

Lizosomske cisteinske proteinaze, njihovi endogeni zaviralci in rak

Lysosomal Cysteine Proteinases, Their Endogenous Inhibitors and Cancer

Primož Strojjan*

Ključne besede
novotvorbe
prognoza
cisteinske proteinaze
cisteinske proteinaze inhibitorji
lizosomi

Key words
neoplasms
prognosis
cysteine proteinases
cysteine proteinases inhibitors
lysosomes

Izvleček. Lizosomske cisteinske proteinaze, imenovane tudi cisteinski katepsini, so ubikvitar- ni proteolitični encimi. Najpomembnejša skupina njihovih endogenih zaviralcev tvori naddružino cistatinov, ki jo sestavljajo tri družine: stefini, cistatini in kininogeni. Vpletenost cisteinskih katepsinov in cistatinov v proteolitične procese, ki vodijo v invazijo in zasevanje tumorskih celic, so potrdili rezultati številnih raziskav *in vitro* in *in vivo*. Na teh spoznanjih temelji predpostavka o njihovi možni vlogi kazalcev za napoved poteka bolezni in preživetja bolnikov z rakom. V prispevku so opisane biokemične lastnosti lizo- somskih cisteinskih proteinaz in njihovih endogenih zaviralcev, njihova vloga v celici ter pri rasti in zasevanju malignih tumorjev. Podan je podroben pregled kliničnih raziskav, ki obrav- navajo napovedni pomen teh novih bioloških kazalcev pri bolnikih z rakom. Rezultati so spod- budni, še posebej v primeru karcinoma dojke, vendar zaenkrat še ne dopuščajo njihove upo- rabe v vsakodnevni klinični praksi skupaj z že uveljavljenimi napovednimi kazalci.

Abstract. Lysosomal cysteine proteinases, termed also cysteine cathepsins, are ubiquitous proteolytic enzymes. The most important group of their endogenous inhibitors belongs to the cystatin superfamily, which consists of three families: stefins, cystatins and kininogens. The involvement of cysteine cathepsins and cystatins in proteolytic processes, leading to invasion and dissemination of tumor cells, has been confirmed by the results of several *in vitro* and *in vivo* studies. These findings suggest that they play a role in the prognosis of the course of the disease and survival of cancer patients. The paper describes the biochemical properties of lysosomal cysteine proteinases and their endogenous inhibitors, as well as the role they play in the cell and in malignant tumor growth and dissemination. Clinical studies evaluating these new biological prognostic factors in cancer patients are reviewed. The results are encouraging, particularly for patients with breast cancer, but they are not yet conclusive enough to be applied in the daily clinical practice along with the already estab- lished prognostic factors.

Uvod

Vedenje malignih tumorjev značilno opredeljujeta zmogost invazije tumorskih celic v okol- na tkiva in tvorba zasevkov na različnih mestih v telesu, oddaljenih od primarnega tumorja. Pri tem tumorske celice prehajajo skozi različne tkivne razdelke, ki sestavljajo organi- zem. Te med seboj ločujeta dve vrsti zunajceličnega matriksa, bazalne membrane in intersticijsko vezivno tkivo. Glavne sestavine teh struktur so različni proteini, predvsem kolagen, adhezivni glikoproteini in proteoglikani (1).

*Asist. dr. Primož Strojjan, dr. med., Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1105 Ljubljana.

Razkroj zunajceličnega matriksa in prehajanje tumorskih celic skozenj sta posledica učinkovanja več vrst različnih proteolitičnih encimov. Tvorijo in izločajo jih tumorske in normalne celice v svojo okolico ali na površino citoplazemske membrane. Encime, ki sodelujejo v teh procesih, razvrščamo glede na kemično naravo skupin, odgovornih za katalitično aktivnost, v štiri razrede. Iste celice, ki tvorijo encime, izdelujejo tudi njihove zaviralce (tabela 1) (2).

Tabela 1. Razredi proteinaz, njihovi proteinski zaviralci in pH-območje aktivnosti.

Razred	Predstavniki	pH-območje aktivnosti	Proteinski zaviralci
<i>Serinske proteinaze</i>	elastaza; dejavniki sistema komplementa (C _{1r} , C _{1s} , C ₃ , C ₅ , F _D); himaza; himotripsin; kalikrein; katepsin G; koagulacijski faktorji (VII, IX–XII, trombin); plazmin; tripsin; triptaza; uPA; tPA	7–9	α2-antiplazmin; α2-makroglobulin; PAI (I–IV)
<i>Cisteinske ali tiolne proteinaze</i> ^a	papainske proteinaze (katepsini B, F, H, K, L, O/2, S, U, W); kalpaini; klostripaini; streptokokne cisteinske proteinaze; virusne cisteinske proteinaze; apopaini	3–8	cistatini; kininogeni; stefini; α2-makroglobulin
<i>Aspartatne proteinaze</i>	gastricin; himozin; katepsini (D, E); pepsin; renin	2–7	pepstatin
<i>Metaloproteinaze</i>	kolagenaze; motrilizin; stromelizini (1–3); želatinaze (A, B)	7–9	TIMP (I, II)

uPA, aktivator plazminogena urokinaznega tipa; tPA, aktivator plazminogena tkivnega tipa;

PAI, zaviralec aktivatorja plazminogena; TIMP, tkivni zaviralec metaloproteinaz.

