

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA

**Expressió diferencial determinant del fenotip
metastàtic en un model d'adenocarcinoma de pulmó
humà**

Mireia Martín Satué

Barcelona 2000

INTRODUCCIÓ

CÀNCER DE PULMÓ

El càncer de pulmó constitueix la causa més comú de mort per càncer en els països occidentals. A Catalunya, el càncer de pulmó és un dels més freqüents en els homes, amb un 18.3% de tots els casos, i comporta el 26.8% del total de morts per càncer, nivells que són semblants als de la resta de la Comunitat Europea (Borràs *et al.*, 1997).

A nivell clínic, els carcinomes de pulmó es tipifiquen com a carcinomes de cèl·lules petites (SCLC de l'anglès *small cell lung cancer*), que representen el 20% del total, i carcinomes de cèl·lules no petites (NSCLC-*non small cell lung cancer*) i es diferencien segons la seva etiologia, prognosi i teràpies emprades pel seu tractament. Els de cèl·lula no petita inclouen els carcinomes escamosos (30-40%), adenocarcinomes (30-40%), carcinomes de cèl·lules grans (5%) i d'altres tipus histològics menys freqüents (5%) (Schiller, 1998).

Els SCLCs tenen característiques de cèl·lules neuroendocrines, metastatitzen amb bastanta rapidesa i són molt sensibles a la quimioteràpia i radioteràpia, a diferència dels NSCLCs que són mancats d'aquelles característiques i la seva evolució clínica és més lenta (Sekido *et al.*, 1998).

Mentre que els carcinomes de cèl·lula escamosa s'originen als bronquis principals a partir de cèl·lules escamoses metaplàstiques, els carcinomes indiferenciats de cèl·lula gran representarien versions indiferenciades d'altres formes de càncer, especialment adenocarcinoma.

Els adenocarcinomes s'originen a partir de l'epiteli glandular de les vies aèries perifèriques, com bronquíols i alvèols. Sovint presenten marcadors bioquímics i ultraestructurals de les cèl·lules de Clara o de les cèl·lules de tipus II, essent la secreció de mucines una característica comú a tots els tipus d'adenocarcinoma (Sekido *et al.*, 1998). Inufusa i cols. (1991) van establir varies línies cel·lulars a partir d'una línia original d'adenocarcinoma de pulmó humà, KUM-LK-2 (Inufusa, 1988), que produïa metàstasis pulmonars espontànies quan era injectada subcutàniament a ratolins immunodeprimits. Aquestes sublínies varen ser obtingudes mitjançant clonatge per dilució límit i classificades segons el seu potencial colonitzador de pulmó en ser inoculades intravenosament a ratolins immunodeprimits. Així, dues d'aquestes línies cel·lulars, HAL-8, amb un elevat potencial colonitzador de pulmó, i HAL-24, amb nul·la capacitat colonitzadora, centren l'interès del present treball.

METÀSTASI

És la colonització per les cèl·lules d'un focus neoplàsic primari de punts aliens del mateix organisme i el seu creixement en aquesta nova localització. Aquest procés patològic constitueix la principal causa de mort en els pacients oncològics (Fidler, 1990).

La metàstasi es desenvolupa a través d'etapes seqüencials i selectives, essent cadascuna d'elles, per sí mateixa, limitant del procés. Així, després d'una *transformació inicial*, té lloc el *creixement de les cèl·lules neoplàsiques* del tumor primari i la *neovascularització* del mateix a partir de la circulació marginal. L'*adquisició del fenotip metastàtic* per part d'algunes d'aquestes cèl·lules tumorals, pot seguir-se de la *intravassació* de les mateixes a la circulació sanguínia, limfàtica, o, alternativament, de la *invasió* de l'estroma de l'hoste. L'*adhesió* de les cèl·lules tumorals circulants a l'endoteli facilita l'*extravasació* o sortida de les mateixes de la circulació cap a l'òrgan diana. El creixement d'aquestes cèl·lules en el parènquima de l'esmentat òrgan completa el procés de formació de la metàstasi. A partir d'aquí pot repetir-se el procés i donar lloc a metàstasi de metàstasi (Fidler, 1990).

