

## 9.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ MMP-9 ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

A. Παπαθωμά, B. Ζουμπουρλής, Π. Παπασάββα, A. Πίντζας

Οι Μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) αποτελούν μια κατηγορία περίπου 20 ενζύμων που διασπούν ή πρωτεολύουν όλα τα συστατικά του εξωκυττάρου χώρου<sup>1</sup>. Οι πρωτεάσες αυτές παρουσιάζουν εξειδίκευση όσον αφορά την επιλογή της κατηγορίας πρωτεϊνών του στρώματος που διασπούν. Οι Μεταλλοπρωτεάσες αν και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά στην δομή και στην λειτουργία τους<sup>2</sup>. Το καταλυτικό τους τμήμα περιέχει θέση πρόσδεσης για τον ψευδάργυρο, η οποία είναι καθοριστική για την ενεργότητα των ενζύμων. Όλες οι MMPs βρίσκονται αρχικά σε μη ενεργή μορφή. Η αποκοπή του κομματιού τους το οποίο λειτουργεί ως εσωτερικός αναστολέας της ενεργότητας, τις μετατρέπει σε ένζυμα πρωτεόλυσης. Το καρβοξυλικό άκρο των MMPs παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη του ορού αιμοπαιξίνη, η οποία ρυθμίζει την πρόσδεση των ενζύμων στο κατάλληλο υπόστρωμα και στους αναστολείς τους<sup>3</sup>. Ο ρόλος των άλλων λειτουργικών τμημάτων των MMPs περιλαμβάνει: 1) την ρύθμιση πρόσδεσης με το κατάλληλο υπόστρωμα (π.χ τμήμα ινονεκτίνης και τμήμα κολλαγόνου τύπου V), 2) την δυνατότητα διαμεμβρανικής πρόσδεσης και 3) την δυνατότητα διάσπασης των MMPs με στόχο την ενεργοποίησή τους<sup>4</sup>. Οι ζελατινάσες (MMP-2 και MMP-9) είναι μια κατηγορία Μεταλλοπρωτεασών οι οποίες αποικοδομούν το αποδιαταγμένο κολλαγόνο (ζελατίνη), τα κολλαγόνα τύπου IV και V και την ινονεκτίνη.

### Ρύθμιση της έκφρασης των MMPs

Οι MMPs ρυθμίζονται στο επίπεδο έκφρασης των γονιδίων τους και στο επίπεδο έκκρισης και ενεργότητας των πρωτεϊνών τους<sup>1,2</sup>. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα ή και καθόλου, όμως η έκφραση τους επάγεται κατά την ανακατάταξη των ιστών. Οι πρωτεΐνες των MMPs εκκρίνονται άμεσα από τα κύτταρα. Αυτό δεν συμβαίνει στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, όπου οι MMPs εκκρίνονται αργότερα από τα κυστίδια αποθήκευσης τους. Η έκφραση των περισσότερων ενζύμων ρυθμίζεται από τις κυτοκίνες, τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), την ιντερλευκίνη και το TPA<sup>5</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταγραφή της MMP-9 επάγεται από τους παράγοντες AP-1, NF-κB και Sp1 μέσω πρόσδεσης τους στις κατάλληλες συναινετικές αλληλουχίες του υποκινητή της<sup>6</sup>. Η έκφραση της MMP-2 αντίθετα, ελέγχεται από διαφορετικούς μηχανισμούς από ότι η MMP-9. Η MMP-2 εκφράζεται στους ινοβλάστες, αλλά όχι στα επιθηλιακά κύτταρα, πράγμα που δείχνει κυτταροειδικό τρόπο έκφρασης της. Επίσης η έκφραση της MMP-2 επάγεται θετικά από τον TGF-β σε αντίθεση με την MMP-9 της οποίας αναστέλλεται η έκφραση. Μια άλλη διαφορά όσον αφορά την ρύθμιση της έκφρασης της MMP-2 σε σχέση με την MMP-9 είναι ότι δεν φέρει στον υποκινητή της θέση πρόσδεση για τον παράγοντα AP-1<sup>7</sup>.