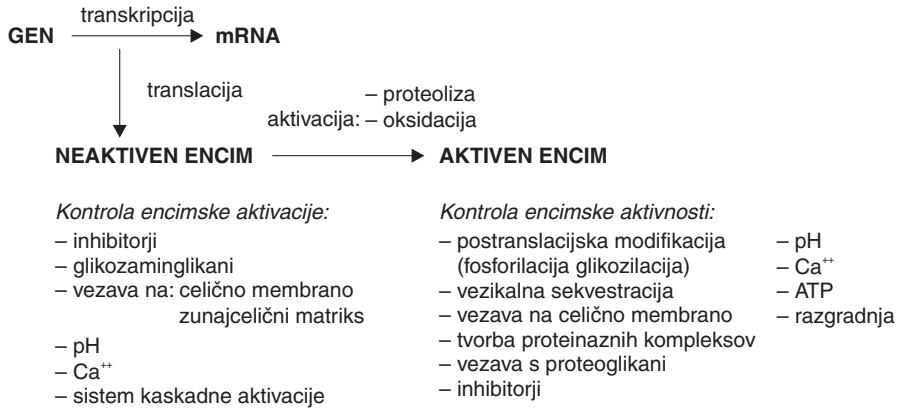
^a Cisteinske proteinaze tvorijo nadružino, ki jo sestavlja šest družin.

Prisotnost zaviralcev je neobhodna za nadzorovano delovanje encimskih molekul. Dopolnjuje jo več drugih nadzornih mehanizmov, delujočih znotraj in/ali zunaj celice (slika 1). Le natančno uravnavanje encimske aktivnosti zagotavlja varnost tkivnih struktur pred nezaželeno proteolitično poškodbo (2).

Proteolitična kaskada

Delovanje posameznih encimov in njihovih zaviralcev je v normalnem tkivu povezano in usklajeno v proteolitični kaskadi. Ta sodeluje v številnih fizioloških in bolezenskih procesih: trofoblastnem vsajanju, morfogenezi zarodka, angiogenezi, celjenju ran, patološki invaziji bakterij in parazitov idr. (2). Njena aktivacija je zapleten proces, ki vključuje številne interakcije med encimsko neaktivnimi proencimi, aktivnimi proteinazami različnih razredov in njihovimi zaviralci (3).

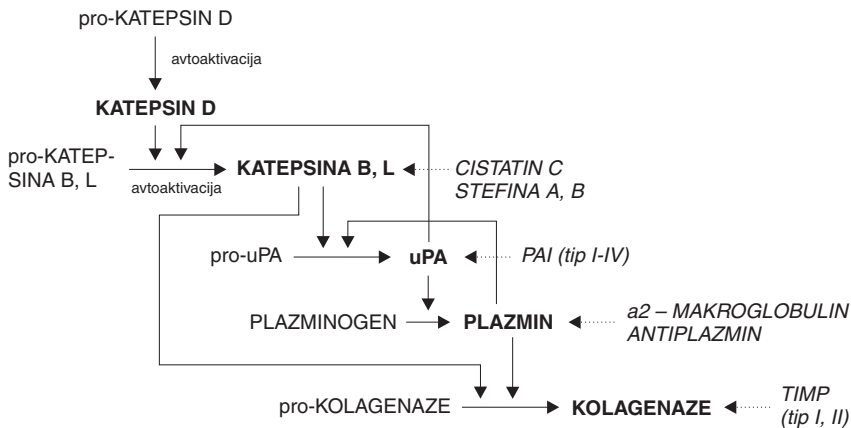
V tumorskem tkivu je uravnavanje proteolitične kaskade pomanjkljivo ali napačno. Vzrok temu je modulacija enega ali več mehanizmov, ki uravnavajo sintezo, transport



Slika 1. Mehanizmi, ki sodelujejo pri uravnavanju encimske aktivnosti.

in izločanje v njej sodelujočih encimov in zaviralcev. To vodi do sprememb v njihovi celični porazdelitvi in/ali koncentraciji oz. aktivnosti in do vzpostavitve novih, neobičajnih razmerij med njimi (3).

Ključno vlogo v verigi proteolitičnih dogajanj, ki vodijo v invazijo in zasevanje tumorskih celic, ima serinska proteinaza aktivator plazminogena urokinaznega tipa (uPA). Ta pretvarja proencim plazminogen v fibrinolitični peptid plazmin, ki je zmožen razgradnje večine zunajceličnih proteinov, bodisi neposredno ali posredno preko aktivacije drugih proteinaz (slika 2) (4). Aktivacija neaktivnega prekursorja uPA v encimsko aktivni uPA je posledica proteolitičnega delovanja lizosomskih cisteinskih proteinaz katepsinov B in L (5, 6). Za aktivacijo obeh katepsinov je v prvi vrsti odgovorna aspartatna proteinaza katepsin D (7),



Slika 2. Proteolitična kaskada: aktivacija in uravnavanje. uPA – aktivator plazminogena urokinaznega tipa, PAI – inhibitor aktivatorja plazminogena, TIMP – tkivni inhibitor metaloproteinaz.

ki ji zaradi njene sposobnosti avtoaktivacije v kislem okolju nizkega pH pripisujejo vlogo sprožilca proteolitične kaskade (8). Aktivacija prooblik katepsinov B in L naj bi bila tudi rezultat njenega avtokatalitičnega procesiranja (9, 10). Oba katepsina, B in L, sta zmožna neposredne razgradnje proteinskih gradnikov zunajceličnega matriksa (11, 12).

Lizosomske cisteinske proteinaze

Lizosomske cisteinske proteinaze, imenovane tudi cisteinski katepsini (ime izhaja iz grškega izraza *kathepsin*, ki pomeni »razgraditi«), uvrščamo v družino papainskih proteinaz. Mednje prištevamo katepsine B, H, L in S ter v zadnjem času odkrite katepsine K, O/2, F, W in U (13). Kot ubikvitarni lizosomski encimi se nahajajo v vseh celicah organizma sesalcev, vendar se njihova koncentracija med posameznimi vrstami celic in tkiv razlikuje: najvišja je v makrofagih oz. v organih, kot so ledvice, vranica in jetra. Vsi imajo na aktivnem mestu kot esencielno katalitično skupino umeščen cistein. Po svoji kemični sestavi so glikoproteini, ki jih z redkimi izjemami razvrščamo v skupino endopeptidaz (14). Sodelujejo v številnih fizioloških procesih:

- pri znotrajceličnem proteinskem obratu;
- pri posttranslacijskem preoblikovanju nekaterih biološko pomembnih proteinskih prekurzorjev (npr. inzulina in endorfina) in
- pri nastanku različnih bolezenskih stanj: mišične distrofije, artritis, emfizema, multiple skleroze in raka (14).