Patrons de distribució de les metàstasis

El patró de distribució de les metàstasis hematògenes segueix, en part, el patró de distribució del drenatge venós. Així, nombroses metàstasis es desenvolupen en la primera xarxa capil·lar per la que circulen les cèl·lules un cop han abandonat el tumor. Malgrat això, en bona part dels casos existeix una distribució selectiva de les cèl·lules tumorals cap a òrgans específics (*homing*). Per tal d'explicar aquest fenomen de direccionalitat s'han proposat tres mecanismes principals (Woodhouse *et al.*, 1997): i) *creixement selectiu* pel qual les cèl·lules tumorals s'extravassen ubiqüament però només creixen de forma selectiva als òrgans que tenen l'entorn adequat; ii) *adhesió selectiva* als capil·lars de l'òrgan diana o iii) *quimiotaxi selectiva* de les cèl·lules tumorals circulants als òrgans productors de quimioquines específiques.

Fenòmens endotelials a la inflamació com a model de migració transendotelial

En general, es considera que les metàstasis per via hemàtica o limfàtica presenten moltes semblances amb la migració transendotelial dels leucòcits als llocs d'inflamació (Kannagi, 1997; McEver, 1997; Woodhouse *et al.*, 1997).

La inflamació és una resposta del teixit conjuntiu front l'acció d'agents de lesió que inclou canvis a l'endoteli local afavoridors de la migració transendotelial de cèl·lules circulants. Imhof *et al.* (1997) descriuen un model inflamatori segons el qual té lloc un contacte inicial i *ancorament* dels leucòcits a les cèl·lules endotelials facilitat per interaccions entre selectines i els seus lligands. Aquesta adhesió és ràpida però inestable, la qual cosa permet el *rodament* dels leucòcits per la paret de les vècules postcapilars. Les quimioquines expressades localment activen les integrines leucocitàries que, interaccionant amb els seus contrarreceptors, donen lloc a una *adhesió estable* a l'endoteli i dirigeixen la migració dels leucòcits als teixits propers. Finalment, els leucòcits degraden parcialment els diferents components de la matriu mitjançant enzims proteolítics fonamentalment del tipus

metal·loproteases de matriu, facilitant la migració transendotelial i el seu desplaçament per l'estroma.

SELECTINES

Estructura i tipus

Les selectines són una família de tres molècules d'adhesió (E-, P- i L-selectina) mitjanceres de l'adhesió inicial dels leucòcits a l'endoteli. Presenten un domini amino-terminal homòleg a les lectines depenents de calci, una regió similar al factor de creixement epidèrmic, una sèrie de repeticions consens curtes d'uns seixanta aminoàcids cadascuna, un domini transmembrana i una curta cua citoplasmàtica (Bevilacqua & Nelson, 1993; Varki, 1994). El terme selectina es va proposar pel domini amino terminal lectina i per indicar la funció i l'expressió selectives d'aquestes molècules, estandaritzant-se per a designar cadascun dels membres de la família segons el tipus cel·lular en què va ser identificat: L-selectina (limfòcits), E-selectina (endoteli) i P-selectina (plaquetes) (Bevilacqua *et al.*, 1991).

L'L-selectina s'expressa de forma constitutiva a la majoria dels leucòcits i interacciona amb lligands presents tant a les cèl·lules endotelials com a d'altres leucòcits (Gallatin *et al.*, 1983; Lewinsohn *et al.*, 1987). L'E-selectina s'expressa transitòriament a la membrana de les cèl·lules endotelials activades per citoquines inflammatòries com IL-1 β o TNF α (Bevilacqua *et al.*, 1989). La P-selectina es troba emmagatzemada als grànuls α de les plaquetes (Hsu-Lin *et al.*, 1984; Stenberg *et al.*, 1985) i als cossos de Weibel-Palade de les cèl·lules endotelials vasculares (Bonfanti *et al.*, 1989; McEver *et al.*, 1989) des d'on es mobilitza a la superfície cel·lular en resposta a estímuls com la trombina i la histamina.

Lligands

Les selectines reconeixen oligosacàrids sialilats i fucosilats del tipus sialil-Lewis^x (sialil-Le^x; Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4[Fuc α 1,3]GlcNAc-R) o sialil-Lewis^a (sialil-Le^a; Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3[Fuc α 1,4]GlcNAc-R) que es troben formant part de glicolípidis i glicoproteïnes presents a diversos tipus cel·lulars com els leucòcits, algunes cèl·lules tumorals i algun tipus de cèl·lula endotelial (Foxall *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1999).

