

Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci

Proteases and their inhibitors in body fluids as diagnostic and prognostic tumour markers

Suzana Vozelj, Nataša Obermajer, Janko Kos

Povzetek: Odkrivanje novih tumorskih kazalcev je postalo pomemben del raziskav raka. Njihova uporabnost je v diagnozi, spremljanju napredovanja bolezni, pri napovedi ponovitve in izida bolezni ter spremljanju učinkovitosti zdravljenja. Med mnogimi biološkimi molekulami, ki so vpletene v procese razvoja in napredovanja raka, nam lahko prisotnost proteaz in njihovih inhibitorjev v tumorjih ali telesnih tekočinah omogoči nove diagnostične in prognostične informacije za bolnike z rakom. Rezultati kliničnih raziskav telesnih tekočin bolnikov z rakom dojke, jajčnikov, materničnega vratu, maternice, mehurja, pljuč, jeter, glave in vratu, prostate in črevesja kažejo na možne prednosti pred metodami, ki se trenutno uporabljajo.

Ključne besede: proteaze, rak, diagnostični kazalci, prognostični kazalci

Abstract: In recent years the discovery of new cancer biomarkers has become an important part in cancer research. Biomarkers are useful for diagnosis, monitoring disease progression, and predicting disease recurrence and outcome and therapeutic treatment efficacy. Among various biomolecules involved in cancer development and progression, proteases and their inhibitors in tumors as well as in some body fluids may provide new diagnostic and prognostic information for cancer patients. The results of their clinical investigations in body fluids of human breast, ovarian, uterine cervix, uterus, bladder, lung, liver, head and neck, prostate and colorectal cancer show possible advantage over currently existing techniques.

Key words: proteases, cancer, diagnostic markers, prognostic markers

1 Uvod

Proteaze, lahko tudi proteinaze oz. peptidaze, so encimi, ki katalizirajo razgradnjo beljakovin v manjše peptide oz. popolno razgradnjo do aminokislinskih preostankov (1).

Proteaze so selektivno delujoče, kajti posamezna proteaza razgradi polipeptidno verigo glede na specifično zaporedje aminokislin in pod določenimi pogoji okolja. Poznamo 561 genov, ki kodirajo za različne proteaze pri človeku, kar predstavlja približno 2% človeškega genoma.

Proteaze spadajo v razred hidrolaz, ki pri delovanju uporabljajo molekule vode za nukleofilni napad na karbonylni skupino v amidni vezi. Glede na mesto hidrolize peptidne vezi v polipeptidni verigi jih delimo na endopeptidaze in eksopeptidaze. Eksopeptidaze delimo glede na mesto delovanja (aminopeptidaze, karboksipeptidaze) ter glede na velikost odcepljenih fragmentov. (2).

Proteaze omogočajo znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov, regulirajo aktivacijo pro-encimov in pro-hormonov, sodelujejo pri predstavitvi antigenov, preoblikovanju kostnega tkiva,

razgradnji in preoblikovanju zunajceličnega matriksa (ECM), sodelujejo pri procesu razvoja embria, pri ovulaciji, zdravljenju ran, migraciji monocitov, kaskadi strjevanja krvi, imunskem odzivu in pri procesu programirane celične smrti ali apoptoze.

Povečano delovanje proteaz so dokazali pri številnih tumorjih, vključno pri raku dojk, pljučnem raku, možganskih tumorjih, raku črevesja, raku glave in vratu ter melanomih. Poleg rakavih obolenj pa igrajo vlogo tudi pri vnetnih boleznih, revmatoidnem artritisu, periodontitisu, kardiovaskularnih boleznih, nevroloških boleznih, ulkusu, emfizemu, pri motnjah v strjevanju krvi, malariji, ipd.

V malignih procesih imajo proteaze vlogo pri invaziji, metastaziranju, angiogenezi in tudi pri rasti tumorjev, hkrati pa tudi v procesih, ki lahko povzročijo remisijo maligne bolezni (apoptoza tumorskih celic, protitumorski imunski odziv) (3, 4, 5).

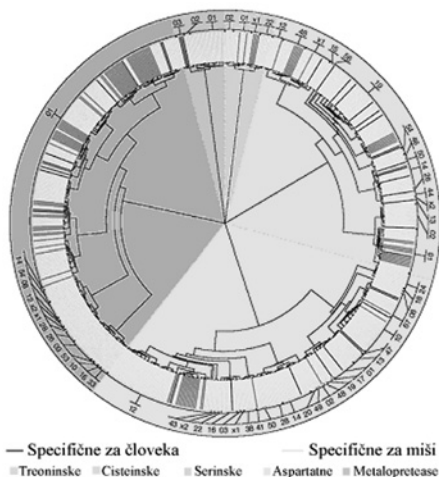
V medicini predstavljajo proteaze zaradi njihove regulatorne vloge ter udeležnosti pri patoloških procesih potencialne tarče za terapijo. V klinični rabi in različnih fazah testiranja so številni inhibitorji proteaz