Katepsini se sintetizirajo kot proteinski prekurzorji z M_r 30–50 kDa. Po končani glikozilaciji in fosforilaciji v Golgijevem aparatu se s posredovanjem receptorjev za manozan-6-fosfatne ostanke na njihovih molekulah transportirajo v endosomske vezikle (15). V kislem pH-okolju znotraj lizosomov se poleg katepsinov nahaja še vrsta drugih hidrolitičnih encimov. Kakovostni in količinski odnosi med ujetimi encimi opredeljujejo proteolitični potencial lizosomskih veziklov (15) in pogojujejo tako razlike med lizosomi celic različnih tkiv kot tudi celic iste vrste, nahajajočih se v različnih okoljih (16).

Med najbolj preučevane lizosomske cisteinske proteinaze pri raku sodijo katepsini B, H in L. Mesto nahajanja gena za katepsin B pri človeku je na kromosomu 8 in za katepsin L na kromosomu 9, medtem ko to za katepsin H ni poznano (3, 17). Zrele oblike katepsinov B, H, in L se v celici nahajajo v obliki eno- in/ali dvovalenčnih molekul z maso, ki znaša do nekaj deset kDa, odvisno od vrste organizma oziroma tkiva (3, 14). Učinkujejo v kislem okolju s pH 6,0; v območju nevtralne ali alkalnih vrednosti pH so slabo aktivni ali neaktivni, odvisno od narave substrata in stopnje zrelosti encima (14). Delujejo na številne proteinske substrate, tudi na sestavine zunajceličnega matriksa (11, 12, 18). Katepsina B in L sta zmožna aktivacije prekurzorske oblike uPA (12, 13) in prekurzorjev nekaterih kolagenaz (19). Za svojo aktivacijo potrebujejo tiolne reagente in kelatorje (14). Aktivirajo jih tudi pepsin (14), katepsin D (7, 18) in metaloproteinaze (20) ali pa je njihova aktivacija posledica avtokatalitične aktivnosti (9, 10, 18). Nepovratno jih inhibirajo tiol vezujoči reagenti, povratno pa leupeptin in drugi peptidni aldehidi, makroglobulin α_2 ter člani naddružine cistatinov, to so stefini, cistatini in kininogeni. Izjema je

katepsin H: v nasprotju s katepsinoma B in L nanj leupeptin nima učinka ali pa je le-ta omejen. Od ostalih katepsinov ga loči tudi velika afiniteta do konkanavalina A, temperaturna stabilnost in zmožnost delovanja bodisi kot endo- ali aminopeptidaza (14). Katepsin L učinkuje na proteinske substrate do 10-krat hitreje od ostalih katepsinov in velja za najučinkovitejšo izmed lizosomskih proteinaz (14). Homolognost aminokislinskih zaporedij nakazuje skupno evolucijsko poreklo vseh treh katepsinov oz. članov razreda cisteinskih proteinaz (5, 17).

Vpletenost katepsinov B, H, in L v proteolitične procese, ki vodijo v invazijo in zasevanje tumorskih celic, so potrdile številne raziskave *in vitro* in *in vivo*. Primerjave s celicami normalnih tkiv so v celicah živalskih in človeških tumorjev pokazale:

- povišano ekspresijo mRNA za posamezne katepsine;
- razlike v transportu in zorenju katepsinskih molekul in
- spremenjeno (običajno povišano) koncentracijo in/ali aktivnost katepsinskih molekul (3, 8, 11, 12).

Posledici teh razlik naj bi bili povečana proteolitična zmožnost in spremenjena celična razporeditev katepsinov. V nasprotju z normalnimi celicami, kjer se molekule katepsinov nahajajo prvenstveno v lizosomih, najdemo v tumorju velik delež encimskih molekul na citoplazemski membrani (21, 22) in/ali v proobliki v njeni neposredni bližini, zunaj celice (18, 23). Tu so stabilne tudi v aktivni obliki, zahvaljujoč okolju z rahlo alkalnim pH in prisotnosti velikih proteinskih substratov, kot so proteini zunajceličnega matriksa (18, 24, 25).

Endogeni lizosomski zaviralci cisteinskih proteinaz

Najpomembnejša skupina endogenih zaviralcev lizosomskih cisteinskih proteinaz pripada superdružini cistatinov, ki jo sestavljajo tri družine: stefini, cistatini in kininogeni. Člani teh družin se med seboj razlikujejo po afiniteti in razmerju vezave na molekule katepsinov, ki je pri vseh čvrsta, a reverzibilna in kompetitivna. Trem družinam je bila v zadnjem času priključena še četrta, družina nezaviralnih proteinov, ki vključuje s histidinom bogate glikoproteine in glikoproteine α_2 HS (tabela 2) (3, 26).

Tabela 2. Zaviralci lizosomskih cisteinskih proteinaz iz superdružine cistatinov pri človeku.

Družina	Predstavniki	Nahajanje	M, (kDa)
Stefini	stefina A in B	v celici	11
Cistatini	cistatin C	zunaj celice	13
Kininogeni	HMW-kininogen LMW-kininogen	zunaj celice	88–114 50–68

HMW, visokomolekularni (*high molecular weight*);
LMW, nizkomolekularni (*low molecular weight*).

V nasprotju s kininogeni in cistatini, ki so v prvi vrsti zunajcelični zaviralci, najdemo stefine predvsem znotraj celic (3, 26). Ker so člani naddružine cistatinov vpleteni v mehanizme, odgovorne za nadzor znotraj- in zunajceličnega beljakovinskega razkroja, jim pripisujejo vlogo vsestranskih zaščitnikov celic, tj. pred nezaželeno endo- in eksogeno proteolizo (25).