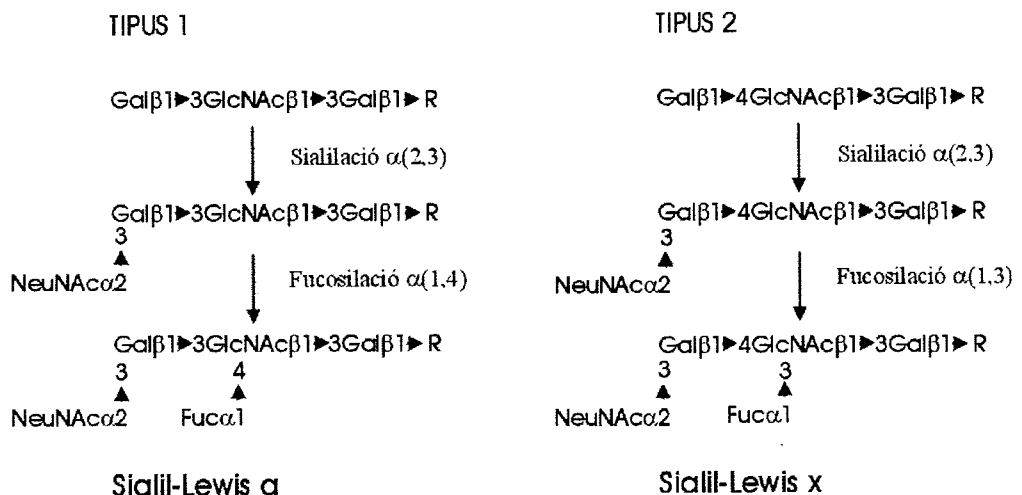
Els neutròfils, els monòcits i alguns limfòcits T expressen sialil-Le^x (Fukuda *et al.*, 1984; Mizoguchi *et al.*, 1984), que juga un paper clau en el reclutament dels leucòcits en els llocs d'inflamació. L'E- i la P-selectines expressades per les cèl·lules endotelials activades interaccionen amb aquests leucòcits com a pas previ a l'extravassació (Lowe, 1994; Rosen & Bertozzi, 1996). Quan els limfòcits han de recircular desde la microvasculatura al compartiment limfàtic, els limfòcits circulants s'adhereixen a les vènules d'endoteli cúbic mitjançant la unió de l'L-selectina dels limfòcits al sialil-Le^x present a

receptors de les esmentades vènules (Imai *et al.*, 1993; Tsuboi & Fukuda, 1997).

Les cèl·lules tumorals poden expressar oligosacàrids contrarreceptors per les selectines facilitant l'adhesió a l'endoteli durant el procés metastàtic. Així, determinats tipus cel·lulars tumorals presenten nivells incrementats de sialil-Le^x (Fukuda *et al.*, 1985; Fukushima *et al.*, 1984; Saitoh *et al.*, 1992; Shimodaira *et al.*, 1997) i, sovint també, de sialil-Le^a (Itzkowitz *et al.*, 1988; Magnani *et al.*, 1982). El grup sialil-Le^x s'expressa preferentment a càncers de pulmó, ovari, fetge i mama mentre que l'antigen sialil-Le^a predomina a càncers del tracte biliar, pàncrees i còlon. Ambdós oligosacàrids han estat emprats com a marcadors sèrics en el diagnòstic del càncer (Itai *et al.*, 1991; Kannagi *et al.*, 1986; Kannagi *et al.*, 1988; Miyake *et al.*, 1988; Zenita *et al.*, 1988), donat que s'ha correlacionat l'expressió incrementada d'aquests oligosacàrids amb un pitjor pronòstic a pacients amb determinants tipus de càncer.

Síntesi dels lligands. Les Fucosiltransferases

La síntesi d'aquests glicans fucosilats és depenent d'un grup de glicosiltransferases que actuen seqüencialment sobre un nucli lactosaminat de tipus 1 (Gal β 1-3GlcNAc-R) o de tipus 2 (Gal β 1-4GlcNAc-R). L'última etapa de la síntesi d'aquests oligosacàrids és dirigida per les Fucosiltransferases (Fuc-T) de tipus α (1,3) o α (1,4). Les Fuc-T del tipus α (1,3) transfereixen un residu fucosa d'una fucosa-guanosina difosfat (Fuc-GDP) a un grup N-acetilglucosamina d'una cadena de tipus 2 mitjançant un enllaç α (1,3), originant les molècules del tipus Le^x. De forma similar les Fuc-T de tipus α (1,4) transfereixen el residu fucosil a una cadena de tipus 1 mitjançant un enllaç α (1,4), donant lloc a les molècules Le^a. Si prèviament té lloc una sialilació les molècules resultants seran sialil-Le^x i sialil-Le^a respectivament (Hakomori, 1989).



