

Rola proteaz w progresji nowotworów

Katarzyna Smolarczyk, Janusz Błasiak

Progresja nowotworów, prowadząca do ich inwazji i metastazy, jest procesem wieloczynnikowym, w którym komórki rakowe osiągają błonę podstawną, wydzielają enzymy proteolityczne (proteazy) i migrują do naczyń i węzłów chłonnych, które mogą opuścić w miejscach odległych od ogniska pierwotnego, tworząc przerzuty. Krytycznym etapem w progresji jest przekraczanie przez komórki rakowe granic pomiędzy tkankami – odróżnia to prawdziwe zezłośliwienie od przejściowych zaburzeń proliferacji komórek oraz nowotworów łagodnych. Podstawowe ograniczenia stanowią błona podstawna oraz macierz zewnątrzkomórkowa (ECM). Ich pokonanie umożliwia komórkom rakowym inwazję sąsiednich tkanek. Proces ten zachodzi przy udziale proteaz, przede wszystkim metaloproteaz, proteaz serynowych i katepsyn, syntetyzowanych przez komórki nowotworowe. Ze względu na rolę w progresji, proteazy mogą być celem terapii przeciwn przerzutowej.

The role of proteinases in cancer progression

Cancer progression, leading to the invasion and eventually to metastases, is a multifactorial process that includes adherence to basement membrane, secretion of proteolytic enzymes (proteinases) and cancer cell migration into vessels and lymphatic nodes, followed by extravasation at distant sites. The crossing of tissue boundaries by malignant cells is a critical step of the progression. This distinguishes proliferative disorders and in situ carcinomas from true malignancy. Basement membrane and extracellular matrix (ECM) are the two main boundaries and their breakdown facilitates the invasion of the cancer cells into the surrounding normal tissues. This process is mediated by the proteolytic enzymes (proteinases), mainly metalloproteinases, serine proteinases and cathepsins synthesized by cancer cells. These proteinases can be a target of anti-metastatic therapy due to their important role in cancer progression.

Słowa kluczowe: progresja nowotworów, inwazja, metastaza, proteazy, migracja komórek rakowych, metaloproteazy macierzowe, układ aktywacji plazminogenu, katepsyny

Key words: cancer progression, invasion, metastasis, proteinases, cancer cell migration, matrix metalloproteinases, plasminogen activator system, cathepsins

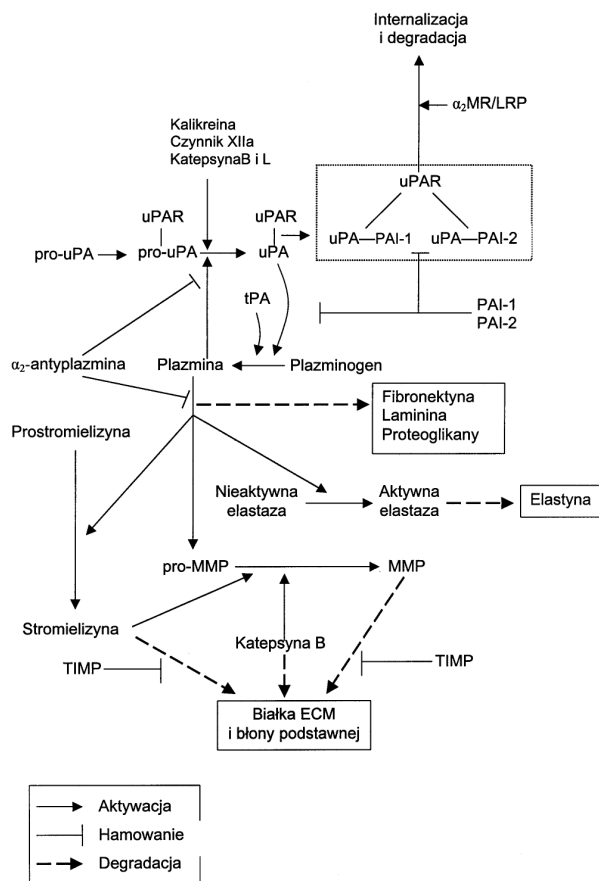
Komórki prawidłowe podlegają ścisłej regulacji proliferacji, pozwalającej na utrzymanie właściwych rozmiarów i odpowiedniej budowy organizmu. Komórki rakowe nie stosują się do tego schematu, realizując swój własny program reprodukcji. Nabywają zdolności do przemieszczania się: naciekają pobliskie tkanki oraz tworzą przerzuty w miejscach odległych od ogniska pierwotnego – są zdolne do progresji – inwazji i przerzutowania. Komórki nowotworowe w procesie progresji muszą pokonać wiele barier w postaci macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), błony podstawnej, ścian naczyń krwionośnych. W pierwszym etapie następuje odłączenie się komórek rakowych od ogniska pierwotnego i ich przejście przez błonę podstawną. Niektóre z komórek rakowych mogą przechodzić przez zewnętrzną błonę podstawną naczyń krwionośnych oraz wyścielającą je śródbłonek lub dostawać się do na-