Suzana Vozelj, mag. farm., Krka d.d., Novo mesto, Dunajska 65, 1000 Ljubljana
Nataša Obermajer, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana
prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana; Inštitut Jožef Stefan, Oddelek za biokemijo in molekularno biologijo, Jamova 39, 1000 Ljubljana

(inhibitorji virusnih HIV proteaz, inhibitorji ACE (angiotenzin konvertaza encima) za zniževanje povečanega krvnega tlaka, inhibitorji serinskih proteaz (trombina, faktorja X) za zdravljenje tromboze, inhibitorji renina za zdravljenje hipertenzije, inhibitorji dipeptidil peptidaze IV (DPPIV) za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2, inhibitorji katepsina K za zdravljenje osteoporoze, inhibitorji treoninske proteaze (inhibitorji proteosoma) v terapiji raka, inhibitorji metaloproteaz (MMP) za zdravljenje rozaceae, aken, periodontalnih bolezni in raka (6). Hkrati pa kažejo proteaze velik potencial kot diagnostični in/ali prognozični dejavniki pri številnih boleznih, zlasti pa rakavih obolenjih.

2 Razdelitev

Sodobna delitev proteaz temelji na evolucijski podobnosti in mehanizmu delovanja. Po encimski klasifikaciji sodijo proteaze v podrazred hidrolaz. Proteaze so razvrščene v posamezne razrede in klane. Klane sestavljajo družine, sestavljene iz proteaz, ki imajo skupnega prednika, vendar so se med evolucijo tako spremenile, da se več ne ujema v celotnem ali delnem aminokislinskem (AK) zaporedju, ki je odgovorno za katalitsko aktivnost. Družine, združene v klan, so si podobne predvsem v terciarni strukturi, vendar se podobnosti lahko kažejo tudi v položaju AK, ki so pomembne za katalitsko aktivnost, polipeptidini verigi ter omejenem ujemanju AK zaporedja v bližini teh AK (7). Glede na katalitski mehanizem delimo proteaze na več razredov.



Slika 1: Proteazno kolo: Filogenetsko drevo človeških in mišjih proteaz. Proteaze so razdeljene v pet katalitskih razredov in 63 različnih družin. Kodna številka vsake družine je napisana na zunanem krogu (8).

Picture 1: Protease wheel. Phylogenetic tree of human and mouse proteases. Proteases are divided into five catalytic classes and 63 different families. Code number of every family is written on the outer circle (8).

2.1 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze so pogosto prisotne v telesu (od vseh 561 genov, ki kodirajo za proteaze, je 148 tistih, ki kodirajo za cisteinske proteaze). Najbolj poznane človeške cisteinske proteaze so katepsini, ki se v aktivirani obliki najpogosteje nahajajo v lizosomih. Pri cisteinskih proteazah poznamo 16 različnih družin, cisteinski katepsini spadajo v klan CA in so

vklučeni v procese v celici kot so proteinsko procesiranje, reprodukcija, MHC-II antigenska predstavitev, resorpcija kosti, apoptoza, diferenciacija keratinocitov (8). Hkrati sodelujejo v patoloških procesih kot so rak, vnetje, nevrodegeneracija, ateroskleroza, artritis, psoriza, pankreatitis, itn. (9).

V razred cisteinskih proteaz spadajo katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X. Njihovo aktivnost kontrolirajo njihovi endogeni proteinski inhibitorji, med njimi najbolj poznani cistatini, tiropini in inhibitor proteaz α 2-makroglobulin (10).

2.2 Aspartatne proteaze

Aspartatne proteaze so relativno majhna, vendar zanimiva skupina, kajti imajo pomembno vlogo pri patoloških stanjih, kot so povišan krvni tlak (renin), rak (katepsin D-metastaziranje raka dojke), Alzheimerjeva bolezen (β sekretaza), malarija (plazemski pepsin), AIDS (HIV-1 peptidaza), infekcije s kandido (*Candida Albicans*), idr. (11).

Aspartatne proteaze spadajo v pepsinsko družino in so pri katalitični aktivnosti neposredno odvisne od kislega aspartatnega preostanka. Delimo jih v tri družine: A1-pepsinska, A2-retropepsinska in A3-encimi pararetrovirusov.

Pri človeku dobro poznamo vloge treh sekretornih aspartatnih proteaz: pepsin, gastricisin, renin. Drugi dve manj poznani pa sta katepsin D, ki se nahaja v lizosomih (12) in katepsin E, ki se nahaja v endosomih med endoplazmatskim retikulumom (ER) in Golgijevim aparatom (GA) (13).