Poleg navedenih prištevamo k endogenim zaviralcem lizosomskih cisteinskih proteinaz še druge, strukturno bolj oddaljene člane superdružine cistatinov: p21 (produkt onkogene *c-Ha-ras*) (27), p41 (fragment invariantne verige glavnega histokompatibilnostnega kompleksa) in ekvinatoksin (zaviralec, ki ga najdemo v morski veternici) (13). Pomemben zunajcelični zaviralec endopeptidaz vseh štirih razredov je tudi makroglobulin α_2 (28).

Stefini

V družino stefinov uvrščamo pri človeku stefina A in B, pri glodalcih pa njuna analoga, stefin α in stefin β (29). Gena za stefina A in B se nahajata na kromosomu 3q (17,30) in ne vključujeta sekretornih signalnih zaporedij (31). Stefina A in B sta enoverižni neglikozilirani beljakovini z M_r okoli 11 kDa (26). Stabilna sta v okolju z nevtralnimi ali alkalnimi pH. Obe sta toplotno stabilni in strukturno precej podobni druga drugi (51 % njune strukture je identične), razlikujeta pa se po svojih imunoloških značilnostih (26, 32). Stefin A se nahaja v visokih koncentracijah predvsem v epitelu in nekaterih celicah limfatičnega tkiva, kjer naj bi sodeloval v obrambi pred invadirajočimi bakterijami in paraziti oziroma njihovimi (tj. zunanji) cisteinskimi proteinazami (29, 33, 34). Nasprotno pa je stefin B med različnimi tkivi razporejen sorazmerno enakomerno, zaradi česar mu pripisujejo vlogo zaščitnika celic pred nenadzorovano aktivnostjo endogenih cisteinskih proteinaz (26, 29, 35). Stefin A zavira delovanje katepsina B mnogo močneje kot stefin B in je hkrati bolj odporen na delovanje katepsina D. Oba stefina učinkoviteje inhibirata delovanje katepsinov L in H kot katepsina B (26, 36).

Rezultati imunohistokemičnih študij kažejo, da je v tumorskem tkivu mesto nahajanja molekul stefinov spremenjeno. Prisotnost stefinov ugotavljajo tako na površini celic kot tudi v njihovi neposredni okolici, skupaj z molekulami encimov, kar naj bi služilo učinkovitemu nadzoru fokalne proteolize. Pri tem je bila v tkivu različnih vrst tumorjev izmerjena tako znižana kot tudi zvišana ali celo nespremenjena aktivnost oziroma koncentracija zaviralcev kot v okolnem, zdravem tkivu (3). Poleg tega naj bi endogeni zaviralci, po poreklu iz tumorjev, posedovali drugačne zaviralne lastnosti kot tisti iz normalnih tkiv (37). Glede na rezultate opravljenih raziskav se zdi, da je z invazijo in zasevanjem tumorskih celic izmed vseh članov superdružine cistatinov najtesneje povezan stefin A (3).

Cistatini

Cistatini so neglikozilirani enoverižni bazični proteini z M_r 13 kDa. Značilno jih opredeljuje prisotnost dveh disulfidnih vezi, nameščenih na C-koncu molekul. Sekvenčna homolognost med cistatini in stefini znaša kar 30 % (26). Družina cistatinov vključuje cistatina C in S z različicami ter cistatin D; najbolj preučevani zaviralec pri človeku je cistatin C. Gen, ki ga kodira, se nahaja na kromosomu 20 in vključuje signalno zaporedje, ki daje novonastalemu peptidu lastnosti sekretorne molekule (38). V visokih

koncentracijah se nahaja v različnih tkivih in telesnih tekočinah, še posebej v semenski tekočini, cerebrospinalni tekočini in sinovialni tekočini (38). Cistatin C je eden izmed najučinkovitejših zaviralcev lizosomskih cisteinskih proteinaz in njihov fiziološko najpomembnejši zaviralec v zunajceličnem prostoru (26). Spremenjene koncentracije cistatina C so bile izmerjene pri različnih bolezenskih stanjih, zlasti avtoimune narave (39). Serumska koncentracija cistatina C naj bi bila celo bolj občutljiv kazalec zgodnje ledvične okvare kot serumska koncentracija kreatinina in ponekod že izpodriva klasične metode za opredelitev ledvične funkcije (40).

Kininogeni

Kininogeni so enoverižni visokomolekularni plazemski glikoproteini (26). Poznani so trije tipi kininogenov: visokomolekularni ali HMW-kininogen (M_r 88–114 kDa), nizkomolekularni ali LMW-kininogen (M_r 50–68 kDa) in podganji T-kininogen (M_r 68 kDa) (41). Humana HMW- in LMW-kininogena sta produkta istega gena, ki se nahaja na kromosomu 3q (17). Serinska proteinaza kalikrein pretvarja zrelo enoverižno molekulo v dvoverižno, z lahko in težko verigo, pri čemer se sprošča kinin. Težki verigi obeh kininogenov sta identični, medtem ko je lahka veriga HMW-kininogena znatno večja kot pri LMW-kininogenu. Obe verigi sta med seboj povezani z disulfidno vezjo. Tako HMW- kot LMW-kininogen sta prisotna v monoin oligomerni obliki. Zaviralna aktivnost kininogenov je stabilna v območju nevtralne in bazičnih pH vrednosti ter labilna pri pH, nižjem od 4,0 (26, 41). Kininogeni so učinkoviti zunajcelični zaviralci katepsina L ter šibkejši zaviralci katepsina H in še posebej katepsina B (42). Že dolgo so poznani kot prekursorji vazoaktivnih kininov; aktivno sodelujejo tudi v kaskadni reakciji strjevanja krvi in vnetni reakciji (41).