czyn limfatycznych. Komórki nowotworowe mogą rozprzestrzeniać się w organizmie wraz z krwią. Muszą one pokonać te same przeszkody, przedostając się na zewnątrz naczyń, dokonując inwazji otaczającej je tkanki, gdzie tworzą wtórne ogniska nowotworowe. W procesach tych nieodzowne jest działanie enzymów proteolitycznych, proteaz, które biorą udział w trawieniu składników ECM i błony podstawnej. Proteazy odgrywają znaczącą rolę w morfogenezie, różnicowaniu, gojeniu ran, angiogenezie i ruchliwości komórek prawidłowych. Ich udział w tych procesach polega na trawieniu białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), prowadzącym do jej przebudowy. Początkowy etap tworzenia przerzutów – odrywanie się komórek rakowych od ogniska pierwotnego – wymaga zmniejszenia stopnia adhezji międzykomórkowej, co wiąże się ze zmianami właściwości ECM. Komórki rakowe muszą nabyć zdolności do adhezji i pokonywania barier, stwarzanych przez ECM, macierz i nabłonek naczyń. Zdolność ta jest nabywana także dzięki wytwarzaniu proteaz przez komórki rakowe. Proteazy mogą być wydziela-

ne na zewnątrz komórek nowotworowych albo mogą być związane z ich błoną plazmatyczną. Aktywność proteaz jest regulowana przez ich specyficzne inhibitory, zatem przebudowa ECM, niezbędna dla progresji nowotworów, jest dokonywana przez skoordynowane działanie proteaz i ich inhibitorów. Ekspresja proteaz może mieć miejsce zarówno w komórkach guza, jak i w komórkach stromy otaczającej guz. Wytwarzanie proteaz przez komórki stromy może być stymulowane przez komórki nowotworowe poprzez sekrecję cytokin [1] lub bezpośredni kontakt między komórkami [2].

Charakterystyka proteaz

W trawieniu ECM biorą udział głównie proteazy czterech klas (Tab. I), które degradują szereg różnych składników ECM, takich jak: fibronektyna, laminina, kolagen i proteoglikany [3]. Większość proteaz bezpośrednio degraduje składniki ECM, ale urokinazowy i tkankowy aktywator plazminogenu (uPA i tPA) działa w sposób pośredni – powoduje przekształcenie plazminogenu w aktywną proteolityczną plazminę. Enzym ten trawi ECM oraz aktywuje metaloproteazy. Większość proteaz jest wydzielana przez komórki w postaci nieaktywnych cząsteczek prekursorowych, których aktywacja zachodzi w wyniku trawienia proteolitycznego [3]. Funkcjonowanie proteaz jest uzależnione od równowagi pomiędzy nimi, a ich receptorami i inhibitorami. Rycina 1. przedstawia relacje między składnikami układów proteolitycznych. Niektóre enzymy działają niezależnie, ale najczęściej dochodzi do współdziałania systemów proteolitycznych, czego rezultatem jest kaskada zdarzeń, prowadząca do proteolizy [4].



Ryc. 1. Regulacja proteolizy zewnątrzkomórkowej. uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinaza); pro uPA – prourokinaza; uPAR – receptor urokinazy; PAI-1,2 – inhibitory aktywatorów plazminogenu typu 1, 2; tPA – tkankowy aktywator plazminogenu; MMP – metaloproteazy macierzowe; proMMP – prekursor metaloproteaz macierzowych; TIMP – tkankowe inhibitory metaloproteaz macierzowych; ECM – macierz zewnątrzkomórkowa

Tab. 1. Proteazy: podział i funkcje

Klasa proteaz	Składniki	Substraty
Proteazy serynowe	Plazmina	Składniki ECM
	Urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA)	Plazmina
	Tkankowy aktywator plazminogenu (tPA)	Plazmina
Metaloproteazy macierzowe (MMP)		
Kolagenazy	Kolagenaza śródmiąższowa (MMP-1) Kolagenaza neutrofilowa (MMP-8) Kolagenaza-3 (MMP-13)	Kolagen włókienkowy Kolagen włókienkowy Kolagen włókienkowy
Żelatynazy	Żelatynaza A (MMP-2) Żelatynaza B (MMP-9)	Kolagen typu I i IV, Żelatyna Kolagen typu IV i V, Żelatyna
Stromielizyny	Stromielizyna 1 (MMP-3) Stromielizyna 2 (MMP-10) Stromielizyna 3 (MMP-11) Matrylizyna (MMP-7)	Laminina, Fibronektyna, Proteoglikany, Kolagen typu IV Laminina, Fibronektyna, Proteoglikany, Kolagen typu IV Laminina, Fibronektyna, Proteoglikany, α 1-antytroipsyna Proteoglikany, Kolagen typu IV, Żelatyna, Glikoproteiny ECM, Elastyna
Elastazy	Metaloelastaza (MMP-12) MMP-19	Elastyna Elastyna
Transbłonowe MMP	MT1-MMP (MMP-14) MT2-MMP (MMP-15) MT3-MMP (MMP-16) MT4-MMP (MMP-17)	Zelatynaza A, Kolagen włókienkowy, Glikoproteiny ECM, Proteoglikany ? Zelatynaza A ?
Proteazy aspartylowe	Katepsyna D	Składniki ECM
Proteazy cysteinowe	Katepsyna B, L, H	Składniki ECM