2.3 Serinske proteaze

Serinske proteaze, delimo jih v 14 različnih družin, so dobro raziskane na področju fibrinolize in koagulacije krvi (trombin), sodelujejo pa tudi pri prebavnih procesih (tripsin, kimotripsin in elastaze), razvojnih procesih in vnetju. V centralnem živčnem sistemu imajo pomembno vlogo pri celični migraciji, preoblikovanju sinaps, celični vzdražnosti, pri glialnemu in celičnemu preživetju celic (14, 15). Serinske proteaze aktivirajo prekurzorje rastnih faktorjev, razgrajujejo ECM ali pa se vežejo na receptorje na celični površini in s tem sprožijo znotrajcelične signalne kaskadne reakcije. Njihova aktivnost je močno nadzorovana tudi z različnimi endogenimi serinskimi inhibitorji (serpini) (16). Poznamo dva glavna inhibitorja plazminogenih aktivatorjev: PAI-1 in PAI-2 iz družine serpinov.

Poznamo tudi dva tipa plazminogenega aktivatorja: tkivni (t-PA) in urokinazni (uPA) tip. Oba sta sposobna katalizirati pretvorbo plazminogena v plazmin. Primarna vloga tPA je aktivacija plazmina pri trombolizi, medtem ko je vloga uPA pomembna pri aktivaciji plazmina v dogodkih, povezanih z razgradnjo ECM in posledično v procesu migracije in invazije tumorja.

Receptor urokinaznega plazminogenega aktivatorja (uPAR) je receptor na površini celice in nanj se veže pro-uPA.

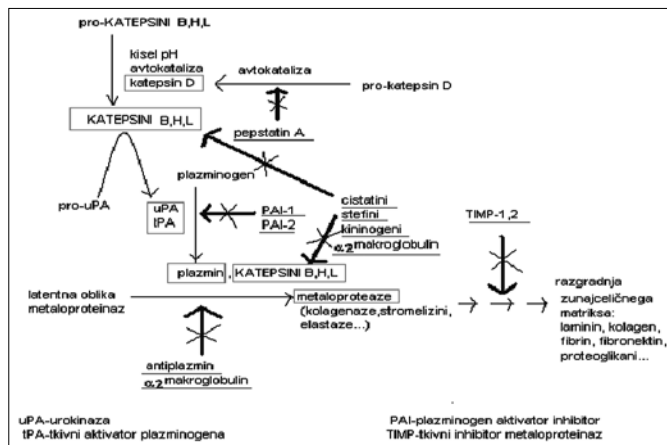
2.4 Metaloproteaze (MMP)

MMP se skrajšano imenujejo tudi matriksini, delimo jih v 26 različnih družin. Imajo pomembno vlogo v procesih razgradnje zunajceličnega matriksa (ECM). Ta proces opazimo pri razvoju zarodka, morfogenezi, reprodukciji in resorpciji ter remodeliranju tkiv (17). MMP imajo pomembno vlogo tudi v patoloških procesih: artritis, rak, kardiovaskularne bolezni, nevrološke bolezni, ulkus, jetrna fibroza, emfizem, idr. (18). Med MMP spadajo kolagenaze, gelatinaze, stromelizin, stromelizinu podobne MMP in membranski tip MMP (19).

Aktivne MMP inhibirajo specifični tkivni inhibitorji (TIMP). Poznamo 4 različne tipe, to je TIMP-1,-2,-3,-4. Sodelujejo pri razgradnji in preoblikovanju tkiv in se vežejo tako na aktivno obliko, kot na proMMP in lahko inhibirajo avtokatalitsko aktivacijo.

3 Vloga proteaz v mehanizmi nastanka in napredovanja raka

Proteaze so udeležene na številnih stopnjah razvoja ter napredovanja raka, pri tem pa ne igrajo pomembne vloge le proteaze v tumorskih celicah, temveč tudi v tumorski stromi, ki jo predstavlja tumorski ECM in tudi celične komponente, kot so fibroblasti, imunske ter vnetne celice ter celice krvnih žil. Sodelovanje transformiranega tkiva s svojim mikrookoljem ustvari pogoje, v katerih je mogoča tumorska invazija, angiogeneza in metastaziranje. Ekspresija proteaz ali njihova aktivnost je v tumorjih spremenjena in proteaze so vključene v številne tumorske procese. V procesu invazije sodelujejo cisteinske proteaze (predvsem katepsina L in B), aspartatne proteaze (katepsin D), MMPs in v veliki meri serinske proteaze (uPA). Vse omenjene proteaze pripomorejo k razgradnji ECM in bazalne membrane bodisi preko direktne razgradnje (katepsina B in L) ali sodelujejo v proteolizi in aktiviranju drugih proteaz (MMP, elastaze). MMP niso pomembni le za razgradnjo ECM, ampak imajo tudi pomembno vlogo pri vzpostavljanju ugodnega okolja za rast in metastaziranje tumorja (20).