Klinični pomen lizosomskih cisteinskih proteinaz in njihovih endogenih zaviralcev

V nasprotju z vlogo cisteinskih katepsinov in cistatinov na molekularni in celični ravni je njihov klinični pomen kot kazalcev za napoved preživetja bolnikov z rakom manj dognan. Izvedena je bila vrsta kliničnih raziskav, v katerih so poskušali ovrednotiti njihovo napovedno vlogo (tabela 3). Kljub spodbudnim obetom se do sedaj še nobeden izmed katepsinov ali njihovih zaviralcev ni izkazal za prognostično tako zanesljivega, da bi lahko odločilno vplival na izbor vrste in/ali stopnje agresivnosti zdravljenja, in to pri nobeni vrsti raka.

Karcinom dojke

Prva klinična raziskava, ki je poskusila ovrednotiti napovedni pomen lizosomskih cisteinskih proteinaz in njihovih endogenih zaviralcev pri raku, je bila izvedena v Ljubljani leta 1992. Lahova in sodelavci so pomerili aktivnost katepsinov B in L ter celokupno aktivnost njihovih zaviralcev v tumorskem tkivu 50 bolnic s karcinomom dojke. Z dolžino preživetja bolnic je statistično značilno (obratno) korelirala le aktivnost katepsina L in ne tudi katepsina B ali zaviralcev (43). Ista skupina avtorjev je v drugi, podobni študiji kot najbolj zanesljivega znanilca krajšega preživetja bolnic spoznala tri- in večkratno

Tabela 3. Napovedni pomen lizosomskih cisteinskih proteinaz in njihovih endogenih zaviralcev pri raku.

Vrsta raka	Avtor (Ref.)	Vzorec	Število bolnikov	Encim/zaviralec	Analiza	Napovedna vrednost
Karcinom dojke	Lah <i>in sod.</i> , 1992 (43)	tkivo	45	KB, KL, ICP	EA	↑ KL
	Budihna <i>in sod.</i> , 1995 (48)	tkivo	62	KB	ELISA	↓ KB
	Thomssen <i>in sod.</i> , 1995 (45)	tkivo	167	KB, KL	ELISA	↑ KB, ↑ KL
	Lah <i>in sod.</i> , 1997 (44)	tkivo	60	KB, KL, SA	ELISA	↑ KB, ↓ SA
		tkivo	60	KB, KL	IHK	↑ KB
	Foekens <i>in sod.</i> , 1998 (47)	tkivo	1500	KB, KL	ELISA	↑ KB, ↑ KL
	Kuopio <i>in sod.</i> , 1998 (49)	tkivo	384	SA	IHK	↑ SA
	Thomssen <i>in sod.</i> , 1998 (46)	tkivo	103	KL	ELISA	↑ KL
Krcinom pljuč	Ebert <i>in sod.</i> , 1994 (50)	tkivo	65	KB	EA	↑ KB
	Inoue <i>in sod.</i> , 1994 (54)	tkivo	142	KB	IHK	↑ KB
	Knoch <i>in sod.</i> , 1994 (51)	tkivo	69	KB, ICP	EA	↑ KB, ↓ ICP
	Sukoh <i>in sod.</i> , 1994 (55)	tkivo	108	KB	IHK	↑ KB
	Ebert <i>in sod.</i> , 1997 (56)	tkivo	51	ICP	EA	↓ ICP
		tkivo	50	SA, SB, CC	ELISA	↓ SB
	Werle <i>in sod.</i> , 1997 (52)	tkivo	33	KB	EA	↑ KB
	Werle <i>in sod.</i> , 1997 (53)	tkivo	55	KB, KL	EA	↑ KB
	tkivo	28	KB, KL	ELISA	↑ KL	
Karcinomi glave in vratu	Russo <i>in sod.</i> , 1995 (60)	tkivo	68	KB, KL	EA	↑ KB
	Budihna <i>in sod.</i> , 1996 (57)	tkivo	41	KB, KH, KL, SA, SB	ELISA	↑ KL, ↓ SA, ↓ SB
	Šmid <i>in sod.</i> , 1997 (58)	tkivo	22	KB, SA, SB	ELISA	↓ SA, ↓ SB
	Strojan, 1998 (59)	tkivo	49	KB, KL, SA, SB, CC	ELISA	↓ SA, ↓ SB, ↓ CC
Karcinom debelega črevesa in danke	Campo <i>in sod.</i> , 1994 (61)	tkivo	69	KB	IHK	↑ KB
	Kos <i>in sod.</i> , 1998 (62)	serum	325	KB	ELISA	↑ KB
Karcinom želodca	Plebani <i>in sod.</i> , 1995 (63)	tkivo	25	KB, KL	ELISA	↑ KB
Maligni melanom	Kos <i>in sod.</i> , 1997 (64)	serum	43	KB, KH, KL, SA, CC	ELISA	↑ KB, ↑ KH
Tumorji ČŽS	Strojinik <i>in sod.</i> , 1999 (65)	tkivo	100	KB, SA	IHK	↑ KB

ČŽS, centralni živčni sistem; KB, katepsin B; KH, katepsin H; KL, katepsin L; SA, stefin A; SB, stefin B; CC, cistatin C; ICP CP, zaviralci cisteinskih proteinaz; EA, encimska aktivnost; ELISA, encimsko-immunski test; IHK, imunohistokemija; ↑, soodvisnost med visoko aktivnostjo/koncentracijo encima oz. zaviralca in slabšim preživetjem bolnikov; ↓, soodvisnost med nizko aktivnostjo/koncentracijo encima oz. zaviralca in slabšim preživetjem bolnikov.