Proteazy serynowe

Najważniejszą grupę proteaz serynowych stanowią białka urokinazowego i tkankowego układu aktywacji plazminogenu. Głównymi składnikami układu urokinazowego są: aktywator plazminogenu typu urokinazowego (uPA, urokinaza), jego receptor (uPAR) i inhibitory (PAI-1 i PAI-2). Urokinaza jest białkiem o masie cząsteczkowej 55 kDa, zawierającym 411 reszt aminokwasowych. Jest uwalniana przez komórki prawidłowe i nowotworowe, jako jednołańcuchowy zymogen (scuPA, pro-uPA, prourokinaza), wykazujący znacznie niższą aktywność proteolityczną niż uPA. Prourokinaza ulega transformacji proteolitycznej w miejscu Lys158-Ile159, przy udziale różnych czynników: plazminy, katepsyn B i L, kalikreiny, czynnika XIIa (Ryc. 1), co prowadzi do powstania aktywnej dwułańcuchowej formy uPA o dużej masie cząsteczkowej (HMW), zdolnej do przekształcania plazminogenu do plazminy. uPA jest zbudowany z 3 domen. Rejon C-końcowy stanowi domena o aktywności proteolitycznej (SPD, łańcuch B), środkowy – domena *kringle*, która może oddziaływać z anionowymi proteoglikanami i N-końcowy fragment o strukturze nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF), uczestniczący w wiązaniu z uPAR. Szkielet białkowy uPA może ulegać dalszemu trawieniu, w wyniku którego powstaje forma uPA o małej masie cząsteczkowej (LMW) oraz N-końcowy fragment ATF, zawierający domenę *kringle* i domenę EGF (łańcuch A).

uPAR jest powierzchniowym receptorem, wiążącym z dużym powinowactwem (5×10^{-10} M) uPA i skupiającym jego aktywność proteolityczną na powierzchni komórek. uPAR wykazuje wysokie powinowactwo do witronektyny, może także wiązać podjednostki integrynowe β_1 , β_2 , β_3 oraz integryny $\alpha_v\beta_5$ [5].

Aktywność proteolityczna uPA jest regulowana przez inhibitory aktywatorów plazminogenu PAI-1 i PAI-2. Inhibitory te zaliczane są do nadrodziny proteaz serynowych, *Serpin* [6]. PAI-1 jest glikoproteina o masie 50 kDa, syntetyzowaną głównie przez komórki śródbłonka, megakariocyty, komórki naczyń mięśni gładkich i komórki wątroby. Wytwarzają go także komórki nowotworowe. Znaczna część PAI-1 uwalniana jest z komórek śródbłonka do macierzy zewnątrzkomórkowej. We krwi PAI-1 znajduje się w ziarnistościach α płytek krwi w ilości 100-200 ng/ml krwi. Pozostała część występuje w osoczu – 5-20 ng/ml krwi. PAI-1 reguluje aktywność uPA poprzez tworzenie kompleksu kowalencyjnego enzym-inhibitor, przy czym hamowaniu podlega zarówno wolny uPA, jak i związany ze swoim receptorem – uPAR [7]. Kompleks uPAR/uPA/PAI-1 ulega endocytozie przy udziale receptora α_2 MR/LRP (*macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein*). uPA-PAI-1 jest trawiony w lizosomie, podczas gdy uPAR jest przenoszony na powrót na powierzchnię komórki, gdzie może przyłączać nową cząsteczkę uPA [8].

W regulacji syntezy i uwalniania składników urokinazowego układu aktywacji plazminogenu bierze udział wiele czynników. Głównie są to czynniki wzrostu, hormony, estry forbolu, endotoksyny oraz onkogeny [8].

Metaloproteazy macierzowe

Metaloproteazy należą do rodziny endopeptydaz, zależnych od jonów cynku i wapnia, trawiących składniki ECM i błony podstawnej w procesach fizjologicznych, takich jak embriogeneza i rozwój osobniczy, gojenie ran, menstruacja, owulacja [9, 10]. Wszystkie metaloproteazy zawierają domenę katalityczną, która zawiera dwie reszty cysteinowe, wiążące dwuwartościowy jon cynku, niezbędny dla aktywności proteolitycznej tych enzymów. Metaloproteazy wydzielane są z komórki w postaci zymogenów, zawierających na N-końcu domenę z konserwatywną sekwencją PRCGVDP. Fragment ten zawiera cysteinę, która może wytwarzać koordynacyjne wiązanie z atomem cynku, zakłócając w ten sposób aktywność enzymów [11]. Odcięcie tej domeny pozwala na przejście metaloproteaz z formy nieaktywnej w aktywną [12]. Metaloproteazy błonowe (MT-MMP) mają na C-końcu domenę transbłonową, warunkującą ich zakotwiczenie w błonie komórkowej oraz 10-aminokwasową domenę furynopodobną, występującą również w stromielizynie-3. Transbłonowa domena MT-MMP bierze udział w aktywacji prozelatyny A [13]. Metaloproteazy różnią się także występowaniem innych domen, które decydują o ich specyficzności substratowej. Specyficzność substratowa stała się ponadto podstawą do klasyfikacji metaloproteaz i ich podziału na grupy (Tab. I).

Transkrypcja genów MMP jest regulowana przez produkty protoonkogenów, hormony oraz czynniki angiogenne: interleukinę-1 β , czynnik wzrostu komórek śródbłonka, pochodzący z płytek (PDECGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), EGF, czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), czynnik wzrostu nowotworów β (TGF- β) [12]. Regulacja aktywności MMP zależy również od proteolitycznych przemian zymogenów w formy aktywne. Większość metaloproteaz jest aktywowana przez plazminę, a więc ich aktywacja zależy od układu aktywacji plazminogenu (Ryc. 1). Plazmina odcina 84-aminokwasowy fragment od N-końca utajonej formy stromielizyny-1, powodując jej aktywację oraz 81-aminokwasowy fragment nieaktywnej kolagenazy śródmiąższowej, przekształcając ją w częściowo aktywną kolagenazę. Staje się ona w pełni aktywna w wyniku dalszego trawienia przez stromielizynę-1, powodującą odcięcie 15 aminokwasów od C-końca [14]. Metaloproteazy błonowe aktywują żelatynazę A oraz kolagenazę 3 [15].