De la mateixa manera, si la cadena és elongada inicialment, la sialilació i fucosilació en tàndem originarà molècules del tipus sialil-Le^x dimèric o trimèric. Actualment existeixen sis Fuc-T del tipus $\alpha(1,3)$ els gens de les quals han estat clonats i caracteritzats [Fuc-TIII (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990), Fuc-TIV (Goelz *et al.*, 1990; Lowe *et al.*, 1991), Fuc-TV (Weston *et al.*, 1992a), Fuc-TVI (Weston *et al.*, 1992b), Fuc-TVII (Natsuka *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994) i Fuc-TIX (Kaneko *et al.*, 1999a)]. Totes sis actuen sobre acceptors de tipus 2 i generen, per tant, molècules del tipus Le^x. Únicament la Fuc-TIII, denominada enzim de tipus Lewis, té, a més, activitat $\alpha(1,4)$, essent l'única capaç de reconèixer substrats de tipus 1 i, per tant, l'única que pot donar lloc a molècules del tipus Le^a. Estudis en els quals s'han transfectat els cDNAs de les diferents Fuc-T de tipus $\alpha(1,3)$ en diversos tipus cel·lulars, indiquen que, amb l'excepció de Fuc-TIX, la resta d'enzims és capaç de sintetitzar el determinant sialil-Le^x tot i que el paper de la Fuc-TIV, enzim de tipus mieloid, en aquesta síntesi es limita a algun tipus cel·lular (Goelz *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1999a). Tant Fuc-TV com Fuc-TVI, anomenada enzim plasmàtic, tenen capacitat per sintetitzar Le^x i sialil-Le^x (Weston *et al.*, 1992a; Weston *et al.*, 1992b). Fuc-TVII, expressat a leucòcits, és singular en quant a que és l'única que només sintetitza sialil-Le^x (Natsuka *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994). Fuc-TIX sembla estar implicada en la síntesi de Le^x (Kaneko *et al.*, 1999a).

Els gens per a la Fuc-TIII, -V i -VI es localitzen en el cromosoma 19, trobant-se molt propers el -III i el -VI (Nishihara *et al.*, 1993). Aquests tres gens presenten gran similitud de seqüència sobretot a la regió corresponent al domini catalític carboxi terminal de la proteïna, on l'identitat supera el 91% (Narimatsu, 1994). El gen *Fuc-TIV* es localitza en el cromosoma 11, *Fuc-TVII* en el 9 (Reguigne-Arnould *et al.*, 1996) i *Fuc-TIX* en el 6 (Kaneko *et al.*, 1999b).

Expressió de les Fucosiltransferases

Tant *Fuc-TIII* com *Fuc-TVI* presenten una expressió elevada a nombrosos teixits com còlon, estómac, budell prim, pulmó, ronyó i úter. Per contra, *Fuc-TV* presenta una expressió menor i restringida a fetge, còlon i testicle. Tots tres transcrits pateixen modificacions post-transcripcionals específiques de teixit (Cameron *et al.*, 1995). Tant *Fuc-TIV* com *Fuc-TVII* s'expressen a leucòcits (Lowe *et al.*, 1991; Natsuka *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994). *Fuc-TIX* s'expressa a cervell, estómac, melsa i leucòcits (Kaneko *et al.*, 1999a).

Fucosiltransferases i càncer

S'ha relacionat l'expressió de *Fuc-Ts* amb el desenvolupament de tipus de càncer com leucèmies (Yago *et al.*, 1993), adenocarcinoma de còlon (Majuri *et al.*, 1995) o gastrointestinal (Wittig *et al.*, 1996), detectant-se una expressió incrementada d'un o més

d'un d'aquests gens en relació al teixit normal. Tanmateix és freqüent un increment de l'activitat fucosiltransferasa sèrica a pacients amb càncer (Chandrasekaran *et al.*, 1992; Hutchinson *et al.*, 1991; Itzkowitz *et al.*, 1990; Kessel *et al.*, 1977; Orntoft *et al.*, 1991; Ronquist & Nou, 1983; Thompson *et al.*, 1992; Yazawa *et al.*, 1988; Yazawa *et al.*, 1986), relacionant-se l'increment d'aquests nivells amb un pitjor pronòstic (Asao *et al.*, 1989; Bauer *et al.*, 1978; Yazawa *et al.*, 1989).