znižanje tumorske koncentracije stefina A glede na vrednost, izmerjeno v okolnem, zdravem tkivu dojke. Temu sta sledili povišana aktivnost in povišana koncentracija katepsina B ter – statistično mejno značilno – tudi katepsina L (44). Obratno soodvisnost med dolžino preživetja in tkivno koncentracijo katepsina L so zabeležili Thomssen in sodelavci. V raziskavi, ki je zajela 167 bolnic, se je napovedna moč katepsina L izkazala za primerljivo napovedni moči stanja pazdušnih bezgavk in stopnje diferenciacije tumorskih celic, ki spadata med najpomembnejše napovedne kazalce pri tej vrsti raka (45). Isti avtorji so nedavno poročali, da katepsin L v kombinaciji z zaviralcem aktivatorja plazminogena

tipa 1 omogoča v skupini bolnic z neprizadetimi pazdušnimi bezgavkami zanesljivo razpoznavo posameznic z izjemno dobrimi izgledi za preživetje. Te naj ne bi potrebovale sistemskega adjuvantnega zdravljenja (46). Tudi doslej najboljše raziskava napovedne vloge katepsinov nasploh, v katero je bilo vključeno kar 1500 bolnic s karcinomom dojke, potrjuje, da sta povišani tkivni koncentraciji katepsinov B in L zanesljiva znanilca krajšega preživetja bolnic. Kombiniranje obeh njuno napovedno moč še dodatno okrepi (47). Nasprotno pa so Budihna in sodelavci krajše preživetje zabeležili v skupini bolnic z nizko tkivno koncentracijo katepsina B. To je zaenkrat edina raziskava, ki zvišano koncentracijo katepsinov v tumorskem tkivu povezuje z boljšimi izgledi za preživetje (48). Na možen napovedni pomen cistatinov pri karcinomu dojke kaže poleg že omenjene raziskave Lahove in sodelavcev (44) tudi nedavno objavljena študija Kuopioa in sodelavcev. V njej so avtorji imunohistokemično določali stopnjo ekspresije stefina A v parafinskih vzorcih tumorjev 440 bolnic. Bolnice s stefin A-negativnimi tumorji so živele statistično pomembno dlje kot bolnice s stefin A-pozitivnimi tumorji (49).

Karcinom pljuč

Prvo poročilo o možni napovedni vlogi cisteinskih katepsinov pri karcinomu pljuč je bila raziskava Eberta in sodelavcev leta 1994, ki je zajela 65 bolnikov. Krajše preživetje so avtorji zabeležili v skupini z aktivnostjo katepsina B v tumorskem tkivu iznad izbrane razmejivne vrednosti (50). Tej podobna je raziskava Knocha in sodelavcev, v kateri so poleg aktivnosti katepsina B kot prognostično pomembno spoznali tudi razmerje aktivnosti med katepsinom B in zaviralci cisteinskih proteinaz (51). O obratni soodvisnosti med dolžino preživetja in aktivnostjo katepsina B so poročali tudi Werle in sodelavci, vendar le pri histološki podvrsti ploščatoceličnega karcinoma in deležu katepsina B, aktivnemu pri pH 7,5 (52). Nasprotno pa rezultati druge podobne raziskave iste skupine avtorjev iz istega časovnega obdobja zanikajo napovedno vredost tako aktivnosti kot koncentracije katepsina B (53). Pomembna pomanjkljivost obeh omenjenih raziskav je majhno število vanje vključenih bolnikov, tj. 33 oziroma 28 (52, 53). Istosmiselni so tudi rezultati obeh do sedaj objavljenih imunohistokemičnih študij. V obeh je bilo krajše preživetje bolnikov povezano s povišano ekspresijo katepsina B; v vsako je bilo vključenih več kot 100 bolnikov (54, 55). Možni napovedni pomen zaviralcev cisteinskih proteinaz so preučevali Ebert in sodelavci. Pomembni za napoved preživetja bolnikov sta se izkazali le tkivna koncentracija stefina B in celokupna aktivnost zaviralcev v tumorskem tkivu; obe sta pozitivno korelirali z dolžino preživetja (56).

Karcinomi glave in vratu

Na Onkološkem inštitutu in Univerzitetni kliniki za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo v Ljubljani smo leta 1992 zastavili obsežno raziskavo z namenom oceniti možno napovedno vrednost tkivnih koncentracij katepsinov B, H in L ter zaviralcev stefinov A in B ter cistatina C pri bolnikih s karcinomi glave in vratu. Raziskava je potekala v dveh delih: v prvem (obdobje med 1992–1993, skupina 1) je bilo vanjo vključenih 45 bolnikov (opazovanih 41 bolnikov) in v drugem (obdobje med 1995–1996, skupina 2) 60 bolnikov

(opazovanih 49 bolnikov). Po srednji dobi opazovanja dveh let smo v skupini 1 statistično značilno boljše preživetje zabeležili pri bolnikih s tumorsko koncentracijo stefinov A in B, ki je bila višja od izbrane razmejitvene koncentracije, oziroma pri bolnikih z nižjo koncentracijo katepsina L od izbrane razmejitvene koncentracije (57). Te rezultate, izjema je katepsin L, so potrdili tudi rezultati analize, ki je zajela podskupino 22 bolnikov s karcinomom grla (58), in rezultati analize preživetja v skupini 2 (59). Našim opažanjem nasprotujejo rezultati italijanske raziskave, v kateri so avtorji določali aktivnost katepsinov B in L v tumorskem tkivu 68 bolnikov s karcinomom grla. V tej skupini bolnikov je bilo z boljšimi izgledi za preživetje povezano le razmerje aktivnosti katepsina B med tumorskim in normalnim tkivom iznad ena, ne pa tudi katepsina L (60).

Drugi raki

Pri drugih vrstah raka napovedni pomen lizosomskih cisteinskih proteinaz in njihovih endogenih zaviralcev še ni bil preučevan ali pa je bil preučevan v manjšem obsegu.

Campo in sodelavci so v skupini 69 bolnikov s karcinomom debelega črevesa in danke zabeležili obratno soodvisnost med imunohistokemično določeno stopnjo ekspresije katepsina B in dolžino preživetja (61). Podobno ugotavljajo Kos in sodelavci, ki so merili serumsko koncentracijo katepsina B pri 325 bolnikih z isto vrsto raka (62), in Plebani in sodelavci pri bolnikih s karcinomom želodca. Slednji so določali tudi tkivno koncentracijo katepsina L, ki pa ni korelirala s preživetjem. Pomembna pomanjkljivost te raziskave je majhno število vanjo vključenih bolnikov, samo 25 (63).