Aktywność MMP jest regulowana przez endogenne inhibitory metaloproteaz (TIMP). TIMP są wydzielane przez fibroblasty [14], komórki endotelialne [16], chondrocyty [17] i komórki mięśni gładkich [18]. Równowaga pomiędzy MMP i TIMP ma znaczenie dla procesów fizjologicznych i patologicznych. TIMP są białkami o małej masie cząsteczkowej, zawierającymi 12 reszt cysteinowych. Fragment N-końcowy bierze udział w hamowaniu, podczas gdy C-końiec wiąże się specyficznie z MMP [19]. Opisano 4 tkankowe inhibitory metaloproteaz. TIMP-1 jest białkiem o masie 28 kDa, które tworzy niekowalencyjne połączenie w stosunku 1:1 ze wszystkimi aktywnymi metaloproteazami, ale preferencyjnie z kolagenazą śród-

miąższową, stromielinazą-1 i żelatynazą A [20]. TIMP-2 (26 kDa) i TIMP-4 (23 kDa) tworzą kompleks 1:1 z żelatynazą A i prożelatynazą A [21, 22]. TIMP-3 (24 kDa) hamuje aktywność żelatynazy A i B, kolagenazy-1 i stromielizyny-1 [20].

Katepsyny

Katepsyny stanowią szeroką grupę lizosomalnych endopeptydaz, należących do proteaz aspartylowych (katepsyna D) oraz proteaz cysteinowych (katepsyny B, L i H). Katepsyna D jest proteazą o masie 52 kDa, działającą przy kwaśnym pH środowiska. Enzym ten jest aktywowany przez estrogeny [23]. Katepsyna D wydzielana jest z komórki w postaci nieaktywnej, a jej aktywacja zachodzi w wyniku enzymatycznego trawienia na dwa fragmenty o masie 34 kDa i 14 kDa, które funkcjonują w postaci dimeru [24]. Proteaza ta bierze udział w metabolizmie białek zewnątrzkomórkowych oraz w przekształcaniu proenzymów i prohormonów [25]. Katepsyna D aktywuje również katepsynę B, która bierze udział w kaskadzie enzymów proteolitycznych poprzez indukcję aktywności uPA [26].

Rola proteaz we wroście i angiogenezie nowotworów

Istotnym etapem w progresji nowotworów jest wytworzenie nowych naczyń krwionośnych, które poprzez transport substancji odżywczych i produktów przemian metabolicznych, umożliwiają szybki wzrost nowotworu. Angiogeneza zachodzi w wyniku oddziaływań elementów znajdujących się na powierzchni komórek śródbłonkowych ze składnikami ECM. W regulacji tych oddziaływań biorą udział proteazy, ich inhibitory i receptory. Komórki nowotworowe wydzielają proteazy zdolne do trawienia ECM i błony podstawnej, umożliwiające przemieszczanie się komórek śródbłonka, tworzących nowe naczynia. Plazmina i urokinaza aktywują wiele czynników angiogennych, w tym bFGF, naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF) i TGF- β , które z kolei stymulują proliferację komórek śródbłonka, a także stymulują ekspresję MMP i składników układu aktywacji plazminogenu [27]. W zmienionej nowotworowo tkance obserwuje się podwyższoną ekspresję PAI-1 i uPA, towarzyszącą wzrostowi poziomu VEGF [28]. Zwiększenie poziomu ekspresji uPA, żelatynazy A i B może być związane ze wzrostem stopnia unaczynienia guza sutka i płuc [29]. W nowotworach żołądka wykazano dodatnią korelację pomiędzy poziomem białek MT MMP-1 i MMP-2, a zaawansowaniem rozwoju sieci naczyń krwionośnych guza [30]. Proteazy uczestniczą we wroście guza, przekształcając nieaktywne zymogeny czynników wzrostu do postaci aktywnych, umożliwiając lepszy dostęp tych czynników do komórek nowotworowych w wyniku trawienia ECM lub poprzez stymulację komórek do podziałów. Urokinaza może bezpośrednio indukować proliferację komórek – ma mitogenny wpływ na komórki nabłonkowe nowotworu jajnika. Aktywność mitogenna jest zlokalizowana w aminoterminalnym fragmencie uPA [31]. Metalopro-

teazy mogą indukować podziały komórek nowotworowych, np. transfekcja komórek nowotworowych jelita grubego cDNA matrylizyny powoduje ich proliferację, bez zauważalnych zmian inwazyjności [32]. Nadmierna ekspresja inhibitorów metaloproteaz macierzowych: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4 może hamować wzrost guza, co może być związane z ograniczeniem aktywności metaloproteaz w tym procesie [33]. Z kolei obniżenie poziomu TIMP-1 może podnosić efektywność wzrostu i przerzutowania nowotworów [34].

Rola proteaz w migracji, inwazji i przerzutowaniu

Proteazy ułatwiają migrację komórek nowotworowych, prowadzącą do inwazji i tworzenia przerzutów. Proteazy serynowe aktywują MMP, prowadząc do degradacji ECM. uPA aktywuje plazminę, która bezpośrednio trawi składniki ECM. MMP są jedyną znaną rodziną enzymów proteolitycznych, trawiącą kolagen włóknikowy.

