSEN J., ERIKSEN J., BLASI F., DANO K., 1991. *Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptors in cancer cell at invasive foci in human colon adenocarcinomas.* *Am. J. Pathol.* 138, 1059-1067.
- QUAX P. H. A., VAN MUIJEN G. N. P., WEENING-VERHOEFF E. J. D., LUND L. R., DANO K., RUITER D. J., VERHEIJEN J. H., 1991. *Metastatic behaviour of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type 1 inhibitor and urokinase-mediated matrix degradation.* *J. Cell Biol.* 115, 191-199.
- QUINGLEY J. P., OSSOWSKI L., REICH E., 1974. *Plasminogen, the serum proenzym activated by factors from cell transformed by oncogenic viruses.* *J. Biol. Chem.* 249, 4306-4311.
- RAGHOW R. 1994. *The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis.* *FASEB J.* 8, 823-831.
- RAZ A., ZÖLLER N., BEN-ZE'EV, 1986. *Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells.* *Exp. Cell Res.* 162, 127-141.
- RUOSLAHTI E., 1988. *Structure and biology of proteoglycans.* *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 229-255.
- RUOSLAHTI E., 1989. *Proteoglycans in cell regulation.* *J. Biol. Chem.* 264, 13369-13372.
- RUOSLAHTI E., YAMAGUCHI Y., 1991. *Proteoglycans as modulator of growth factor activities.* *Cell* 64, 867-869.
- RUSCIANO D., BURGER M. M., 1992. *Why cancer cells metastasize into particular organs?* *BioEssays* 14, 185-193.
- SAGE E. H., BORNSTEIN P., 1991. *Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions.* *J. Biol. Chem.* 266, 14831-14834.
- SATO H., TAKINO T., OKADA Y., CAO J., SHIGANAWA A., YAMAMOTO E., SEIKI M., 1994. *A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cell.* *Nature* 370, 61-65.
- SCOTT-BURDEN T., 1994. *Extracellular matrix: the cellular environment.* *NIPS* 9, 110-115.
- SHERMAN L., SLEEMAN J., HERRLICH P., PONTA H., 1994. *Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression.* *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 726-733.

- SHIRASUNA K., SAKO M., HAYASHIDO Y., YOSHIOKA H., SUGIURA T., MATSUYA T., 1993. *Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation*. *Canc. Res.* 53, 147-152.
- STAHL A., MUELLER B. M., 1994. *Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro*. *Canc. Res.* 54, 3066-3071.
- STASKUS P. W., MASIAZ F. R., PALLANCK L. J., HAWKES S. P., 1991. *The 21 kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts*. *J. Biol. Chem.* 266, 449-454.
- STEPHENS R. W., POLLANEN J., TAPIOVAARA H., LEUNG K.-C., SIM P. S., SALONEN E.-M., RANNE E., BEHRENDT N., DANO K., VAHERI A., 1989. *Activation of pro-urokinase and plasminogen of human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactant*. *J. Cell Biol.* 108, 1987-1995.
- STETLER-STEVENSON W. G., AZNAVOORIAN S., LIOTTA L. A., 1993a. *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 541-573.
- STETLER-STEVENSON W. G., LIOTTA L. A., KLEINER J. D., JR., 1993b. *Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. *FASEB J.*, 7, 1434-1441.
- STOKER M., GHERARDI E., 1991. *Regulation of cell movement: the motogenic cytokines*. *Bioch. Bioph. Acta* 1072, 81-102.
- TARABOLETTI G., ROBERTS D. D., LIOTTA L. A., 1987. *Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different domains*. *J. Cell Biol.* 105, 2409-2415.
- THOMAS L., BYERS H. R., VINK J., STAMENKOVIC I., 1992. *CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate*. *J. Cell Biol.* 118, 971-977.
- TOOLE D. P., 1981. *Glycosaminoglycans in morphogenesis*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 259-294.
- TROLL W., FRENKEL K., WIESNER R., 1984. *Protease inhibitors as anticarcinogens*. *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 1245-1250.
- TRYGGVASON K., 1993. *The laminin family*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 877-872.
- TRYGGVASON K., HOYHTYA M., SALO T., 1987. *Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion*. *Bioch. Bioph. Acta* 907, 191-217.
- TSUBOI R., RIFKIN D. B., 1990. *Bimodal relationship between invasion of the amniotic membrane and plasminogen activator activity*. *Int. J. Canc.* 46, 56-60.
- TURLEY E. A., AUSTEN L., MOORE D., HOACE K., 1993. *Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion*. *Expl. Cell. Res.* 207, 277-282.