Inicialment es va relacionar l'expressió dels gens *Fuc-TIV* i *Fuc-TVII* amb un mal pronòstic del càncer de pulmó (Ogawa *et al.*, 1996) però estudis més recents han posat de manifest el paper de *Fuc-TVII* com el principal indicador d'un pitjor pronòstic donada la seva participació en la síntesi de sialil-Lewis^x (Martin-Satue *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1997)

INTEGRINES

Estructura i tipus

Les integrines constitueixen una família de molècules d'adhesió que participa tant a l'adhesió cèl·lula-matriu com a l'adhesió cèl·lula-cèl·lula. Es tracta de glicoproteïnes heterodimèriques formades per una cadena α i una β unides no covalentment. Actualment hi ha descrites al menys setze subunitats α y vuit β . Cada subunitat α pot associar-se amb més d'una cadena β i viceversa, formant els vint-i-dos heterodímers coneguts (Clezzardin, 1998). Es troben àmpliament distribuïdes, especialment en epitelis, tot i que són presents a leucòcits (Berlin *et al.*, 1993; Ruegg *et al.*, 1992; Springer, 1994), cèl·lules endotelials (Conforti *et al.*, 1992), cèl·lules musculars (Liaw *et al.*, 1995), fibroblasts i cèl·lules tumorals (Aznavorian *et al.*, 1996; Clezzardin, 1998; Garofalo *et al.*, 1995; Holzmann *et al.*, 1998).

En l'adhesió intercel·lular, les integrines actuen com a receptors per a proteïnes de la superfamília de les immunoglobulines com les ICAMs (*Intercellular Adhesion Molecule*), VCAMs (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) o PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) presents a molts tipus cel·lulars inclosos leucòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules tumorals (Banks *et al.*, 1993; DeLisser *et al.*, 1993; Newman, 1997; Reilly *et al.*, 1995; Skubitz *et al.*, 1995). En l'adhesió a la matriu extracel·lular, les integrines reconeixen proteïnes de la matriu com fibronectina, vitronectina, laminina i col·làgena. La majoria de les integrines tenen múltiples especificitats en quant als lligands i sovint varies integrines s'uneixen al mateix lligand (Buck, 1995). Els llocs de reconeixement de les integrines són, freqüentment, curtes seqüències d'aminoàcids, essent la seqüència més comú la formada pels aminoàcids arginina-glicina-aspartic (Arg-Gly-Asp o RGD) present a la fibronectina, la vitronectina i una gran varietat de molècules d'adhesió (Akiyama *et al.*, 1995).

La subfamília β_1 o VLA (de *Very Late Antigen*) és la més nombrosa, incloent-hi $\alpha_1\beta_1$ (VLA-1) i $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2) que són receptors per la laminina i la col·làgena (Dickeson & Santoro, 1998), $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) que reconeix la fibronectina i que està implicada en l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli a través del reconeixement de molècules tipus VCAM-1 o ICAM-2 presents a les cèl·lules endotelials (Lobb & Hemler, 1994).

L'expressió de la subfamília β_2 es restringeix als leucòcits i inclou $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1), $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), $\alpha_X\beta_2$ (p150,95) i $\alpha_E\beta_2$ que tenen com a lligands molècules de la família de les immunoglobulines del tipus ICAM-1, -2 i -3 presents a les cèl·lules endotelials (Etzioni, 1996).

La subfamília β_3 està fonamentalment implicada en el reconeixement de molècules a nivell de matriu extracel·lular com fibronectina, laminina, fibrinògen, trombospondina o factor de von Willebrand i promouen la migració cel·lular (Aznavorian *et al.*, 1996). Addicionalment, aquesta integrina és capaç d'interaccionar amb el PECAM-1 (Newman, 1997).

D'altres integrines són molt específiques en quant als lligands que reconeixen i, així, $\alpha_V\beta_5$ i $\alpha_V\beta_6$ (Felding-Habermann & Cheresch, 1993; Nishimura *et al.*, 1994) tenen la vitronectina com a únic lligand conegut i $\alpha_V\beta_6$ la fibronectina (Busk *et al.*, 1992).