Zdolność do migracji komórek raka płuc dodatkowo koreluje ze wzrostem ekspresji uPA i uPAR, natomiast podwyższone poziomy PAI-1, PAI-2 i α_2 -antyplazminy obniżają zdolność do migracji i inwazyjność komórek nowotworowych [35, 36]. PAI-1 hamuje migrację poprzez hamowanie aktywności proteolitycznej uPA. PAI-1 może wpływać również na migrację na skutek blokowania wiązania uPAR/witronektyna oraz dzięki ochronie składników ECM przed proteolizą, niezbędną do migracji komórek. PAI-1 może więc indukować lub hamować migrację komórek w zależności od lokalnej ekspresji i stężenia oraz obecności innych składników urokinazowego układu aktywatorów plazminogenu [5]. Oprócz proteolizy ECM, uPA bierze udział w migracji komórek jako czynnik stymulujący. Domena *kringle* uPA może indukować migrację ludzkich komórek mięśni gładkich dróg oddechowych [37].

W wielu nowotworach złośliwych obserwuje się wzrost poziomu uPA, uPAR i PAI-1. Korelacja pomiędzy wartościami stężenia tych związków i występowaniem nowotworu pozwala na zastosowanie ich jako markerów diagnostycznych. Poziom uPA może być markerem w raku płuca, pęcherza moczowego, jelita grubego, szyjki macicy, jajnika, nerki, mózgu, prostaty, żołądka i innych [38]. Oprócz znaczenia diagnostycznego, poziom uPA może służyć do oceny stopnia zróżnicowania guza oraz stwierdzenia obecności przerzutów. Potwierdzają to wyniki badań, w których stwierdzono wyższy poziom uPA w rakach żołądka, dających przerzuty, niż w rakach bez przerzutów [39]. Guzy glejaka o wysokim stopniu zaawansowania (3 lub 4) wykazywały od czterech do pięciu razy większą zawartość urokinazy w porównaniu z guzami o mniejszym (2) stopniu zaawansowania [40]. Stwierdzono również wyższy poziom uPA u kobiet z nowotworem sutka i z przerzutami do węzłów chłonnych niż w przypadkach bez przerzutów [41]. Urokinaza może być użytecznym markerem prognostycznym raka sutka. Zaobserwowano, że wysoki poziom uPA korelował z krótszym czasem całkowitego przeżycia pacjentów z tym nowotworem [42]. 93% chorych na raka sutka z niskim poziomem uPA prze-

żywało 3 lata po zabiegu chirurgicznym bez objawów choroby, natomiast wśród chorych z wysokim poziomem uPA odsetek ten wynosił tylko 55% [43]. Wzrost aktywności PAI-1 koreluje z występowaniem wielu nowotworów: sutka, szyjki macicy, trzony macicy, jajnika, żołądka, okrężnicy, płuca, mózgu, nerki [38, 44]. Poziom PAI-1 może być również stosowany jako marker prognostyczny, pozwalający zaliczyć chorych do grupy wysokiego, bądź niskiego ryzyka, zależnie od jego poziomu we wczesnym stadium nowotworu [45]. Zmiany w biosyntezie PAI-1, spowodowane zmianami w transkrypcji genu, mogą zależeć od polimorfizmu insercyjno-delecyjnego 4G/5G ze względu na położenie w pozycji -675 obszaru promotorowego. Polimorfizm ten znajduje się w regionie rozpoznawanym przez czynniki wzmacniające lub hamujące ekspresję genu PAI-1. Dana wersja polimorficzna może wpływać na charakter oddziaływań regionu promotorowego z czynnikami transkrypcyjnymi, regulując ekspresję genu. Rezultaty badań nad nowotworami sutka i jelita grubego wskazują jednakże, iż polimorfizm 4G/5G genu PAI-1 może nie być bezpośrednio związany z rozwojem i progresją tych nowotworów [46, 44].

Wysoki poziom MMP obserwuje się w wielu nowotworach złośliwych: sutka [47], jajnika, tarczycy [48], prostaty [49], żołądka [50], okrężnicy [51]. Zmiana aktywności MMP może służyć jako wskaźnik różnicowania nowotworu. Stosunek żelatynazy A do prożelatynazy A wzrasta wraz ze wzrostem stopnia złośliwości raka sutka [52]. Tempo aktywacji prożelatynazy A jest znacznie większe u chorych na raka sutka z przerzutami do węzłów chłonnych [53]. MT1-MMP jest specyficznym aktywatorem prożelatynazy A w raku płuc [54]. Ekspresja obu genów zachodzi równocześnie, zwiększając tempo aktywacji prożelatynazy A, przyspieszając w ten sposób degradację ECM. Nie obserwuje się takiego związku pomiędzy żelatynazą A i MT1-MMP w prawidłowej tkance płuc [55]. W indukcji prożelatynazy A uczestniczą również integryny $\alpha_v\beta_3$ i ich receptory. Żelatynaza A, przyłączona do receptora integrynowego $\alpha_v\beta_3$ bezpośrednio na powierzchni komórki, skupia aktywność proteolityczną, prowadząc do degradacji ECM, co umożliwia inwazję komórek nowotworowych [56]. Niektóre białka ECM: laminina, fibronektyna, witronektyna, kolagen typu I i IV, stymulują chemotaksję [57]. Łączą one proces degradacji ECM z ruchliwością komórek. Żelatynaza A przyczynia się do migracji komórek raka sutka i jelita grubego, rozluźniając połączenia międzykomórkowe, jednocześnie komórki guza migrują za pośrednictwem receptorów integrynowych [58]. Kolagenaza-1, stromielizyna-1 i stromielizyna-3 są identyfikowane w raku płuc [59]. Stromielizyna-3 często ulega koekspresji z uPA. Fakt ten sugeruje współdziałanie obu białek w degradacji ECM: stromielizyna trawi α_2 -antytrypsynę, umożliwiając trawienie ECM przez uPA i inne proteazy [60]. Matrylizyna jest markerem stopnia złośliwości w nowotworach płuc i sutka – jej aktywność znacznie wzrasta przy przejściu nowotworu z formy łagodnej w złośliwą [61]. Wzrost ekspresji matrylizyny w komórkach guza wzmacnia ich inwazyjność i zdolność tworzenia przerzutów [61]. Stwierdzono, że wysoki po-