- UNDERHILL C., 1992. *CD44: the hyaluronan receptor*. *J. Cell Sci.* 103, 293-298.
- URIA J. A., FERRANDO A. A., VELASCO G., FRELJE J. M. P., LOPEZ-OTIN C., 1994. *Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family*. *Canc. Res.* 54, 2091-2094.
- VAHERI A., TAPIOVAARA H., BIZIK J., SIVEN V., MYOHANEN H., REISBERG T., LYMBOVSSAKIS A., PALOLAHTI M., STEPHENS R. W., 1992. *Plasminogen activation on tumour cell surface [W:] Metastasis: Basic research and its clinical applications*. RABES H., PETERS P. E., MUNK K. (red.), Karger, Basel, 127-140.
- VAN ASWEGEN C. H., DU PLESSIS D. J., 1992. *The detachment cascade during metastasis*. *Med. Hyp.* 39, 364-366.
- VAN DEN REST M., GARRONE R., 1991. *Collagen family of proteins*. *FASEB J.* 5, 2814-2822.
- VASSALI J.-D., PEPPER M. S., 1994. *Membrane proteases in focus*. *Nature* 370, 14-15.
- VENSTROM K. A., REICHARDT L. F., 1993. *Extracellular matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system*. *FASEB J.* 7, 996-1002.
- VISCHER P., VOLKER W., SCHMIDT A., SINCLAIR N., 1988. *Association of thrombospondin of endothelial cells with other matrix proteins and cell attachment sites and migration tracks*. *Eur. J. Cell Biol.* 47, 36-46.
- VLEMINCKX K. L., DEMAN J. J., BRUYNEEL E. A., VANDENBOSSCHE G. M. R., KEIRSEBILCK A. A., MAREEL M. M., VAN ROY F. M., 1994. *Enlarged cell-associated proteoglycans abolish E-cadherin functionality in invasive tumor cells*. *Canc. Res.* 54, 873-877.
- WATANABE H., NAKANISHI I., YAMASHITA K., HAYAKAWA T., OKADA T., 1993. *Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase, type IV collagenase) from monoblastoid cells: correlation with cellular invasion*. *J. Cell Sci.* 104, 991-999.
- WELCH D. R., SCHISSEL D. J., HOWREY R. P., AEED P. A., 1989. *Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to "normal" circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5859-5863.

- WERB Z., TREMBLE P. M., BEHRENDTSEN O., CROWLEY E., DAMSKY C. H., 1989. *Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression*. J. Cell Biol. 109, 877-889.
- WIGHT T. A., KINSELLA M. G., QUARNSTROM E. E., 1992. *The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation*. Curr. Op. Cell Biol. 4, 793-801.
- WOESSNER J. F. Jr., 1991. *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling*. FASEB J., 5, 2145-2154.
- YAMADA K. M., 1981. *Fibronectin and other structural proteins*. [W:] Cell biology of extracellular matrix. HAY E. D. (red.) Plenum Press. New York and London, 95-110.
- YAMADA K. M., HUMPHRIES M. J., HASEGAWA T., HASEGAWA E., OLDEN K., CHEN W-T., AKIYAMA S. K., 1985. *Fibronectin: molecular approaches to analyzing cell interactions with the extracellular matrix*. [W:] The cell in contact. EDELMAN G. M. i THIERY J.-P. (red.) John Wiley and Sons, New York, 303-333.
- YAMADA Y., KLEINMAN H. K., 1992. *Functional domains of cell adhesion molecules*. Curr. Opin. Cell Biol. 4, 819-823.
- YURCHENCO P. D., SCHITTNY J. C., 1990. *Molecular architecture of basement membranes*. FASEB J. 4, 1577-1589.
- YURCHENCO P. D., CHENG T. S., COLOGNATO I. H., 1992. *Laminin forms an independent network in basement membranes*. J. Cell Biol. 117, 1119-1133.
- ZHANG S., LAURENT M., LOPEZ-ALEMANY R., MAZAR A., HENKIN J., RONNE E., BURTIN P., 1993. *Comparative localization of receptors for plasmin and for urokinase on MCF7 cells*. Exp. Cell Res. 207, 290-299.
- ZUCKER S., WIEMAN J. M., LYSIK R. M., WILKIE D., RAMUMURTHY N. S., GOLUB L. M., LANE B., 1987. *Enrichment of collagen and gelatin degrading activities in the plasma membranes of human cancer cells*. Canc. Res. 47, 1608-1614.
- ZUCKER S., LYSIK R. M., ZARRABI M. H., MOLL U., 1993. *M-92 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer*. Canc. Res. 53, 140-146.)