Activitat

Els dominis citoplasmàtics de les subunitats α i β de les integrines estan directament implicats en diversos aspectes de la funció d'aquestes molècules com són l'organització del citoesquelet, el moviment cel·lular, la transducció de senyal i la pròpia afinitat pels seus lligands. Els dominis citoplasmàtics de les subunitats β són necessaris per a la localització de les integrines als llocs d'adhesió focal, mentre que les subunitats α proporcionen especificitat pels lligands (LaFlamme *et al.*, 1994).

La senyalització per integrines té lloc mitjançant la fosforilació de proteïnes (Clark *et al.*, 1994). D'entre les proteïnes que constitueixen aquests complexos de senyalització es troben aquelles amb dominis SH2 i SH3, d'homologia amb la tirosina quinasa Src, que actuen com a adaptadores reclutant d'altres molècules de senyalització (Cohen *et al.*, 1995; Pawson, 1995). Diverses quinases han estat implicades a la senyalització per integrines com és el cas de FAK (*Focal Adhesion Kinase*), a la qual s'ha atribuït un paper fonamental tant a la senyalització com a la connexió amb el citoesquelet (Crowe & Shuler, 1999). Un cop fosforilada, FAK inicia un seguit d'interaccions entre proteïnes que finalitza amb la via de senyalització de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), que té com a principals dianes de fosforilació la família de factors de transcripció Ets. Les proteïnes Ets regulen diversos processos cel·lulars com el desenvolupament, la diferenciació, la migració i la tumorigènesi (Wasylyk *et al.*, 1993). Els promotors de la majoria de metal·loproteases de matriu presenten múltiples llocs d'unió a proteïnes Ets, i poden, doncs, ser regulats per les

integrines (Sato & Seiki, 1993; Tremble *et al.*, 1995).

Integrines i càncer

Nombrosos estudis relacionen canvis a l'expressió de les integrines amb la progressió de diferents tipus de càncer humà. Així, s'ha associat l'expressió de β_1 (Garofalo *et al.*, 1995; Okahara *et al.*, 1994) i de β_3 (Albelda *et al.*, 1990; Seftor *et al.*, 1992) amb la progressió tumoral a melanomes metastàtics. L'increment d'expressió d' $\alpha_6\beta_1$ i la pèrdua d'expressió d' $\alpha_6\beta_4$ s'ha relacionat amb el fenotip invasiu de les cèl·lules de carcinoma de pròstata (Cress *et al.*, 1995). Igualment s'ha trobat correlació entre la pèrdua progressiva d'expressió de les integrines α_6 , β_1 i β_4 i l'evolució dels adenomes cap a carcinomes de còlon (Stallmach *et al.*, 1992). L'expressió incrementada d' α_6 es correlaciona amb un pitjor pronòstic a carcinomes de mama (Friedrichs *et al.*, 1995). També s'han detectat variacions en ells nivells d' $\alpha_4\beta_7$ en funció de les localitzacions dels limfomes no Hodgkin (Drillenbourg *et al.*, 1997; Pals *et al.*, 1994).

DEGRADACIÓ DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR METAL·LOPROTEASES DE MATRIU

Estructura i tipus

La proteolisi de components de la matriu extracel·lular és fonamental en la remodelació d'aquesta matriu durant els processos fisiològics com el creixement, la diferenciació, la morfogènesi o la reparació tissular i en situacions patològiques com l'artritis o el desenvolupament tumoral (Basbaum & Werb, 1996; Shapiro, 1998).

Les metal·loproteases de matriu (MMP) són una família de proteases, secretades o transmembrana, capaces de degradar nombrosos components de la matriu extracel·lular, bé estromàtica, bé de la làmina basal, en condicions fisiològiques. Fins ara, s'han identificat setze membres de la família que es classifiquen en tres grups principals segons les seves especificitats de substrate. Així, les *col·lagenases* degraden col·làgena fibrilar, les *estromelisin* actuen principalment sobre proteoglicans i glicoproteïnes i les *gelatinases* centren la seva activitat en la degradació de col·làgenes no fibrilars i desnaturalitzades (gelatina) (Chambers & Matrisian, 1997). Les gelatinases també s'anomenen col·lagenases de tipus IV per ser les úniques capaces de degradar col·làgena IV i es diferencia entre la col·lagenasa de tipus IV de 72 KDa, també coneguda com gelatinasa A o MMP-2 i la col·lagenasa de tipus IV de 92 KDa també anomenada gelatinasa B o MMP-9.