ziom białka MMP-7 ma związek z występowaniem przerzutów z guza żołądka do węzłów chłonnych i wątroby [62]. W analizach nowotworów jelita grubego wykazano dodatnią korelację między zwiększonym poziomem mRNA MMP-9, a wystąpieniem przerzutów odległych, krótszym czasem bez wznowy oraz krótszym okresem przeżycia [63]. Stwierdzono, że inwazyjny fenotyp nowotworów trzustki ma związek ze zwiększonym poziomem ekspresji MMP-2 [64]. W analizach nowotworów sutka stwierdzono wysoki poziom białka MMP-11, którego obecności nie wykazano w prawidłowym nabłonku gruczołowym sutka. W fibroblastach przylegających do komórek rakowych sutka obserwowano ekspresję MMP-11, indukowaną przez komórki nowotworowe. Wysoki poziom MMP-11 związany jest ze wzrostem złośliwości nowotworów sutka oraz z krótszym okresem bez nawrotów choroby [65].

Podwyższony poziom katepsyny D jest dodatnio skorelowany ze wzrostem stopnia złośliwości raka sutka i krtani. Jest także ważnym wskaźnikiem prognostycznym nawrotów choroby w tych nowotworach [25, 66]. W rakach żołądka i jelit funkcje czynników prognostycznych spełniają katepsyny B i E. Ich zwiększona ekspresja dodatkowo koreluje z procesami inwazji guza [67]. Katepsyna B wykazuje podwyższoną aktywność w procesach inwazji komórek rakowych trzustki [68]. Wykazano większą aktywność katepsyny B i L w komórkach nowotworowych jelita grubego niż w tkankach prawidłowych, co wskazuje na związek tego enzymu z rozwojem nowotworu [69].

Proteazy jako cel terapii przeciwnowotworowej

Obok zastosowania składników układu aktywacji plazminogenu i metaloproteaz w diagnostyce i prognozowaniu rozwoju chorób nowotworowych, mogą być one rozważane jako cel terapii przeciwnowotworowej. Ze względu na rolę, jaką odgrywają proteazy, terapia przeciwnowotworowa może być realizowana przez zastosowanie substancji hamujących ich aktywność proteolityczną lub zdolność wiązania z receptorami oraz przez modyfikację innych, poza proteolitycznymi, funkcji proteaz.

Hamowanie aktywności metaloproteaz przez syntetyczne inhibitory peptydowe i niepeptydowe jest obecnie stosowane w terapii mającej na celu ograniczenie progresji nowotworów. Batimastat jest hydroksyaminowym analogiem kolagenu, powszechnie stosowanym jako inhibitor metaloproteaz. W eksperymentach na zwierzętach stwierdzono spowolnienie tempa wzrostu guzów, lokalnej proteolizy, inwazji i przerzutowania [70]. Batimastat powoduje również *in vitro* zmniejszenie stopnia degradacji ECM i inwazji komórek nabłonkowych [71]. Lek ten może być również stosowany w zaawansowanych guzach litych; w nowotworach jajników obserwowano zmniejszenie masy guza nawet o 90% oraz siedmiokrotne przedłużenie okresu przeżycia w porównaniu z grupą kontrolną [72]. Podawanie batimastatu w nowotworach sutka powodowało zmniejszenie częstości przerzutów do płuc [73]. Rozpuszczalnym odpowiednikiem batimastatu jest marimastat, stosowany w terapii nowotworów sutka, jajni-

ka, mózgu, płuca, trzustki [74]. Stosowany w badaniach na zwierzętach marimastat powodował spowolnienie wzrostu guza płuca i sutka [75]. CT-1746 jest specyficznym inhibitorem żelatynazy, redukującym zdolność tworzenia przerzutów i przekształcania guza jelita grubego w formę złośliwą u myszy. Inhibitor ten wykazuje większą efektywność przy równoczesnym zastosowaniu cyklofosfamidu [76]. Prowadzone są również badania z zastosowaniem oligonukleotydów antysensownych dla genów metaloproteaz. W badaniach z użyciem komórek raka jelita grubego zastosowanie antysensownych oligonukleotydów, specyficznych dla genu matrilizyny, powodowało ograniczenie o 70% liczby przerzutów do wątroby [77]. W komórkach czerniaka, transfekowanych plazmidem zdolnym do ekspresji antysensownego transkryptu 777 pz, komplementarnego do genu *MMP-1*, stwierdzono znaczący spadek inwazyjności [78]. Transfer genu *TIMP-2* z użyciem adenowirusa do hepatocytów myszy z wszczepionymi komórkami raka jelita grubego zredukował o 95% liczbę przerzutów do wątroby i ograniczył o 77% wzrost wtórnych ognisk nowotworowych w wątrobie [79].