Slika 2: Aktivacija proteaz v procesu razgradnje zunajceličnega matriksa (21).

Picture 2: Activation of proteases in the process of degradation of extracellular matrix (21).

V zdravih celicah obstaja ravnovesje med proteazami in njihovimi inhibitorji (npr.: uPA in PAI, MMP in TIMPi, katepsini in cistatini oz. stefini,), pri tumorskih celicah pa je to ravnotežje porušeno (22).

Možne so tudi druge interakcije med molekulami proteolitske kaskade. Tako npr.: katepsin B lahko poleg ostalih funkcij razgradi in s tem inaktivira inhibitorja MMP TIMP-1 in TIMP-2 in se tudi v tej zadnji efektorski fazi vključuje v razgradnjo ECM. Kompleksno vlogo pri tem ima katepsin D, saj poleg direktne razgradnje ECM proteinov razgrajuje tudi cistatine, inhibitorje cistenskih proteaz, hkrati lahko tudi stimulira angiogenezo, vpliva na apoptozo in je s tem vključen pri rasti tumorja.

Poleg tumorske invazije in metastaziranja pa so proteaze udeležene tudi v procesih angiogeneze, in sicer preko sproščanja rastnih

faktorjev (bFGF, TGF- β , EGF, IGF), vezanih na proteine zunajceličnega matriksa in aktivacije citokinov, ki vplivajo na proces ožiljanja (IL-1 β) in pospešujejo rast endotelijskih celic.

Proteaze vplivajo tudi na apoptozo tumorskih celic in modulacijo imunskega odziva, pri čemer spremenjena aktivnost proteaz lahko povzroči zmanjšanje imunskega odziva ter imunsko toleranco.

4 Prisotnost proteaz v telesnih tekočinah

Proteaze se nahajajo znotraj tkiv (tumorskih in netumorskih), vendar so nekatere prisotne tudi v telesnih tekočinah v izmerljivih koncentracijah, zlasti ob patoloških stanjih, ko je povečano njihovo sproščanje.

Ovrednotenje proteaz v zunajceličnih tekočinah bolnikov z rakom lahko izvedemo bodisi z merjenjem encimske aktivnosti z uporabo raznih kromogenih ali fluorogenih substratov ali z direktnim določanjem njihove koncentracije s specifičnimi imunskimi testi, kot je encimsko imunski test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ali s pomočjo pretočne citometrije.

V spodnjih tabelah so podani podatki o spremljanju vrednosti proteaz v telesnih tekočinah in njihovem vrednotenju kot diagnostičnih ali prognostičnih kazalcev oz. za spremljanje odziva na zdravljenje.

Tabela 1: Spremenjene vrednosti cisteinskih proteaz pri rakavih boleznih (23, 24, 25).

Table 1: Changed values of cystein proteases measured on people with cancer (23, 24, 25).

Bolezen	Katepsin	Tel. tekočina	Razmerje: bolezen/normalno
rak dojke	H	serum	↑
rak jajčnikov	B, L	serum	↑, ↑
rak sečnice	B	serum	↑
rak mehurja	B	plazma, urin	↑, =
	L	urin	↑
pljučni rak	H,S	serum	↑, =
rak maternice	L	serum	=
rak materničnega vratu	B	serum	↑
melanom	B,H	serum	↑
rak prostate	B	serum	↑
rak jeter	B	serum	↑
kolorektalni rak	B	serum	↑

Cisteinske proteaze so določali tudi pri drugih oblikah raka, vendar so merili vrednosti v tumorskem tkivu in ne v telesnih tekočinah.

Pri bolnikih s kolorektalnim rakom so bile vrednosti katepsina B odvisne od stopnje po Dukes-u, pri čemer je bila najvišja vrednost pri stopnji D (25, 26). Podobno je bila serumska aktivnost katepsina B odvisna od klinične stopnje ter razširjenosti raka materničnega vratu (26).

Vrednosti katepsina H so bile znatno višje pri bolnikih z metastatikim melanomom, kot pri tistih brez metastaz (27).

Za katepsin L so predlagali, da so serumske vrednosti katepsina L v kombinaciji s CA 125 ter CA 72-4 uporabnejše pri detekciji raka jajčnikov, kot trenutno uporabljene metode v klinični praksi (28).

Tabela 2: Inhibitorji cisteinskih proteaz (cistatin C, stefin A in B) kot tumorski kazalci pri rakavih obolenjih.

Table 2: Inhibitors of cysteine proteases (cystatin C, stefin A and B) as tumour markers.