Totes les MMPs presenten un domini propèptid responsable de mantenir la latència d'aquests enzims i un domini amino terminal catalític que uneix zinc, ió essencial per a l'activitat d'aquests enzims. El domini carboxi terminal present a la majoria de MMPs consta de repeticions en tàndem similars a la família de les hemopexines i confereix

especificitat de substrate. A les formes transmembrana, MT-MMPs (*Membrane Type Matrix Metalloproteinase*) existeix també un domini que determina aquesta localització cel·lular (Murphy & Crabbe, 1995).

Activitat

El principal punt de regulació de l'activitat metal·loproteàsica se situa a nivell del control de l'activació dels proenzims i de la regulació de l'activitat dels enzims actius per inhibidors. Totes les MMPs se secreten com a proenzims (proMMP) i requereixen l'eliminació del propèptid per a ser actives. Aquesta activació s'aconsegueix *in vitro* mitjançant proteases com la plasmina, triptasa i d'altres MMPs, per compostos amb un oxigen reactiu o mitjançant organomercurials. L'exposició del zinc que es troba coordinat en el domini catalític provoca l'autolisi del propèptid, donant lloc a l'enzim actiu madur (Murphy & Crabbe, 1995). Els enzims actius són susceptibles de bloqueig d'activitat per un inhibidor sèric general de proteases com és l' α 2-macroglobulina o per inhibidors tissulars de metal·loproteases, els TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Actualment s'han identificat quatre membres de la família TIMP (TIMP-1, -2, -3 i -4) dels quals, els millor caracteritzats són TIMP-1 i TIMP-2, que són inhibidors de l'MMP-9 i l'MMP-2 respectivament (Chambers & Matrisian, 1997).

S'ha descrit un mecanisme d'activació exclusiu per l'MMP-2 que té lloc a la superfície cel·lular a través d'una forma transmembrana d'MMP, l'MT1-MMP. Un cop activat, aquest enzim uneix l'inhibidor TIMP-2, el qual actua, al seu torn, com a receptor de la progelatinasa A. Una segona molècula d'MT1-MMP proteolitza parcialment i activa la pro-MMP-2 que s'alliberarà com a gelatinasa A activa o bé es mantindrà unida a la membrana (Werb, 1997).

Aquest mecanisme d'activació no és comú a l'MMP-9, essent secretada en forma latent. S'ha observat que varies proteases activen l'MMP-9 com per exemple l'estromelisin-1 o MMP-3 (O'Connell *et al.*, 1994; Ogata *et al.*, 1992), la plasmina (Okada *et al.*, 1992), la kalikreïna (Menashi *et al.*, 1994) i la pròpia MMP-2 (Fridman *et al.*, 1995).

Metal·loproteases i càncer

Durant la metastasi, la matriu estromàtica i la làmina basal constitueixen barreres estructurals que les cèl·lules tumorals han de travessar tant per a intravassar-se com per a extravassar-se. De la mateixa manera, la matriu extracel·lular dels teixits en què es desenvolupa el tumor primari o secundari ha de ser degradada per permetre tant la invasió com l'expansió de les cèl·lules tumorals. Per tant, es posa de manifest la necessitat d'una activitat proteolítica associada a les cèl·lules metastàtiques que serà produïda per elles mateixes o per les cèl·lules de l'estroma o del sistema immune infiltrades en el tumor.

Ja fa dècades que es presenten evidències que els tumors malignes contenen activitat

proteolítica capaç de degradar col·làgena *in vitro* (Liotta *et al.*, 1977; Liotta *et al.*, 1980; Salo *et al.*, 1982). Aquests treballs inicials varen centrar l'interés en l'estudi de les col·lagenases de tipus IV, actualment denominades gelatinases, com a responsables de la degradació d'aquest component de la membrana basal. Així, s'han detectat increments en els nivells d'MMP-2 i/o MMP-9 en diferents tipus tumorals invasius quan es comparen amb tumors no invasius o amb teixit normal, en el cas de tumors de mama (Brown *et al.*, 1993a; Davies *et al.*, 1993), colon (Liabakk *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1991) o pulmó (Brown *et al.*, 1993b; Tokuraku *et al.*, 1995). També s'ha relacionat amb la biologia dels mielomes múltiples, caracteritzats per una reabsorció excessiva del teixit ossi i pel procés d'invasió tumoral tant dins com fora la medul·la òssia (Barille *et al.*, 1997) o amb l'increment en el potencial invasiu de cèl·lules leucèmiques (Devy *et al.*, 1997) o de fagòcits mononuclears (Watanabe *et al.*, 1993).