Prace z zastosowaniem terapii genowej dotyczą również składników układu aktywacji plazminogenu. Transfer cDNA PAI-1 do komórek czerniaka myszy przy użyciu adenowirusa powodował zmniejszenie o połowę liczby zwierząt, u których następował wzrost przerzutów w wątrobie. U myszy z rozwiniętymi ogniskami przerzutowymi w 78% obserwowano zahamowanie dalszego ich wzrostu [80]. Stosując antysensowne oligonukleotydy dla genu *uPAR*, osiągnięto całkowite zahamowanie inwazyjności fibroblastów transformowanych wirusem SV40 [81]. Transfekcja ludzkich komórek rakowych rekombinacyjnym DNA, kodującym antysensowny fragment komplementarny do 300 zasad na końcu 3' genu *uPAR*, powodowała znaczące zmniejszenie inwazyjności badanych komórek [81].

Przy stosowaniu terapii genowej, skierowanej na metaloproteazy lub składniki aktywacji plazminogenu, należy pamiętać, że hamowanie składników tylko jednego układu może nie przynieść oczekiwanych efektów w hamowaniu progresji, gdyż funkcje proteolityczne wyłączono białka mogą być przejęte przez białka innego układu.

Poznanie mechanizmów leżących u podstaw progresji nowotworów może mieć duże znaczenie w prognozowaniu przebiegu choroby oraz określeniu rodzaju terapii. Rola proteaz w progresji nie podlega dyskusji i jest ona również znacząca w docelowej metastazie, mogącej zachodzić przy udziale chemokin [82, 83].

Doc. dr hab. Janusz Błasiak
Katedra Genetyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź
e-mail janusz.b@biol.uni.lodz.pl

Piśmiennictwo

- MacDougall JR, Matrisian LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 351-362.
- Hewitt R, Dano K. Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease system in human cancer. *Enzyme Protein* 1996; 49: 163-173.
- Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-195.
- DeClerk YA, Laug WE. Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein* 1996; 49: 72-84.
- Andreassen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *CMLS* 2000; 57: 25-40.
- Kawano T, Morimoto K, Uemura Y. Partial purification and properties of urokinase inhibitor from human placenta. *J Biochem (Tokyo)* 1970; 67: 333-342.
- Smolarz B, Błasiak J. Rola inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 w progresji raka piersi. *Nowotwory* 1999; 49: 323-328.
- Andreassen PA, Kjoller L, Christensen L. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22.
- Salamonsen LA, Woolley DE. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod* 1996; 11:124-133.
- Tsafirri A. Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* 1996; 377: 121-140.
- Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principal regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5578-5582.
- Birkedal-Hansen H, Moor WG, Bodden MK i wsp. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4: 197-250.
- He C, Wilhelm SM, Pentland AP i wsp. Tissue co-operation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 2632-2636.
- Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ i wsp. Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int* 1993; 43: 163-170.
- Polette M, Birembaut P. Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1195-202.
- Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 1983; 258: 12252-12258.
- Gavrilovic J, Hembry RM, Reynolds JJ i wsp. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) regulates extracellular type I collagen degradation by chondrocytes and endothelial cells. *J Cell Sci* 1987; 87: 357-362.
- DeClerk YA. Purification and characterization of a collagenase inhibitor produced by bovin vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 1988; 265: 28-37.
- Leco KJ, Khokha R, Pavloff N i wsp. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse and tissue. *J Biol Chem* 1994; 269: 935293-60.
- Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-3) and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 1995; 270: 14313-14318.
- Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem* 1991; 266: 13070-13075.
- Leco KJ, Apte SS, Taniguchi GT i wsp. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissue. *FEBS Lett* 1997; 401: 213-217.
- Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast carcinoma cell lines. *Cell* 1980; 20: 353-362.
- Capony F, Rougeot C, Montcourrier P i wsp. Increased secretion, altered processing and glycosylation of procathepsin D in mammary carcinoma cells. *Carcinoma Res* 1989; 49: 3904-3909.
- Schwartz MK. Tissue cathepsins as tumor markers. *Clin Chim Acta* 1995; 237: 67-78.
- Schmitt M, Jönicke F, Graeff H. Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* 1992; 6: 3-26.
- Smolarz B, Błasiak J, Kulig A. Rola urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w angiogenezie. *Postępy Biochemii* 2000; 46: 261-270.
- Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppi JM. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low- risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3129-3136.
- Moses MA. The regulation of neovascular of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1991; 15: 180-189.
- Nomura H, Sato H, Seiki M. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 3263-3266.