Inhibitor cisteinskih proteaz	Telesna tekočina	Uporaba
cistatin C	serum	diagnoza in spremljanje raka glave in vratu (29)
cistatin C	serum	prognoza kolorektalnega raka (30)
cistatin C	serum	prognoza raka pljuč (9, 24)
cistatin C	serum	prognoza limfoma B-celic (9, 24)
cistatin C	serum	prognoza melanoma (9, 24)
stefin A	serum	prognoza kolorektalnega raka (31)
stefin B	serum	prognoza kolorektalnega raka (31)
stefin A	serum	prognoza raka glave in vratu (25)

Serumske vrednosti stefina A so bile povečane pri bolnikih s hepatocelularnim karcinomom in so sovpadale z velikostjo tumorja in številom neoplastičnih lezij (32).

Vrednosti stefina A ter cistatina C pri kolorektalnem raku so bile neodvisne od stopnje po Dukes-u, medtem ko so bile vrednosti stefina B značilno povezane s stopnjo in so bile najvišje pri stopnji D. Podoben vzorec so določili tudi pri bolnikih s pljučnim rakom (Kos s sod., neobjavljeni rezultati).

Izmerili so tudi vrednosti kompleksa katepsin B/cistatin C v serumih bolnikov s pljučnim in kolorektalnim rakom (33). Vrednosti so bile značilno nižje pri bolnikih z malignim pljučnim tumorjem kot pri benignih pljučnih boleznih ali pri zdravih posameznikih. Pri kolorektalnem raku so bile vrednosti nižje pri stopnjah C in D, kot pa pri zgodnjih stopnjah A in B. Inverzna korelacija med napredovanjem rakave bolezni ter stabilnostjo kompleksa potrjuje hipotezo o oslABLjeni sposobnosti inhibicije med razvojem raka.

Tabela 3: Aspartatne proteaze v telesnih tekočinah in njihova klinična uporabnost.

Table 3: Aspartic proteases in body fluids and its clinical value.

Aspartatna proteaza	Telesna tekočina	Uporaba
katepsin D	serum	spremljanje kolorektalnega raka
katepsin D	serum	prognoza in spremljanje glioma raka
katepsin D	serum	diagnoza in prognoza raka dojke

Povečana koncentracija in aktivnost katepsina D v serumu in drugih telesnih tekočinah je bila opažena tudi pri raku jajčnikov, maternice in pljuč (34, 35).

Tabela 4: Inhibitorji serinskih proteaz kot tumorski kazalci.

Table 4: Serine protease inhibitors as tumour markers.

Serinska proteaza	Telesna tekočina	Razmerje: bolezen/normalno	Uporaba
PAI-1	serum	↑	diagnoza in prognoza raka jajčnikov (36)
PAI-1	serum	↑	prognoza hepatocelularnega raka (30)

Povečano izločanje uPA je bilo izmerjeno v tkivih tumorja pri raku dojke, pljuč, ledvic, žolčnika, želodca, možganov, jajčnikov, maternice, kolorektalnem raku in melanomu (37).

Pri raku dojke so bili v tkivu izmerili zvišane vrednosti uPA, PAI-1, uPA-PAI-1 kompleksa ter uPAR, ki so negativen napovedni dejavnik, medtem ko so visoke vrednosti tPA in PAI-2 pozitiven napovedni dejavnik (38).

Tabela 5: Kalikreini, podskupina serinskih proteaz, kot tumorski kazalci (39).

Table 5: Kalikreins, subgroup of serine proteases as tumour markers (39).

Kalikerin	Tel. tekočina	Uporaba
hK2	serum	diagnoza, prognoza, spremljanje raka prostate in dojke
hK3	serum	diagnoza, prognoza, spremljanje raka prostate in dojke
hK6	serum	diagnoza, prognoza, spremljanje raka jajčnikov
hK10	serum	diagnoza in spremljanje raka jajčnikov
hK11	serum	diagnoza in prognoza raka prostate in jajčnikov

Najbolj znani kalikrein je hK3, imenovan tudi PSA (prostatni specifični antigen), ki se že rutinsko uporablja pri diagnozi raka prostate.

Tudi nekatere MMP, ki se pojavljajo v plazmi in urinu, služijo za diagnozo in prognozo bolezni.

Tabela 6: MMP kot tumorski kazalci (40).

Table 6: MMPs as tumour markers (40).

MMP	Tel. tekočina	Razmerje: bolezen/normalno	Uporaba
MMP-3	serum	↑	diagnoza raka glave in vratu
MMP-8	serum	↑	diagnoza, spremljanje raka glave in vratu
MMP-9	serum	↑	diagnoza raka glave in vratu

Tabela 7: TIMP (tkivni inhibitorji MMP) kot tumorski kazalci.

Table 7: TIMPs (tissue inhibitors of MMP) as tumour markers.