S'han posat de manifest canvis en l'expressió dels TIMPs associats a la progressió tumoral. Així, la reducció dels nivells de TIMP-1 induïx el fenotip metastàtic en cèl·lules fibroblàstiques NIH-3T3 (Khokha *et al.*, 1989) i la sobreexpressió de TIMP-2 provoca una disminució considerable del creixement tumoral i la formació de metastasi a cèl·lules de melanoma (DeClerck *et al.*, 1992; Montgomery *et al.*, 1994; Valente *et al.*, 1998). D'altres estudis, per contra, indiquen una relació un tant més complexa entre l'expressió de TIMPs, MMPs i càncer i algunes observacions són contràries a les esmentades anteriorment. S'ha vist, per exemple, nivells elevats de TIMP-1 (tant proteïna com RNAm) en càncer de colon humà (Lu *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1995) o de TIMP-2 a l'estroma de tumors de mama, colon y gàstrics (Hoyhtya *et al.*, 1994). De la mateixa manera, la sobreexpressió de TIMP-2 s'ha correlacionat amb un pitjor pronòstic a tumors de mama (Visscher *et al.*, 1994) i a càncer invasius de bufeta (Grignon *et al.*, 1996).

Regulació de l'activitat metal·loproteàsica de les cèl·lules tumorals per components de la matriu extracel·lular

Els propis components de la matriu extracel·lular que són substracte de les MMPs, regulen l'expressió i l'activitat d'aquests enzims. D'aquesta manera, la unió de cèl·lules tumorals a proteïnes específiques de la matriu pot incrementar l'activitat de proteases de matriu i promoure la invasió tumoral. Així, la fibronectina induïx l'expressió d'MMP-7 (matrilisina) a cèl·lules de càncer colorectal (Yamamoto *et al.*, 1994), d'MMP-2 a cèl·lules de fibrosarcoma (Stanton *et al.*, 1998) i d'MMP-9 a cèl·lules de càncer d'ovari (Shibata *et al.*, 1997). La laminina induïx l'expressió d'MMP-2 a cèl·lules de melanoma (Stack *et al.*, 1991) així com a diferents tipus cel·lulars metastàtics (Reich *et al.*, 1995). La vitronectina, una proteïna sèrica (abans proteïna S) freqüentment associada als proteoglicans de la matriu extracel·lular en la làmina basal, induïx l'expressió d'MMP-2 i TIMP-2 a cèl·lules de melanoma (Bafetti *et al.*, 1998).

Aquesta regulació té lloc a través de les integrines que, en reconèixer molècules matricials, provoquen canvis en l'expressió gènica de diferents MMPs mitjançant una sèrie de cascades de senyalització que, en últim terme, fosforilen els factors de transcripció responsables de regular aquesta expressió gènica (Sato & Seiki, 1993; Tremble *et al.*, 1995). Així, interaccions de l'integrina $\alpha_5\beta_1$ amb la seqüència RGD de la fibronectina estimulen l'expressió d'MMP-1, MMP-3 i MMP-9 a determinats models cel·lulars (Werb *et al.*, 1989) mentre que interaccions de l'integrina $\alpha_4\beta_1$ amb altres dominis de la fibronectina suprimeix la producció d'aquestes mateixes MMPs (Huhtala *et al.*, 1995). El tractament de queratinocits humans amb anticossos monoclonals contra les cadenes de les integrines α_3 o β_1 , que simulen l'ocupació pel lligand, indueix l'expressió d'MMP-9 en aquestes cèl·lules (Larjava *et al.*, 1993). De la mateixa manera s'ha descrit a cèl·lules de melanoma humà una regulació de l'expressió d'MMP-2 quan aquestes cèl·lules han estat incubades en presència tant de vitronectina com d'anticossos contra el seu receptor, l' $\alpha_v\beta_3$ (Seftor *et al.*, 1992; Seftor *et al.*, 1993).