31. Fishman DA, Kearns A, Larsh S i wsp. Autocrine regulation of growth stimulation in human epithelial ovarian carcinoma by serine-proteinase-catalysed release of the urinary-type-plasminogen-activator N-terminal fragment. *Biochem J* 1999; 341: 765-769.
32. Witty JP, McDonnel S, Newell K i wsp. Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affect tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 1994; 54: 4805-4812.
33. Khokha R, Zimmer MJ, Wilson SM i wsp. Up-regulation of TIMP-1 expression in B16-F10 melanoma cells suppresses their metastatic ability in chick embryo. *Clin Exp Metastasis* 1992; 32: 365-370.
34. Montgomery AM, Mueller BM, Reisfield RA i wsp. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res* 1994; 54: 5467-5473.
35. Liu G, Shuma MA, Cohen RL. Coexpression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cell. *Int J Cancer* 1992; 60: 501-506.
36. Schlechte W, Brattain M, Boyd D. Invasion of extracellular matrix by cultured colon cancer cells: dependence on urokinase receptor display. *Cancer Common* 1990; 2: 173-179.
37. Mukhina S, Stepanova V, Traktouev D i wsp. The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cell is dependent on its kringle domain. *J Biol Chem* 2000; 275: 16450-16458.
38. Błasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D. Urokinazowy układ aktywacji plazminogenu i jego znaczenie w progresji nowotworów. *Postępy Biochemii* 1999; 45: 42-49.
39. Plebani M, Herszenyi L, Cardin R i wsp. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 76: 367-375.
40. Hsu DW, Efidr JT, Hedley-White ET. Prognostic role of urokinase-type plasminogen activator in human gliomas. *Am J Pathol* 1995; 147: 114-123.
41. Grondahl-Hansen, Hilsenbeck SG, Christensen IJ i wsp. Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 43: 153-163.
42. Duffy MJ. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 613-618.
43. Janicke F, Schmitt M, Pache L i wsp. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 195-208.
44. Błasiak J, Smolarz B, Kubryn I i wsp. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) level and 4G/5G genetic polymorphism in patients with colorectal cancer. *Exp Onk* 2000; 22: 48-51.
45. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C i wsp. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 1997; 78: 285-296.
46. Błasiak J, Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *ABP* 2000; 47: 191-199.
47. Basset P, Bellocq JP, Wolf C i wsp. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699-704.
48. Sato H, Kida Y, Mai M i wsp. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 1992; 7: 77-83.
49. Boag AH, Young ID. Increased expression of the 72-kd type IV collagenase in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in-situ hybridization. *Am J Pathol* 1994; 144: 585-91.
50. Nomura H, Sato H, Seiki M i wsp. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 3263-3266.
51. Tomita T, Iwata K. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colonic adenomas-adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 1255-1264.
52. Davies M, Miles DW, Happerfield MLC i wsp. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1993; 67: 1126-1131.
53. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H i wsp. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jap J Cancer Res* 1996; 87: 602-611.
54. Tokaraku M, Sato H, Murakami S i wsp. Activation of the precursors of gelatinase A/72kDa type IV collagenase/ MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 1995; 64: 335-339.
55. Nawrocki B, Polette M, Marchand V i wsp. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *Int J Cancer* 1997; 72: 556-564.
56. Brooks PC, Strombland S, Sanders LC i wsp. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_3\beta_3$. *Cells* 1996; 85: 683-693.
57. Klominek J, Robert KH, Sundquist KG. Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res* 1993; 53: 4376-4382.
58. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J i wsp. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1990; 136: 585-592.
59. Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A i wsp. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 1992; 66: 1188-1194.
60. Bolon I, Devouassoux M, Robert C i wsp. Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin-1, stromelysin-3 and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 1997; 150: 1619-1629.
61. Powell WC, Knox JD, Navre M i wsp. Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 1993; 53: 417-422.
62. Sier CFM, Kubben FJGM, Ganesh S. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 413-417.
63. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AN i wsp. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 1996; 14: 3133-3140.
64. Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J i wsp. Expression of collagenase (MMP2), stromelysin (MMP3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases (TIMP1) in pancreatic and ampullary disease. *Br J Cancer* 1996; 73: 972-978.
65. Basset P, Bellocq JP, Wolf C. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699-704.
66. Maurizi M, Almadori G, Cadoni G i wsp. Cathepsin D concentration in primary laryngeal carcinoma: correlation with clinicopathological parameters, EGFR status and prognosis. *Int J Cancer* 1996; 69: 105-109.
67. Saku T, Sakai H, Tsuda N i wsp. Cathepsin D and E in normal, metaplastic, dysplastic, and carcinomatous gastric tissue: an immunohistochemical study. *Gut* 1990; 31: 1250-1255.
68. Ohta T, Terada T, Nagakawa T i wsp. Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. *Br J Cancer* 1994; 69: 152-156.
69. Shuja S, Sheahan K, Murmane MJ. Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissue, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1991; 49: 341-346.
70. Eccles SA., Box GM, Court EJ i wsp. Control of lymphatic and haematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). *Cancer Res* 1996; 54: 4726-4728.
71. Brown PD, Giavazzi R. Matrix metalloproteinases inhibition: a review of anti-tumor activity. *Ann Onc* 1995; 6: 967-974.
72. Davies B, Brown PD, East N. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 1993; 93: 2087-2091.
73. Sledge GWJ, Qulali M, Goulet R. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1546-1550.
74. Heath EI, Grochow LB. Clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Drugs* 2000; 59: 1043-1055.
75. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RM, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997; 15: 61-75.
76. An Z, Wang X, Willmott N i wsp. An orally-active synthetic MMP inhibitor CT1746 reduces tumor spread and metastasis converting aggressive colonic cancer into a more indolent disease in a nude-mice model. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 184-195.
77. Hasegawa S, Koshikawa N, Momiyama i wsp. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissue, leukocytes and neurons in human and mouse. *Int J Cancer* 1998; 76: 812-816.
78. Durko M, Navab R, Shibata HR i wsp. Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1356: 271-280.
79. Brand K, Baker AH, Perez-Canto A i wsp. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 into the liver tissue. *Cancer Res* 2000; 60: 5723-5730.
80. Ma D, Gerard RD, Li X. Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in an athymic mouse model. *Blood* 1997; 90: 2738-2746.
81. Lund LR. Expression of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and type-1 plasminogen activator inhibitor is differently regulated by inhibitors of protein synthesis in human cancer cell lines. *FEBS Lett* 1996; 383: 139-144.

82. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E i wsp. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for the activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992; 11: 4825-4833.
83. Liota LA. Cancer: an attractive force in metastasis. *Nature* 2001; 410: 24-25.
84. Muller A, Homey B, Soto H I wsp., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56.

Otrzymano: 21 marca 2001 r.

Przyjęto do druku: 7 maja 2001 r.