TIMP	Telesna tekočina	Razmerje: bolezen/normalno	Uporaba
TIMP-1	serum	↑	diagnoza in spremljanje raka dojke (41)
TIMP -1	serum	↑	prognoza raka glave in vratu (42)
TIMP-2	serum	↑	prognoza kolorektalnega raka (43)

5 Zunajcelične proteaze kot kazalci diagnoze, prognoze in odziva na terapijo

Tumorski kazalci so snovi, ki jih proizvajajo maligne celice ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Spremljanje vrednosti tumorskih kazalcev v tkivu ni vedno primerno za rutinska testiranja. Ovrednotenje proteaz v serumu je veliko bolj enostavna metoda, predstavlja prijaznejši način vzorčenja, manjše tveganje in ima zato tudi večjo uporabno vrednost. Omogoča boljše zanesljivost meritev in spremljanje bolezni skozi daljše obdobje, česar tkivni tumorski označevalci ne omogočajo. Ovrednotenje proteaz v zunajceličnih tekočinah ima pred merjenjem koncentracije v homogenatih tumorskega tkiva številne prednosti, saj omogoča:

- zgodnejšo detekcijo v fazi bolezni, ko je tumorsko tkivo še nedefinirano, kar daje tovrstnim meritvam znatno klinično vrednost,
- pri serumskih vzorcih se izognemo problemom, ki nastopajo pri histoloških pregledih heterogenih tkivnih vzorcev ter zahtevni izbiri ustreznega ekstrakcijskega pufra,
- dosegljivost krvnih vzorcev omogoča zaporedne meritve analizov, tudi po odstranitvi tumorskega tkiva in rutinsko analizo vzorcev osebkov s povečanim tveganjem za razvoj raka.

Slabosti merjenja v serumu pa so veliko nižje vrednosti tumorskih kazalcev (npr. katepsinov), kot na samem mestu tumorja. Zato potrebujemo bolj občutljivo metodo.

Spremenjene vrednosti lizosomskih cisteinskih proteaz v tumorjih in izvenceličnih tekočinah pri različnih tipih raka sovpadajo s preživetjem in se uporabljajo kot diagnostični ali prognostični kazalci (40). Pri večini rakavih obolenj (razen raka maternice) povečane vrednosti katepsinov B, L ali S pomenijo slabo diagnozo in prognozo, medtem ko napovedujejo visoke vrednosti katepsina H pri bolnikih s kolorektalnim rakom dobro prognozo (45). Višje vrednosti inhibitorja cisteinskih proteaz cistatina C ter stefinov A in B, so pokazatelji dobre prognoze pri različnih vrstah raka, če jih določamo v tumorskih tkivih. V telesnih tekočinah pa njihove povišane vrednosti napovedujejo slabo prognozo. Če pogledamo razmerje koncentracij cisteinskih proteaz in njihovih inhibitorjev, potrdimo hipotezo o oslABLjeni sposobnosti inhibicije cisteinskih proteaz pri rakavih obolenjih.

Pri aspartatnih proteazah se je izkazal katepsin D za klinično najbolj uporaben diagnostični, prognostični kazalec in parameter spremljanja poteka bolezni pri raku dojke, kolorektalnem raku in gliomu (34, 35).

Serinske proteaze so se pokazale za napovedni kazalec pri več vrstah raka, vendar so bile po do sedaj objavljenih podatkih njihove koncentracije merjene v tumorskih tkivih in ne v serumu. V serumu pa so bile izmerjene vrednosti inhibitorjev uPA in njihove povečane vrednosti kažejo na slabo prognozo in diagnozo pri raku jajčnikov in slabo prognozo hepatocelularnega raka (30, 36, 37).

Kalikeini (hK) so podskupina serinskih proteaz. Njihove vrednosti, izmerjene v serumu, se uporabljajo za diagnozo, prognozo in spremljanje raka prostate, dojke in jajčnikov (39).

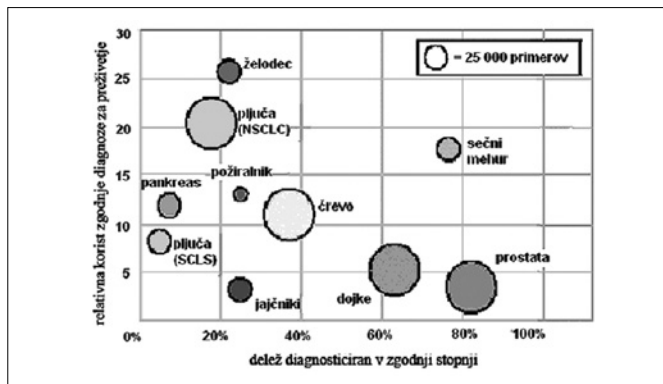
MMP in njihovi inhibitorji služijo predvsem pri diagnozi in spremljanju raka glave in vratu. Njihove povišane vrednosti v serumu nakazujejo slabo prognozo. Vrednosti TIMP-1 nam služijo pri diagnostiki in spremljanju napredovanja raka dojke, vrednosti TIMP-2 pa pri prognozi kolorektalnega raka (40, 41, 42, 43).