Η ενεργότητα των Μεταλλοπρωτεασών ελέγχεται όχι μόνο εξωκυτταρικά, αφού εκκρίνονται σε μη ενεργή μορφή και στην συνέχεια ενεργοποιούνται, αλλά και από τους φυσικούς τους αναστολείς (TIMPs)<sup>8</sup>. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά 4 μέλη στην ομάδα των αναστολέων, τα οποία προσδένονται και παρεμποδίζουν την λειτουργία των Μεταλλοπρωτεασών. Οι συνθετικοί αναστολείς, οι οποίοι παρασκευάζονται σήμερα, λειτουργούν όπως και οι φυσικοί αναστολείς στην παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων<sup>9</sup>. Τα υψηλά επίπεδα των Μεταλλοπρωτεασών έχουν συσχετισθεί με την διηθητική ικανότητα των κυττάρων<sup>10</sup>. Αυτό έχει μελετηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό όγκων και σε διάφορα είδη καρκίνου και έτσι χρησιμοποιούνται σε ορισμένες περιπτώσεις σαν δείκτες πρόγνωσης<sup>11</sup>. Η ενεργοποίηση των ενζύμων έχει άμεση επίδραση στην διηθητική ικανότητα των κυττάρων. Σήμερα είμαστε σε θέση να μετράμε την διηθητική δυναμική των καρκινικών κυττάρων στην βασική μεμβράνη με την ανάπτυξη προτύπων τεχνικών.

### Το μοντέλο πολυσταδιακής καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε το πρότυπο σύστημα πολυσταδιακής καρκινογένεσης της επιδερμίδας ποντικού. Το σύστημα αντιπροσωπεύεται από τα τρία διακριτά στάδια καρκινογένεσης (έναρξη, προαγωγή και εξέλιξη). Το μοντέλο έχει δημιουργηθεί από επάλειψη

της επιδερμίδας του ποντικού με το χημικό καρκινογόνο DMBA και τον προαγωγα της καρκινογένεσης TPA. Η δράση του DMBA ενοχοποιείται για την μετατροπή του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras* σε ογκογονίδιο, ύστερα από μετάλλαξη στο κωδικόνιο 61<sup>12</sup>. Ηεραϊτέρω γενετικές μεταβολές, όπως γονιδιακή επέκταση του ίδιου του γονιδίου *H-ras*, συμβάλλουν στην αλλαγή της ισορροπίας μεταξύ της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Ras. Η μετατόπιση της ισορροπίας υπέρ της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σχετίζεται με την ανάπτυξη θηλωμάτων και καρκινωμάτων με μεταστατική δυναμική. Επίσης σημαντικό ρόλο για την προαγωγή και την εξέλιξη των καρκινωμάτων στην επιδερμίδα του ποντικού παίζουν οι γενετικές αλλοιώσεις που υφίστανται τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *p53*, *Rb* και *p16*<sup>13</sup>. Για να μελετήσουμε την έκφραση των ζελατινών σε αυτό το σύστημα χρησιμοποιήσαμε πέντε αντιπροσωπευτικές κυτταρικές σειρές για τα διακριτά στάδια της καρκινογένεσης, οι οποίες είναι η C50 αθανатоποιημένη σειρά, η P1 με φαινότυπο θηλώματος, η B9 με πλακώδη φαινότυπο και οι A5 και CarB κυτταρικές σειρές με ατρακτοειδή φαινότυπο και μεταστατικό δυναμικό.

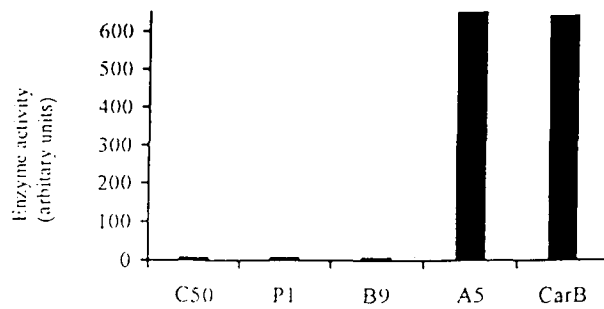
#### **Αυξημένη έκφραση της συνολικής και ενεργής πρωτεΐνης MMP-9 στα κύτταρα με ατρακτοειδή φαινότυπο**