V Ljubljani so bile napravljene tudi prve raziskave pri bolnikih z melanomom (64) in tumorji centralnega živčnega sistema (65). Daljše preživetje 43 bolnikov s sistemsko razširjeno obliko kožnega melanoma je bilo povezano z nizko serumsko koncentracijo katepsinov B in H, tj. nižjo od izbrane razmejitvene koncentracije. Serumske koncentracije katepsina L, stefina A in cistatina C se niso izkazale kot prognostično pomembne (64). Podobno so bolniki s katepsin B-pozitivnimi tumorji centralnega živčnega sistema živeli statistično značilno dlje kot bolniki s katepsin B-negativnimi tumorji. Tudi v tej raziskavi stopnja ekspresije stefina A ni korelirala s preživetjem bolnikov (65).

Zaključek

Vpletenost lizosomskih cisteinskih proteinaz in njihovih endogenih zaviralcev v procese, ki prispevajo k invazivni rasti in zasevanju malignih tumorjev, potrjujejo rezultati številnih raziskavah *in vitro* in *in vivo*. Ugotovljena je bila tudi povezanost med vsebnostjo posameznih encimov in zaviralcev v tumorskem tkivu in/ali serumu in preživetjem bolnikov z različnimi vrstami raka. Rezultati so spodbudni, še posebej v primeru karcinoma dojke, vendar zaenkrat še ne dovoljujejo uporabe teh novih bioloških kazalcev v vsakodnevni klinični praksi. V bodoče bo treba v raziskave vključiti večje število bolnikov in standardizirati postopke za določanje vsebnosti posameznih encimov oz. zaviralcev v bioloških vzorcih. Le tako bodo rezultati tudi verodostojni in primerljivi.

Literatura

1. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51: 5054–9.
2. Twining SS. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Molec Biol* 1994; 29: 315–85.
3. Sloane BF, Moin K, Lah TT. Regulation of lysosomal endopeptidases in malignant neoplasia. In: Pretlow TG, Pretlow TP, editors. *Biochemical and molecular aspects of selected cancers*. Vol 2. New York: Academic Press; 1994. p. 411–72.
4. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1–22.
5. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M, et al. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J Biol Chem* 1991; 266: 5147–52.
6. Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M, et al. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* 1992; 297: 112–8.
7. Nishimura Y, Kawabata T, Kato K. Identification of latent procathepsin B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1988; 261: 64–71.
8. Rochefort H, Liaudet E, Garcia M. Alteration and role of human cathepsin D in cancer metastasis. *Enzyme Protein* 1996; 49: 106–16.
9. Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* 1992; 267: 15993–9.
10. Menard R, Carmona E, Takebe S, Dufour E, Plouffe C, Mason P, et al. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273: 4478–84.
11. Chauhan SS, Goldstein LJ, Gottesman MM. Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res* 1991; 51: 1478–81.
12. Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol* 1996; 389: 281–94.
13. Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papaine-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 1997; 378: 141–50.
14. Agarwal SK. Proteases cathepsins – a view. *Biochem Educ* 1990; 18: 67–72.
15. Erickson AH. Biosynthesis of lysosomal endopeptidases. *J Cell Biochem* 1989; 40: 31–41.
16. Heuser J. Changes in lysosomal shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol* 1989; 108: 855–64.
17. Fong D, Man-Ying Chan M, Hsieh WT. Gene mapping of human cathepsins and cystatins. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50: 595–8.
18. Tsushima H, Ueki A, Matsuoka Y, Mihara H, Hopsu-Havu VK. Characterization of a cathepsin-H-like enzyme from a human melanoma cell line. *Int J Cancer* 1991; 48: 726–32.
19. Eeckhout Y, Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein and spontaneous activation. *Biochem J* 1977; 36: 1555–63.
20. Hara K, Kominami E, Katunuma N. Effect of proteinase inhibitors on intracellular processing of cathepsin B, H and L in rat macrophages. *FEBS Lett* 1988; 231: 229–31.
21. Sloane BF, Rozhin J, Johnson K, Taylor H, Crissman JD, Honn KV. Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2483–7.
22. Rozhin J, Wade RL, Honn KV, Sloane BF. Membrane-associated cathepsin L: a role in metastasis of melanomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 556–61.
23. Yamaguchi N, min Chung S, Shiroeda O, Koyama K, Imanishi J. Characterization of cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. *Cancer Res* 1990; 50: 658–63.
24. Mort JS, Recklies AD. Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursor. *Biochem J* 1986; 233: 57–63.

25. Mason RW, Gal S, Gottesman MM. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Biochem J* 1987; 248: 449–54.
26. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991; 285: 213–9.
27. Hiwasa T, Yokoyama S, Ha JM, Noguchi S, Sakiyama S. c-Ha-ras gene products are potent inhibitors of cathepsin B and L. *FEBS Lett* 1987; 311: 23–36.
28. Starkey PM, Fletcher TC, Barrett AJ. Evolution of $\alpha 2$ -macroglobulin. Purification and characterisation of protein homologous with human $\alpha 2$ -macroglobulin from plaice (*Pleuromides platessa*) plasma. *Biochem J* 1982; 205: 97–104.
29. Järvinen M, Rinne A, Hopsu-Havu VK. Human cystatins in normal and diseased tissues – a review. *Acta Histochem* 1987; 82: 5–18.
30. Hsieh W, Fong D, Sloane BF, Golembieski W, Smith DI. Mapping of the gene for human cysteine proteinase inhibitor stefin A, stf1, to chromosome 3cen-q21. *Genomics* 1991; 9: 207–9.
31. Kartasova T, Cornelissen BJC, Belt P, van de Putte P. Effects of UV, 4-NQO and TPA on gene expression in cultured human epidermal keratinocytes. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5945–62.
32. Bobek LA, Levine MJ. Cystatins – inhibitors of cysteine proteinases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3: 307–32.
33. Hopsu-Havu VK, Joronen I, Rinne A, Järvinen M. Production of acid and neutral cysteine-proteinase inhibitors by cultured human skin epithelium cell lines. *Arch Dermatol Res* 1985; 277: 452–6.
34. Alavaikko M, Rinne A, Järvinen M, Jokinen K, Hopsu-Havu VK. Acid cysteine-proteinase inhibitor, a new characteristic of reticulum cells of human lymphoid secondary follicles. *Acta Histochem* 1985; 77: 1–6.
35. Kominami E, Bando Y, Wakamatsu N, Katunuma N. Different tissue distribution of two types of thiol proteinase inhibitors from rat liver epidermis. *J Biochem (Tokyo)* 1984; 96: 1437–42.
36. Lenaričič B, Dolenc I, Križaj I, Lučovnik P, Turk V. Characterization of human stefin A and B: the low M_r cysteine proteinase inhibitors. In: Katunuma N, Kominami E, editors. *Intracellular proteolysis: mechanism and regulation*. Tokyo: Jpn Sci Soc Press; 1989. p. 328–37.
37. Lah TT, Clifford JL, Helmer KM, Day NA, Moin K, Honn KV, et al. Inhibitory properties of low molecular mass cysteine proteinase inhibitors from human sarcoma. *Biochem Biophys Acta* 1989; 993: 63–73.
38. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsback M, Lundwall A, Jansson O, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* 1990; 268: 287–94.
39. Brzin J, Popović T, Turk V, Borchart U, Machleidt W. Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 103–9.
40. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995; 47: 312–18.
41. Müller-Esterl W. Kininogens, kinins and kinship. *Thrombosis Haemostasis* 1989; 61: 2–6.
42. Müller-Esterl W, Fritz H, Machleidt W, Ritonja A, Brzin J, Kotnik M, et al. Human plasma kininogens are identical with alpha-cysteine proteinase inhibitors. Evidence from immunological, enzymological and sequence data. *FEBS Lett* 1985; 182: 310–4.
43. Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Štrukelj B, Pungerčar J, Barlič-Magajna D, Drobnič-Košorok M, et al. Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 36–44.
44. Lah TT, Kos J, Blejec A, Frkovič-Georgio S, Golouh R, Vrhovec I, et al. The expression of lysosomal proteinases and their inhibitors in breast cancer: possible relationship to prognosis of the disease. *Pathol Oncol Res* 1997; 3: 89–99.
45. Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L, Oppelt P, Pache L, Dettmar P, et al. Prognostic value of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 741–6.
46. Thomssen C, Oppelt P, Jänicke F, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, et al. Identification of low-risk node-negative breast cancer patients by tumor biological factors PAI-1 and cathepsin L. *Anticancer Res* 1998; 18: 2173–80.
47. Foekens JA, Kos J, Peters HA, Krašovec M, Look MP, Cimerman N, et al. Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1013–21.

48. Budihna M, Škrk J, Zakotnik B, Gabrijelčič D, Lindtner J. Prognostic value of total cathepsin B in invasive ductal carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 661–4.
49. Kuopio T, Kankaanranta A, Jalava P, Kronqvist P, Kotkansalo T, Weber E, et al. Cysteine proteinase inhibitor cystatin A in breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 432–6.
50. Ebert W, Knoch H, Werle B, Trefz G, Muley Th, Spiess E. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res* 1994; 14: 895–900.
51. Knoch H, Werle B, Ebert W, Spiess E. Imbalance between cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors is of prognostic significance in human lung cancer. *Int J Oncol* 1994; 5: 77–85.
52. Werle B, Jülke B, Lah T, Spiess E, Ebert W. Cathepsin B fraction active at physiological pH of 7.5 is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of human lung. *Br J Cancer* 1997; 75: 1137–43.
53. Werle B, Jülke B, Lah T, Kos J, Spiess E, Ebert W. Cathepsin B and cathepsin L: prognostic factors in human lung cancer? In: Hopsu-Havu VK, Järvinen M, Kirschke H, editors. *Proteolysis in cell functions*. Amsterdam: IOS Press; 1997. p. 472–8.
54. Inoue T, Ishida T, Sugio K, Sugimachi K. Cathepsin B expression and laminin degradation as factors influencing prognosis of surgically treated patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 6133–6.
55. Sukoh N, Abe S, Ogura S, Isobe H, Takekawa H, Inoue K. Immunohistochemical study of cathepsin B. *Cancer* 1994; 74: 46–51.
56. Ebert E, Werle B, Jülke B, Kopitar-Jerala N, Kos J, Lah T, et al. Expression of cysteine protease inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in human lung tumor tissue. *Adv Exp Med Biol* 1997; 421: 259–65.
57. Budihna M, Strojjan P, Šmid L, Škrk J, Vrhovec I, Župevc A, et al. Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1996; 377: 385–90.
58. Šmid L, Strojjan P, Budihna M, Škrk J, Vrhovec I, Žargi M, et al. Prognostic value of cathepsins B, D and stefins A and B in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997; 254: 150–3.
59. Strojjan P. *Napovedni pomen katapsinov in njihovih endogenih inhibitorjev pri bolnikih s karcinomi glave in vratu*. Doktorska disertacija. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 1998.
60. Russo A, Bazan V, Gebbia N, Pizzolanti G, Tumminello FM, Dardanoni G, et al. Flow cytometric DNA analysis and lysosomal cathepsin B and L in locally advanced laryngeal cancer. *Cancer* 1995; 76: 1757–64.
61. Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Cancer* 1994; 145: 301–9.
62. Kos J, Nielsen HJ, Krašovec M, Christensen IJ, Cimerman N, Stephens RW, et al. Prognostic value of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1511–6.
63. Plebani M, Herszenyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, et al. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995; 76: 367–75.
64. Kos J, Štabuc B, Schweiger A, Krašovec M, Cimerman N, Kopitar-Jerala, et al. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1815–22.
65. Strojnik T, Kos J, Židanik B, Golouh R, Lah T. Cathepsin B immunohistochemical staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 559–67.