6 Zaključek

V luči sedanjega vedenja o vlogi proteaz pri malignih boleznih lahko sklepamo, da so proteaze in njihovi inhibitorji uporabni kot tumorski kazalci. Pri številnih tumorjih so zlasti vrednosti proteaz bistveno spremenjene in odražajo napredovanje bolezni, kar omogoča uporabo teh encimov v klinični praksi. Z njihovo uporabo lahko povečamo učinkovitost terapije pri bolj ogroženih bolnikih, po drugi strani pa se lahko izognemo zdravljenju manj ogroženih bolnikov. Trenutno zlasti standardizacija in poenotenje eksperimentalnih rezultatov, dobljenih v različnih kliničnih študijah pri različnih vrstah raka, predstavlja ključni problem, ki onemogoča široko uporabo proteaz in inhibitorjev kot tumorskih kazalcev. Določanje proteaz v telesnih tekočinah, zlasti serumu, je izredno primerno za tovrstne namene, vendar je vrednost proteaz v teh vzorcih veliko nižja kot v samem tumorskem tkivu. Imunološke metode z nizko mejo detekcije, ki temeljijo na uporabi monoklonskih protiteles, omogočajo takšno analizo. Da bi vpeljali določanje proteaz kot tumorskih kazalcev v telesnih tekočinah v klinično prakso, bi bile potrebne dodatne študije na večjih populacijah bolnikov, v katerih bi potrdili (ali ovrgli) njihovo uporabnost za napovedovanje diagnoze in prognoze ter določili prednosti pred že uveljavljenimi dejavniki.

7 Literatura

1. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 544-580.
2. Rawling ND, Rifkin E, Barrett AJ. MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 343-346.
3. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and Biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-195 .
4. Koblinski JE, Ahrm M, Sloane BF. Unravelling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 113-135 .
5. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
6. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Rev* 2006; 5: 785-799.
7. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; 290:205-218.
8. Turk V, Turk B. Lysosomal cystein proteases: facts and oportunities. *EMBO J* 2001; 20: 4629-4633.
9. Kos J, Lah T. Cystein proteases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer. *Oncol Rep* 1998; 5: 1349-1361.



Slika 3: *Relativna korist zgodnje diagnoze za preživetje (44). Relativna korist zgodnje diagnoze za preživetje je razmerje med 5-letno stopnjo preživetja pri diagnozi v zgodnji fazi bolezni in 5-letno stopnjo preživetja pri diagnozi v pozni fazi. Relativno korist zgodnje diagnoze za preživetje in delež diagnoz v zgodnji fazi predstavlja središče kroga. Površina vsakega kroga je sorazmerna številu diagnoz v ZDA v letu 2002.*

Picture 3: *Relative benefit of early diagnosis for survival (44). Relative benefit of early diagnosis for survival is the ratio between 5-years survival rate at diagnosis in the early phase and 5-years survival rate at diagnosis in the late phase. Relative benefit of early diagnosis for survival and degree of diagnosis in the early phase is represented by the center of the circle. The area of the circle is proportional to the overall number of diagnosis in USA in the year 2002.*

10. Premzl A. Vloga zunajceličnega in znotrajceličnega katepsina B pri invaziji in ožiljanju tumorjev. Doktorsko delo 2003.
11. Dash C, Kulkarni A, Dunn B, Rao M. Aspartatic peptidase inhibitors: Implication drug development. *Crit Rev Bioch Mol Biol* 2003; 38: 89-119.
12. Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Koster A, Hess B, Evers M, Von Figura K. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 1995; 14: 3599-3608.
13. Kageyama T. Molecular cloning, expression and characterization of an Ascaris inhibitor for pepsin and cathepsin E. *Eur J Biochem* 1998; 253: 804-809.
14. Davies B, Kearns IR, Ure J, Davies CH, Lathe R. Loss of hippocampal serine protease BSP1/neurosin predisposes to global seizure activity. *J Neurosci* 2001; 21: 6993-7000.
15. Scarisbrick IA, Blaber SI, Lucchinetti CF, Genanin CP, Blaber M, Rodriguez M. Activity of newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain* 2002; 125: 1283-1296.
16. Tsrirka SE, Rogove AJ, Bugge TH, Degen JL, Stickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17: 543-552.
17. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
18. Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases, Academic Press, San Diego 1998.
19. Kuropakt C, Duenne AA, Herz U, Renz H, Werner JA. Significant correlation of matrix metalloproteinases and macrophage colony-stimulating factor serum concentrations in patients with head and neck cancer. *Neoplasma* 2004; 5: 375-379.
20. Chambers AF, Matrisian LM. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89:1260-1270
21. Schmitt M, Jänicke F, Graeff H. Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* 1992; 6: 3-26
22. Mueller BM, Yu YB, Laug WE. Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid-/scid+ mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:205-209
23. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers. *Clinica Chimica Acta* 2004; 342: 41-69
24. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. Cystein proteaze and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int. J. Biol. Markers* 2000; 15: 84-89
25. Strojani P, Budihna M, Šmid L, Svetic B, Vrhovec I, Kos J, Škrk J. Prognostic significance of cysteine proteinase cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer research* 2000; 6: 1052.1062
26. Makarewicz R, Drewa G, Szymanski W, Skonieczna Makarewicz I. Cathepsin B, H and L in human breast carcinoma. *Neoplasma* 1995; 42: 21-24.
27. Kos J, Štabuc B, Schweiger A, Kračovec M, Cimerman N, Kopitar-Jerala N, Vrhovec I. Cathepsins B, H, L, and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1815-1822.
28. Nishida Y, Kohno K, Kawamata T, Morimitsu K, Kuwano M, Miyaka I. Increased cathepsin L levels in serum in some patients with ovarian cancer: comparison with CA125 and CA74-2. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 375-61.
29. Strojani P., Svetic B., Šmid L., Kos J. Serum Cystatin C in patients with head and neck carcinoma. *Clinica Chimica Acta* 2004; 344: 155-161
30. Zheng Q, Tang ZY, Yue Q, Shi DR, Song HY, Tang HB. Invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in relation to urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000; 126(11): 641-646
31. Kos J, Kračovec M, Cimerman N, Nielsen HJ, Christensen IJ, Brunner N. Cysteine proteinase inhibitors Stefin A, Stefin B and Cystatin C in sera from patients with colorectal cancer : relation to prognosis. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 505-511
32. Leto G, Turninelo FM, Pizzolanti G, Montallo G, Soresi M, Gebbia N. Lysosomal cathepsins B and L and stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncol* 1997; 54: 79-83.
33. Zore I, Krašovec M, Cimerman N, Kuhelj R, Werle B, Nielsen HJ, Brunner N, Kos J. Cathepsin B/cystatin C complex levels in sera from healthy donors and patients with benign and malignant lung and colorectal diseases. *Biol Chem* 2001; 382: 805-810.
34. Lah TT, Čerček M, Blejec A, Kos J, Gorodetsky E, Somers R, Daskal I. Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L and other clinical indicators. *Clinical cancer research* 2000; 6: 578-584
35. Fukuda ME, Iwadate Y, Machida T, Hiwasa T, Nimura Y, Nagai Y, Takiguchi M, Tanzawa H, Yamaura A, Seki N. Cathepsin D is a potential serum marker for poor prognosis in glioma patients. *Cancer research* 2005; 65(12): 5190-5194
36. Ho CH, Yuan CC, Liu SM. Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 1999; 75(3): 397-400
37. Gandonfo GM, Conti L, Vercillo M. Fibrinolysis components as prognostic markers in breast cancer and colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2155-2159
38. Grebenchtchikov N, Maguire TM, Riisbro R, Geurts-Moespot A, O'Donovan N, Schmitt M, McGreal G, McDermott E, O'Higgins N, Brunner N, Sweep CG, Duffy MJ. Measurement of plasminogen activator system components in plasma and tumor tissue extracts obtained from patients with breast cancer: an EORTC Receptor and Biomarker Group Collaboration. *Oncol Rep.* 2005; 14: 235-239
39. Diamandis EP, Jousef GM. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clinical Chemistry* 2002; 48(8): 1189-1205
40. Kuropakt C, Duenne AA, Herz U, Renz H, Werner JA. Significant correlation of matrix metalloproteinases and macrophage colony-stimulating factor serum concentrations in patients with head and neck cancer. *Neoplasma* 2004; 5 (51): 375-379
41. Wurtz S, Schrohl AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H Brunner N. Tissue inhibitor of Metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12: 215-227
42. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue inhibitor of MMP-1 is prognostic in head and neck squamous cell carcinoma: comparison of the circulating and tissue immunoreactive protein. *Clinical cancer research* 2005; 11(9): 3257-3264
43. Bing-Hui L, Peng Z, Shi-Zheng L, Yue-Ming Y, Mei H, Jin-Kun W. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *World journal of gastroenterology* 2005; 11(20): 3046-3050
44. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CI, et al. SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute 2002; 1973-1999.
45. Schweiger A, Christensen IJ, Nielsen HJ, Sorensen S, Bruenner N, Kos J. Serum cathepsin H as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer. *The Int. J. of Biol. Markers* 2004; 19: 289-294