Μελετήσαμε, τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο, τα ένζυμα MMP-2, και MMP-9 και τον αναστολέα TIMP-2, χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της ανοσοαποτύπωσης και του ζυμογράμματος. Σύμφωνα και με τις δυο μεθόδους τα επίπεδα της MMP-2 παραμένουν σταθερά σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ η MMP-9 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα στα κύτταρα A5 και CarB με ατρακτοειδή φαινότυπο. Ο αναστολέας TIMP-2 είναι ειδικός για την MMP-2 και τα επίπεδα του είναι αυξημένα στα κυτταρικές σειρές με ατρακτοειδή φαινότυπο, αποδεικνύοντας ότι προσδέεται στην μη ενεργή μορφή του ενζύμου και εμποδίζει την πρωτεολυτική του δράση. Παρόλο που οι δυο κυτταρικές σειρές B9 και A5 έχουν υψηλά επίπεδα ενεργού ογκογονιδίου *ras* σε σύγκριση με τις άλλες κυτταρικές σειρές, φαίνεται ότι η έκφραση της MMP-2 είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα του *ras* καθώς παραμένει σταθερή. Είναι φανερό ότι σε αυτό το *in vitro* σύστημα οι αλλαγές στην έκφραση της MMP-9 και του TIMP είναι αναγκαίες για την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Το ζυμόγραμμα είναι η τεχνική στην οποία χρησιμοποιείται η ζελατίνη ως υπόστρωμα αυτών των ενζύμων και έτσι μπορούμε να μελετήσουμε τα επίπεδα των MMP-2 και MMP-9, ύστερα από την ενεργοποίησή τους. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήσαμε το υπερκείμενο από τις 5 κυτταρικές σειρές και είδαμε μεγάλη διαφορά στην έκφραση των δυο ενζύμων. Η MMP-2 παραμένει σταθερή σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ η MMP-9 αυξάνεται σημαντικά στις κυτταρικές σειρές A5 και CarB με ατρακτοειδή φαινότυπο και μεταστατικό δυναμικό, σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα C50 (Σχήμα 1). Εφ' όσον παρατηρήσαμε αυτές τις μεταβολές στην έκφραση των δύο ενζύμων, θελήσαμε να μελετήσουμε την μεταγραφική ρύθμιση της MMP-9 μέσω του παράγοντα AP-1. Χρησιμοποιώντας την τεχνική κατακράτησης πρωτεϊνών και σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει την αλληλουχία πρόσδεσης του παράγοντα AP-1 από τον υποκινητή της MMP-9, παρατηρήσαμε ότι υπάρχει αυξημένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στις κυτταρικές σειρές με ατρακτοειδή φαινότυπο. Με τη μέθοδο της χλωροαμφενικολ-ακετυλ-τρανσφεράσης επιβεβαιώθηκε το παραπάνω αποτέλεσμα, αφού μετά από επιμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδιο που περιείχε την θέση πρόσδεσης AP-1, η ακετυλίωση της χλωροαμφενικόλης έφτανε το 95% στα κύτταρα με ατρακτοειδή φαινότυπο, σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα C50<sup>14</sup>.

#### **Συμπεράσματα**

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μεταβάλλεται η έκφραση των MMPs κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού. Οι Μεταλλοπρωτεάσες μπορούν να αποτελέσουν στόχο θεραπευτικής παράμβασης και γι' αυτό είναι σημαντική η κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησής τους *in vivo*. Οι αναστολείς των MMPs, οι οποίοι βρίσκονται σήμερα σε κλινικό στάδιο, θα είναι πολύ σημαντικοί για την πρεμπόδιση της διηθητικότητας των καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση της MMP-9 αυξάνεται

κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης σε αυτό το *in vitro* σύστημα από τα κύτταρα επιδερμίδας του ποντικού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την σημασία του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στη ρύθμιση της πρωτεΐνης MMP-9.



Σχήμα 1. Η έκφραση της ενεργής MMP-9 αυξάνεται σημαντικά στα κύτταρα με ατρακτοειδή φαινότυπο A5 και CarB σύμφωνα με το ζυμόγραμμα.

### Βιβλιογραφία

1. Nagase H and Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-4 (1999)
2. Massova I, Kotra LP, Fridman R and Mobashery R. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J* 12: 1075-95 (1998)
3. Sanchez-Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen O, Breathnach R and Werb Z. Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J Biol Chem* 268: 7238-47 (1993)
4. Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, Willenbrock F and Docherty AJ. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem* 269: 6632-6 (1994)
5. Chua CC, Geiman DE, Keller GH and Ladda RI. Induction of collagenase secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors. *J Biol Chem* 260: 5213-6 (1985)
6. Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8: 395-404 (1993)
7. Frisch SM and Morisaki JH. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol Cell Biol* 10: 6524-32 (1990)
8. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmor BL. Interaction of the 92kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267: 4583-91 (1992)
9. Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Angiogenesis* 1: 142-54 (1997)
10. Nakajima M, Welch D, Bellonni PN and Nicholson GL. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adeno-carcinoma cell clones of differing metastatic potential. *Cancer Res* 47: 4869-76 (1987)
11. Stetler-Stevenson WG, Hewitt R and Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion- from correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol* 7: 147-54 (1996)
12. Quantilla MS, Haddow D, Jones D, Jaffe GT, Bowden A and Balmain A. Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 12: 1875-81 (1991)
13. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R and Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumors of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6: 2363-9
14. Papatoma A, Zoumpourlis V, Balmain A and Pintzas A. The role of gelatinase B in progression of mouse skin carcinogenesis. Submitted

Από το Εργαστήριο Γονδιακής Ρύθμισης, Ινστιτ. Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών