

Rozprawa habilitacyjna

**ROLA INHIBITORA AKTYWATORA PLAZMINOGENU
TYPU 1 W REGULACJI AKTYWNOŚCI ANGIOGENNEJ
KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO
– IMPLIKACJE DLA REGULACJI POWSTAWANIA
PRZERZUTÓW NOWOTWOROWYCH DO PŁUC**

Joanna Chorostowska-Wynimko

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72

Oc[>fR>

Adres Redakcji: 01-138 Warszawa, ul. Płocka 26,
tel. (022) 43-12-108, fax. (022) 43-12408, e-mail: 3klinika@igichp.edu.pl

SPIS TREŚCI□	3
OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW	4
WSTĘP	5
Rola układu fibrynolitycznego w migracji komórki.....	5
Interakcja PAI-1 z witronektyną – rola w migracji komórki.....	7
Rola PAI-1 w procesach rozwoju guza nowotworowego.....	7
ZAŁOŻENIA PRACY	11
CELE PRACY□	13
MATERIAŁY□	14
Hodowle bakteryjne.....	14
Hodowle komórkowe	14
Inne odczynniki	14
METODY□	15
Ekspresja PAI-1 w komórkach kompetentnych.....	15
Izolacja białek PAI-1	15
Identyfikacja białek PAI-1	16
Hodowle komórkowe	17
Test angiogenezy <i>in vitro</i>	17
Przetwarzanie i analiza obrazu cyfrowego	17
Metoda ilościowej oceny uwalniania i produkcji urokinazy w hodowlach komórek śródbłonna.....	18
ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	19
WYNIKI	20
Transformacja komórek kompetentnych	20
Izolacja białek wPAI-1 i CysPAI-1	20
Ocena aktywności proteolitycznej białek PAI-1	21
Charakterystyka farmakokinetyczna białek PAI-1	22
Analiza aktywności białek PAI-1 w teście angiogenezy <i>in vitro</i>	22
Komórki ludzkie śródbłonna żyły pępowinowej	23
Komórki ludzkie śródbłonna kapilarnych naczyń płucnych	25
Wpływ białek PAI-1 na produkcję i uwalnianie urokinazy przez komórki śródbłonna	28
Komórki ludzkie śródbłonna żyły pępowinowej	28
Komórki ludzkie śródbłonna kapilarnych naczyń płucnych	29
OMÓWIENIE WYNIKÓW	31
Stabilizacja aktywnej konformacji białka PAI-1	31
Izolacja białek wPAI-1 i wariantów CysPAI-1	34
Ocena aktywności proteolitycznej i charakterystyka farmakokinetyczna białek PAI-1	34
Analiza aktywności białek PAI-1 w teście angiogenezy <i>in vitro</i>	34
Implikacje dla regulacji procesu formowania przerzutów do płuc	38
WNIOSKI	39
STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ	40
PIŚMIENNICTWO □	42

Objaśnienia skrótów

Cys	cysteina	PAI-2	inhibitor aktywatora plazminogenu typ 2, plasminogen activator inhibitor type 2
CysPAI-1	wariant inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 zawierający zamienniki cysteinowe	PLG	plazminogen,
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy	PL-R	receptor dla plazminy,
HLMVEC	komórki ludzkie śródbłonna kapilarnych naczyń płucnych, human lung microvascular endothelial cells	proMMP	prekursor metaloproteiny
HUVEC	komórki ludzkie śródbłonna żyły pępowinowej, human umbilical vein endothelial cells	pro-uPA	prekursor urokinazy
LPR	transbłonowy receptor dla α_2 -makroglobuliny	$T_{1/2}$	czas półtrwania
MMP	metaloproteinaza macierzy, matrix metalloprotease	tPA	tkankowy aktywator plazminogenu, tissue-plasminogen activator
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu typ 1, plasminogen activator inhibitor type 1	uPA	urokinazowy aktywator plazminogenu, urokinaza, urokinase-plasminogen activator
		uPAR	receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu, urokinase – plasminogen activator receptor

Wstęp

Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (*plasminogen activator inhibitor type-1*, PAI-1), należy do nadrodziny serpin (inhibitory proteiny serynowej, *serine proteinase inhibitors*) i jest produkowany przez ludzkie komórki jako jednołańcuchowa glikoproteina, zbudowana z 402 aminokwasów o wadze cząsteczkowej 45 000 Da (1). Jego zasadniczą funkcją w organizmie jest regulacja aktywności urokinazy i pośrednio powstawania plazminy (2). PAI-1 jest więc istotnym elementem homeostazy ustroju, wpływającym w warunkach *in vivo* na fizjologiczną równowagę układów krzepnięcia i fibrynolizy. Jego nieprawidłowa ekspresja stwierdzana jest w wielu procesach chorobowych, między innymi w miażdżycy naczyń krwionośnych, chorobie wieńcowej, sepsie, stwardnieniu rozsianym, włóknieniu płuc i nerek, otyłości oraz oporności na insulinę (3,4). Jednak podstawową patologią w patogenezie której PAI-1 odgrywa kluczową rolę jest szeroko rozumiana choroba nowotworowa, a więc przemiany dokonujące się w organizmie gospodarza i tkankach patologicznych w trakcie rozrostu i inwazji guza nowotworowego oraz powstawania przerzutów (2,5,6).

Wzrost i rozprzestrzenianie komórek nowotworowych oraz nierozłącznie z nimi związane procesy angiogenezy nowotworowej, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych pod wpływem mediatorów uwalnianych przez komórki guza, stanowią od dziesięcioleci przedmiot żywego zainteresowania naukowców. Zasadniczym celem prowadzonych badań jest poznanie mechanizmów rozwoju guza oraz wyjaśnienie rządzących nimi zależności, a w efekcie pozyskanie możliwości skutecznego hamowania postępu choroby. Wieloletnie badania nad mechanizmami działania PAI-1 w tych procesach pozwoliły lepiej zrozumieć naturę skomplikowanych interakcji w których białko to uczestniczy. Nadal jednak wyjaśnienia wymaga wiele zagadnień związanych z istotą jego regulacyjnej funkcji w tkankach oraz faktycznym znaczeniem zarówno właściwości anty-proteolitycznych, jak i aktywności biologicznej nie związanej z wpływem na proteiny (2,4,5).

Rola układu fibrynolitycznego w migracji komórki

Układ fibrynolityczny stanowi strukturę dynamiczną, a jej poszczególne elementy składowe pozostają w ścisłej zależności. Proces przekształcania plazminogenu do plazminy jest katalizowany przez

aktywatory – urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinaza, *urokinase-plasminogen activator*, uPA) oraz tkankowy aktywator plazminogenu (*tissue plasminogen activator*, tPA) działające wspólnie ze swoistym receptorem dla urokinazy (*urokinase-plasminogen activator receptor*, uPAR) i podlegające ścisłej kontroli ze strony swoich inhibitorów PAI-1, PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor type-2*) oraz neksyny (*nexin*), które zwrotnie regulują aktywność całego systemu (7, 8).

Patrz rycina I – kolorowa wkładka.

Fizjologiczne znaczenie układu fibrynolitycznego wynika z roli, jaką plazmina, proteinaza serynowa o szerokim spektrum działania pełni między innymi w regulacji trombolizy oraz kształtowaniu wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami, a macierzą zewnątrzkomórkową. Plazmina katalizuje degradację fibryny do rozpuszczalnych peptydów i odpowiada za usuwanie jej nadmiaru z układu krążenia oraz tkanek. Aktywnie hydrolizuje również wiele białek, w tym fibrynogen, lamininę oraz kolagen typu IV stanowiących podstawowe elementy strukturalne macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej naczyń. Ich rozpad dokonuje się zarówno na skutek bezpośredniego działania plazminy, jak i pośrednio poprzez jej działanie aktywujące wobec kaskady prekursorów metaloproteinaz – kolagenazy (MMP-1), stromielizyny (MMP-3) oraz żelatynazy B (MMP-9) (9). W warunkach *in vivo* plazminogen i plazmina obecne są w krwiobiegu (stężenie plazminogenu wynosi $\sim 2 \mu\text{M}$) oraz w macierzy na powierzchni komórek w kompleksie ze swoistym receptorem dla urokinazy (10).

Uważa się, że aktywacja plazminogenu za pośrednictwem tPA jest związana głównie z procesami rozpuszczania fibryny w obszarze urazu naczyniowego, a więc zachowaniem prawidłowej krzepliwości krwi. Natomiast uPA działając za pośrednictwem swoistego receptora komórkowego (uPAR) warunkuje wzmożoną aktywność plazminogenu na powierzchni komórek i inicjuje kaskadową reakcję proteolizy, która prowadzi do rozpadu wiązań pomiędzy białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz kontaktów międzykomórkowych i tworzy sprzyjające warunki dla migracji komórek (10).

Kluczowa rola urokinazy w procesie migracji w tkankach wynika również z jej bezpośredniego oddziaływania na komórki. Dzięki interakcji ze swoistym receptorem, uPA kumuluje się na ich powierzchni, przede wszystkim w miejscach kontaktu z macierzą (*focal adhesion*) (11, 12). Miejscem szczególnie silnej ekspresji uPA jest wiodący koniec komórki (*leading edge*), który nadaje

kierunek procesowi migracji. Intensywna punktowa koncentracja urokinazy prowadzi do wzmożonego powstawania plazminy, a następnie do uruchomienia procesów lokalnej destrukcji wiązań pomiędzy pobliskimi komórkami oraz bezpośrednio w samej macierzy komórkowej. Co więcej, w momencie przyłączenia urokinazy do uPAR dochodzi do odsłonięcia chemotaktycznego epitopu tego receptora i ujawnienia przez kompleks uPA-uPAR cech chemokiny o działaniu promigracyjnym, wpływającej na komórki w mechanizmie auto- i parakrynowym. Opisany mechanizm umożliwia zachowanie przez komórki ścisłej kontroli nad kierunkiem migracji. Jest on wykorzystywany zarówno przez komórki śródbłonna formujące zawiązki nowych naczyń krwionośnych, jak i komórki nowotworowe naciekające tkanki gospodarza (10).

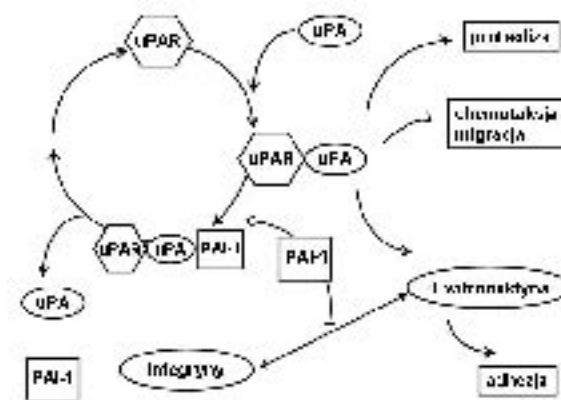
Urokinaza bierze również czynny udział w kolejnych etapach procesu przemieszczania się komórki – jej wydłużaniu, interakcji z integrzynami oraz w oddziaływaniu receptorów cząstek adhezyjnych zlokalizowanych na wiodącym końcu komórki z ich ligandami w macierzy. Równocześnie, na przeciwnym krańcu komórki (*trailing edge*) urokinaza katalizuje rozpad kompleksów pomiędzy integrzynami i ich ligandami, umożliwiając ponowną zmianę jej kształtu i przemieszczenie tylnego odcinka w kierunku zasadniczej struktury migrującej komórki (13).

W standardowych warunkach plazmina generowana przez urokinazę katalizuje degradację receptorów adhezyjnych i ich ligandów w macierzy. W ten sposób aktywnie hamuje procesy adhezji i interakcji komórka – komórka, bądź też komórka-macierz (14). Tymczasem silne powinowactwo uPAR do witronektyny, przy znacząco mniej wyrażonej swoistości względem fibronektyny i innych białek macierzy, sprzyja ujawnieniu się nietypowych pro-adhezyjnych właściwości urokinazy, nie związanych z jej aktywnością proteolityczną (15). Obecność urokinazy w kompleksie uPA-uPAR intensyfikuje oddziaływanie tego receptora z integrzynami oraz witronektyną ujawniając jego adhezyno-podobne właściwości (16). Dzięki temu do kontaktu migrującej komórki z otaczającymi strukturami może dochodzić zarówno za pośrednictwem integrzyn (kompleks uPA-uPAR-integryna) lub też w mechanizmie bezpośrednich interakcji pomiędzy receptorem, a macierzą (kompleks uPA-uPAR-witronektyna) (10). Umożliwia to efektywną i szybką regulację procesu adhezji komórki na jej obu krańcach, niezbędną dla zachowania prawidłowej sekwencji wydarzeń w trakcie migracji. Naprzemienne tworzenie i rozpad połączeń z macierzą jest warunkiem zainicjowania kolejnych etapów przemieszczania się komórki w tkankach. Urokinaza działając w powiązaniu ze swoistym

receptorem zlokalizowanym na powierzchni komórek, zyskuje więc wyjątkową chemokino-podobną charakterystykę, wszechstronnie regulując migrację, jak również związane z nią procesy zmiany kształtu komórek, adhezji, chemotaksji oraz inwazji macierzy zewnątrzkomórkowej.

Głównym fizjologicznym inhibitorem urokinazy jest inhibitor aktywatora plazminogenu typu-1 (PAI-1), który bezpośrednio wygasza jej aktywność proteolityczną i wydatnie skraca czas półtrwania.

Patrz rycina II – kolorowa wkładka.



Rycina III. Cykl przemian uPA-PAI-1 i jego związek z procesami migracji komórek

PAI-1 poprzez kompetycyjne oddziaływanie z witronektyną uniemożliwia interakcję uPA z uPAR, hamując w ten sposób zależne od urokinazy procesy adhezji i migracji (10, 17). PAI-1 efektywnie blokuje aktywność połączenia uPA-uPAR – tworzy z nim kompleks uPA-uPAR-PAI-1, a następnie w kooperacji z transbłonowym receptorem dla α_2 -makroglobuliny (*low-density lipoprotein-related-receptor*, LPR) stymuluje jego endocytozę (10). W cytoplazmie komórkowej dochodzi do rozpadu tego konglomeratu, po czym kompleks PAI-1-uPA podlega rozkładowi w lizosomach, a wolna postać uPAR gotowa do interakcji z kolejną cząstką urokinazy jest ponownie transportowana na powierzchnię błony komórkowej (Ryc. III) (18).

PAI-1 hamuje więc kolejne etapy procesu migracji komórek, zarówno poprzez bezpośrednie blokowanie aktywności proteolitycznej urokinazy, jak również przez indukowanie internalizacji kompleksu uPA-uPAR oraz wygaszanie jego działań chemokino- i adhezyno-podobnych. Równocześnie regulując „wtórny” obieg receptora uPAR, PAI-1 zyskuje pośredni wpływ na zapewnienie ciągłości cyklu adhezja-migracja-adhezja i staje się kluczowym elementem warunkującym prawidłową kolejność wydarzeń na obu krańcach migrującej komórki.

Interakcja PAI-1 z witronektyną – rola w migracji komórki

PAI-1 obok znaczącej aktywności anty-proteolitycznej charakteryzuje również wysokie powinowactwo względem witronektyny – jednego z głównych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Białko to będąc podstawowym ligandem macierzy dla komórek adherentnych, reguluje procesy ich różnicowania, proliferacji i morfogenezy (19). Witronektyna wysoce swoiście reaguje z integrzynami ($\alpha_v\delta_3$, $\alpha_v\delta_5$, $\alpha_v\delta_1$, $\alpha_{1b}\delta_3$, $\alpha_v\delta_6$, $\alpha_v\delta_8$) wspomagając tym samym adhezję, migrację i rozprzestrzenianie się komórek. Reguluje również kluczowy proces wybiórczego gromadzenia się uPAR w obszarze punktów adhezji (*focal adhesion*) na błonie komórkowej – miejscach pierwotnego, intensywnego kontaktu komórki z otoczeniem. Dzięki temu witronektyna czynnie uczestniczy w procesach rozpadu wiązań pomiędzy komórką, a macierzą oraz osłabienia integralności bariery, jaką stanowi błona podstawna. Za pośrednictwem wymienionych mechanizmów witronektyna wspomaga początkowy etap przemian koniecznych dla zapoczątkowania ruchu komórek, stanowiąc równocześnie element łączący promigracyjne struktury macierzy z podobną aktywnością układu urokinazy (20).

Poprzez swoiste oddziaływanie z integrzynami oraz bezpośrednią reakcję z uPAR witronektyna uczestniczy również w fazie przemieszczania się komórek przez otaczające struktury. Swoiście łącząc się z receptorem dla urokinazy, witronektyna blokuje zdolność komórek do adhezji na fibronektynie oraz fibrynogenie (15). Dodatkowo, białko to stymuluje szlaki transdukcji sygnałów dla czynników wzrostu, włączając kolejny synergistyczny mechanizm wspomagający ruch i proliferację komórek (21).

PAI-1 charakteryzuje się wysokim powinowactwem względem witronektyny i łączy się z nią działając kompetycyjnie względem uPAR i integrzyn (17, 22, 23). W ten sposób PAI-1 znajdujący się w kompleksie z witronektyną blokuje przyłączenie integrzyn i w konsekwencji hamuje adhezję oraz migrację komórek (24). W podobnym mechanizmie – współzawodnictwa z receptorem dla urokinazy, PAI-1 utrudnia adhezję i migrację zależną od uPA. Warto również podkreślić, że oddziaływanie z witronektyną powoduje spowolnienie spontanicznej konwersji PAI-1 do konformacji nieaktywnej i wydłużenie jego czasu półtrwania w porównaniu do postaci wolnej, bądź znajdującej się w kompleksie z uPA (20). Dzięki temu PAI-1 połączony z witronektyną wykazuje znacząco silniejszy efekt supresyjny względem migrujących komórek.

W efekcie wpływ PAI-1 na szeroko rozumiany proces przemieszczania się komórek w tkankach jest uzależniony od zachowania stanu delikatnej równowagi pomiędzy tym białkiem i kompleksem uPA-uPAR, a przede wszystkim od zapewnienia odpowiedniej intensywności i sekwencji wydarzeń prowadzących do zablokowania aktywności proteolitycznej urokinazy, rozpadu kompleksu uPA-uPAR i ponownej prezentacji tego receptora na powierzchni błony komórkowej. Kluczową regulacyjną rolę odgrywają również inne właściwości PAI-1 nie związane z jego aktywnością anty-proteolityczną, lecz z powinowactwem do witronektyny i integrzyn. Zgodnie z teorią przedstawioną przez Blasi i wsp. sygnałem startowym dla procesu migracji jest wzbudzenie chemotaktycznego epitopu uPAR oraz aktywacja proteolizy okołokomórkowej zależnej od plazminy (11). Wolne PAI-1 zapewnia regulację zwrotną tego mechanizmu. Blokując interakcję uPA-uPAR oraz oddziaływania witronektyny z integrzynami i z uPAR, PAI-1 skutecznie hamuje adhezję oraz ruch komórek. Równocześnie jednak, dokonująca się za sprawą PAI-1 wewnątrzkomórkowa redystrybucja receptora uPAR stwarza możliwość ponownego uruchomienia szlaku przewodzenia sygnałów zablokowanego po rozpadzie kompleksu uPA-uPAR, a w efekcie umożliwia ponowny kontakt uPA z receptorem, adhezję i migrację komórek.

Kluczowa rola PAI-1 w omawianych procesach wynika więc z jego działania regulacyjnego. Jako antagonistą urokinazy, PAI-1 w warunkach homeostazy efektywnie blokuje kolejne etapy przemian umożliwiających przemieszczanie się komórek w tkankach. Równocześnie uruchamia też mechanizmy pozwalające na ponowne wzbudzenie tych procesów, gwarantując w ten sposób zachowanie pomiędzy nimi dynamicznej równowagi. Oddziaływanie PAI-1 z uPA podlega więc ciągłym zmianom, a jego efekt zależy zarówno od ilościowej przewagi jednego z tych białek, jak i wpływu innych czynników biologicznych. Jednak to PAI-1 odpowiadając za zwrotną regulację jest fizjologicznym gwarantem ciągłości omawianych zjawisk.

Rola PAI-1 w procesach rozwoju guza nowotworowego

Udział PAI-1 oraz innych elementów układu fibrynolitycznego w regulacji rozwoju guza, jego ekspansji lokalnej i do odległych tkanek, jak również w procesach angiogenezy nowotworowej jest faktem powszechnie akceptowanym. Niektóre prace sugerują wręcz istnienie związku pomiędzy

wysokim potencjałem metastatycznym komórek nowotworowych, a nieprawidłową ekspresją szeregu genów, w tym również kodujących elementy składowe układu plazminogen – plazmina (25, 26).

Działanie samego PAI-1 ma charakter dwutorowy – poprzez hamowanie aktywatorów plazminogenu – tPA, a przede wszystkim urokinazy oraz poprzez udział w regulacji migracji komórek nowotworowych i komórek śródbłonna nowopowstających naczyń krwionośnych. Jednak wiarygodna interpretacja wielu właściwości biologicznych tego białka, obserwowanych w warunkach doświadczalnych *in vitro* oraz *in vivo* jest nadal bardzo trudna i wymaga dalszych pogłębionych badań.

Wymownym pozostaje fakt istnienia istotnej statystycznie zależności pomiędzy podwyższonym poziomem PAI-1 w surowicy chorych, a niekorzystnym rokowaniem w przebiegu raka płuca, sutka, jajników, nerek i żołądka (27-29). Brak zadowalającego wyjaśnienia tego fenomenu sprawia, że spektrum prezentowanych hipotez obejmuje zarówno sugestie o istotnym działaniu ochronnym, jak i pronowotworowym PAI-1.

PAI-1 i angiogeneza nowotworowa

Angiogeneza jest procesem polegającym na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych na bazie naczyń już istniejących. W warunkach fizjologicznych jest obserwowana w trakcie owulacji oraz gojenia ran, warunkuje również wzrost i ekspansję nowotworu, w tym formowanie przerzutów odległych (10).

Neowaskularyzację rozpoczyna zjawisko odcinkowego naruszenia ciągłości błony podstawnej, które dokonuje się w mechanizmie ukierunkowanej, punktowej proteolizy. Na następnym etapie dochodzi do uwolnienia komórek śródbłonna naczyniowego, ich reorientacji, migracji oraz proliferacji. Końcowa faza procesu powstawania nowych naczyń krwionośnych, obejmująca zmianę kształtu komórek, powstanie struktur kapilaro-podobnych i wreszcie właściwych naczyń jest również w dużym stopniu zależna od aktywnej proteolizy. Efektywność angiogenezy warunkuje więc adekwatna aktywność określonych elementów układu plazminogen – plazmina, przede wszystkim urokinazy, jej receptora oraz plazminy. Ponadto, dzięki unikalnej lokalizacji uPAR na powierzchni komórek, te same czynniki determinują biegunowy charakter ekspresji proteinaz i regulują przebieg proteolizy okolo-komórkowej, określając bezpośrednio kierunek formowania nowych naczyń.

Zahamowanie aktywności kompleksu uPA-uPAR przez fizjologiczne, bądź też syntetyczne inhibitory

efektywnie osłabia jego proangiogeny charakter (30, 31). Udowodniono, że zdolność PAI-1 do przyłączania i internalizacji kompleksów uPA-uPAR stanowi ważny fizjologiczny mechanizm chroniący komórki oraz macierz przed nadmiernym uszkodzeniem. Ponieważ bezpośrednio otoczenie nowych struktur kapilarnych charakteryzuje intensywna ekspresja uPA oraz znacząco wzmożona obecność PAI-1 wydaje się, że ochronne działanie PAI-1 przed nadmierną proteolizą obejmuje również nowopowstałe struktury naczyniowe (32, 33). Jednak dane doświadczalne dotyczące tego zagadnienia są w znacznej mierze niekonkluzywne, a w dostępnym piśmiennictwie znaleźć można wiele sprzecznych obserwacji dotyczących faktycznej roli PAI-1 w omawianych procesach.

Silne działanie hamujące PAI-1 obserwowano zarówno *in vitro* w teście zawiązków naczyniowych (*sprout formation assay*) (34, 35), jak również *in vivo* w teście zarodków kurzych (*chorioallantoic membrane assay*) oraz w modelu angiogenezy rogówkowej (36, 37). Ponadto Brodsky i wsp. wykazali znaczące podwyższenie potencjału angiogenego w hodowanych *ex vivo* naczyniach uzyskanych od myszy transgenicznym z niedoborem PAI-1 (38). Uzasadnione wydaje się więc przypuszczenie, że opisywany w tych pracach efekt hamujący PAI-1 był w dużej mierze wypadkową działania dwóch wspomnianych mechanizmów – hamowania aktywności proteinaz oraz wysokiego powinowactwa względem witronektyny.

Natomiast warunki panujące w mikrośrodoisku guza nowotworowego znacząco odbiegają od równowagi zachowywanej w warunkach fizjologicznych, pomiędzy czynnikami pro- i anty-angiogennymi oraz aktywatorami i inhibitorami układu fibrynolitycznego. Spontaniczny poziom ekspresji uPA jest zwykle istotnie wyższy w guzie niż w sąsiadujących komórkach prawidłowych lub też łagodnych rozrostach tej samej tkanki (39). Wiele prac wskazuje również na podwyższony poziom PAI-1, który jednak w przeciwieństwie do uPA nie koreluje z aktywnością angiogenną komórek nowotworowych (40).

Wspomniana nieprawidłowa ekspresja czynników wzrostu i elementów układu plazminogen – plazmina prowadzi do drastycznej zmiany warunków powstawania nowych naczyń w tkance nowotworowej (27). Charakteryzuje je duża dynamika wynikająca zarówno z rozchwiania ogólnoustrojowej oraz lokalnej homeostazy czynnościowej, jak również z indywidualnych cech fenotypu komórek nowotworu. Zmienność ta znajduje odzwierciedlenie w wynikach badań nad wpływem PAI-1 na angiogenezę nowotworową. Podczas gdy kluczowa

rola urokinazy i jej receptora jest na ogół uważana za pewnik, pozycja PAI-1 w tych procesach jest nadal dyskutowana.

W dostępnych publikacjach obserwowano zarówno jego efekt hamujący (41), stymulujący (42), jak i całkowity brak wpływu na proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych w guzie (43). Podobnie w badaniach prowadzonych z udziałem zwierząt transgenicznych PAI-1⁻/PAI-1⁻ wykazywano brak istotnych zmian w dynamice angiogenezy nowotworowej w warunkach niedoboru PAI-1 (44), bądź też jego negatywny (45) lub pozytywny wpływ (41).

Wydaje się, że źródłem tak poważnych rozbieżności jest wysoki stopień skomplikowania wzajemnych powiązań pomiędzy PAI-1, a pozostałymi elementami układu plazminogen – plazmina oraz białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, które dodatkowo podlegają znaczącemu działaniu cytokin i mediatorów uwalnianych przez komórki guza. Wspomniana złożoność oddziaływań w guzie znacząco utrudnia również odtworzenie w warunkach eksperymentu patologicznego środowiska tkankowego w jakim działa PAI-1. Warto więc pamiętać o licznych ograniczeniach technicznych stosowanych modeli *in vitro* i *in vivo* angiogenezy doświadczalnej, jak również o problemach wynikających z bardzo krótkiego czasu półtrwania natywnej formy PAI-1 ($T_{1/2}$ =60 minut) i z niezadowalającej stabilności uzyskanych dotąd zmodyfikowanych form PAI-1 (max $T_{1/2}$ =145 godzin) (1).

Wzrost guza i powstawanie przerzutów

Decydujący wpływ PAI-1 na procesy migracji komórek i angiogenezy obserwowany w warunkach fizjologicznych, jak również jego znacząca obecność w środowisku rozwijającej się tkanki nowotworowej przekonująco wskazują na aktywny udział inhibitora aktywatora plazminogenu w mechanizmach regulujących wzrost guza (2). Jednak badania analizujące efekty działania PAI-1 w tych procesach są, podobnie jak w przypadku mechanizmów kontrolujących przebieg angiogenezy nowotworowej, bardzo niejednoznaczne.

W warunkach doświadczeń *in vivo* wykazano, że nadmierna ekspresja PAI-1 u zwierząt transgenicznych prowadziła do zahamowania wzrostu wszczepionych podskórnie komórek nowotworowych (41, 46). Znane są też prace, w których podanie rekombinowanego PAI-1 myszom transgenicznym PAI-1⁻/PAI-1⁻ – było konieczne dla uzyskania rozwoju i progresji guza (42, 47). Krytyczną analizę przytoczonych wyników komplikują dodatkowo badania na modelach komórek B16 czerniaka mysiego oraz raka sutka, w których nie obserwowano

istotnych różnic w dynamice wzrostu guza pomiędzy grupą myszy PAI-1⁻/PAI-1⁻ i zwierzętami z nadmierną ekspresją PAI-1 (43, 44).

Tak znaczące rozbieżności pomiędzy przytoczonymi wynikami są prawdopodobnie związane z faktem, iż PAI-1 działa w bardzo skomplikowanym, wieloczynnikowym układzie biologicznym, który trudno odtworzyć w warunkach eksperymentu. Wysoka ekspresja uPA i PAI-1 w wielu tkankach zmienionych nowotworowo zdaje się potwierdzać, że w patomechanizmie wzrostu guza istotnym elementem jest zaburzenie stanu chwiejnej równowagi pomiędzy elementami układu fibrynolitycznego (27). Hipotetycznie, naruszenie naturalnej homeostazy może mieć więc dwojaki charakter – dominującej obecności uPA nie zrównoważonej, bądź też całkowicie zneutralizowanej przez nadmierną produkcję PAI-1. W obu sytuacjach obserwowana jest wzmożona ekspresja uPA oraz PAI-1 w tkankach, jednak ich efekt biologiczny jest całkowicie odmienny.

Wiele elementów powyższej tezy wydaje się potwierdzać praca McMahon i wsp., w której stwierdzono istnienie ścisłej zależności pomiędzy stężeniem PAI-1 i końcowym efektem jego działania na guz (22). W przeprowadzonych doświadczeniach autorzy wykazali, że niskiemu przedziałowi stężeń PAI-1 towarzyszył wzmożony wzrost guza, podczas gdy zwiększenie jego dawki pozwalało osiągnąć silny efekt hamujący. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone również przez innych badaczy (48). Wydaje się, że ilościowa przewaga białka PAI-1 może być czynnikiem ochronnym, sprzyjającym spowolnieniu procesów rozwoju tkanki nowotworowej.

Dodatkowym elementem utrudniającym interpretację badanych mechanizmów jest duże zróżnicowanie fenotypowe komórek nowotworowych, w tym również pod względem ekspresji białek układu plazminogen – plazmina. Przekonująco wykazywano, że komórki charakteryzujące się wysoką ekspresją uPA i uPAR cechuje podwyższona aktywność metastatyczna (25, 26, 49). Jednak późniejsze prace, analizujące poziom ekspresji wielu genów, w tym układu fibrynolitycznego, nie potwierdziły istnienia tak jednoznacznej zależności (10). Zauważono również, że poszczególne subpopulacje raka sutka wykorzystują odmienne mechanizmy naciekając sąsiadujące tkanki, w zależności od ich fenotypu i związanej z nim własnej spontanicznej produkcji czynników układu plazminogen – plazmina, a także struktury otaczającego je środowiska tkankowego (50).

Proces naciekania jest w równym stopniu efektem zdolności komórek nowotworowych do ruchu w przestrzeni macierzy zewnątrzkomórkowej,

jak i aktywnej penetracji tego środowiska, która dokonuje się przede wszystkim za sprawą proteolizy zależnej od plazminy (10). Zarówno uPA, jak i uPAR odgrywają kluczową rolę w mechanizmach syntezy plazminy oraz skupienia jej w ściśle określonych punktach na powierzchni błony komórkowej (*focal adhesion*), co zapewnia wyższą efektywność procesu inwazji. Wiadomo również, że pozostałe elementy układu plazminogen – plazmina, jak również integryny, składowe macierzy zewnątrzkomórkowej i wreszcie mechanizmy regulujące endocytozę receptorów mają istotne znaczenie dla ostatecznego osiągnięcia stanu równowagi w tkankach naciekanych przez nowotwór lub też jej braku. Efekt tych oddziaływań jest obserwowany w warunkach klinicznych pod postacią zróżnicowanej dynamiki ekspansji (progresji) guza, bądź też zahamowania tych procesów. Liu i wsp. udowodnili co prawda, że PAI-1 znacząco hamuje inwazyjność komórek raka płuca zależną od uPA oraz uPAR (51), jednak inni autorzy obserwowali jego promigracyjny wpływ na komórki czerniaka i raka sutka (50, 52).

Przebieg procesu powstawania przerzutów odległych jest w dużym stopniu zbliżony do wydarzeń zachodzących w naczyniach krwionośnych i tkankach okołonaczyniowych w trakcie miejscowej inwazji komórek guza oraz angiogenezy nowotworowej (inwazja komórek śródbłonna). Z reguły te same białka biorą udział w regulacji adhezji komórek metastatycznych do śródbłonna naczyniowego, w trawieniu błony podstawnej, a następnie w rozkładzie i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Istnieje wiele przekonujących dowodów, że katalizowana przez urokinazę reakcja powstawania plazminy odgrywa kluczową rolę w dynamizowa-

niu procesu powstawania przerzutów (29). Podobnie jednak, jak w przypadku omawianych procesów angiogenezy nowotworowej i wzrostu guza brak dowodów potwierdzających jednoznaczny supresyjny wpływ PAI-1 na aktywność metastatyczną komórek guza. Swierz i wsp. stwierdzili, że podanie PAI-1 myszom *scid/scid*, całkowicie hamowało wzrost ksenogenicznego przeszczepu komórek DU145 i LNCaP ludzkiego raka prostaty (35). Podobnie, transdukcja komórek czerniaka naczyniówki oka cDNA PAI-1 spowodowała spadek liczby myszy u których obserwowano obecność przerzutów o 50%, jak również doprowadziła do gwałtownego obniżenia masy zmian już istniejących w grupie zwierząt z bardziej zaawansowanym procesem chorobowym (53). Jednak, Eitzman i wsp. nie potwierdzili istnienia istotnych różnic pomiędzy liczbą przerzutów czerniaka mysiego do płuc w grupie zwierząt kontrolnych oraz transgenicznych z nadmierną ekspresją PAI-1 (43).

Pomimo przytoczonych sprzeczności, kluczowa rola PAI-1 w mechanizmach warunkujących rozwój guza oraz inwazyjność jego komórek, miejscową i odległą, wydaje się być bezsporna. Ewidentna jest również potrzeba prowadzenia dalszych badań, bardziej usystematyzowanych zarówno pod względem doboru fenotypu komórek i guzów nowotworowych stanowiących model doświadczalny, jak również charakterystyki biologicznej białek PAI-1 użytych do prowadzenia badań. Podstawowym problemem, często obniżającym wiarygodność badań jest bowiem relatywnie krótki w stosunku do trwania doświadczenia czas półtrwania PAI-1.

Założenia pracy

Niejednoznaczne wyniki badań doświadczalnych dotyczących wpływu PAI-1 na kluczowe elementy patomechanizmu rozwoju guza nowotworowego – migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, angiogenezę nowotworową, czy też wreszcie powstawanie przerzutów odległych pozostają w jaskrawej sprzeczności z doniesieniami o kluczowej stymulującej roli urokinazy w wymienionych procesach. Jej najsilniejszym fizjologicznym inhibitorem jest bowiem PAI-1, który łączy się z cząsteczką uPA szybko i z wysokim powinowactwem, efektywnie hamując jej podstawową funkcję – aktywność proteolityczną.

Tymczasem w doświadczalnych modelach zwierzęcych syntetyczne inhibitory urokinazy prezentują silne działanie przeciwnowotworowe (54). Billstrom i wsp. wykazali, że p-aminobenzamidyna hamowała, w stopniu wprost proporcjonalnym do zastosowanej dawki wzrost guza u myszy *scid*, którym wszczepiono komórki linii DU-145 raka gruczołu krokowego (55). Podobnie amylorid istotnie spowalniał powiększanie się guza i proliferację komórek przeszczepów transgenicznych pierwotnego raka wątroby, raka jelita grubego oraz linii LnCAP raka gruczołu krokowego u myszy *scid* (30, 56-58). Udowodniono również, że opisane supresyjne działanie inhibitorów uPA było w znacznym stopniu związane z ich aktywnością antyangiogenną (35, 45). Zablokowanie urokinazy znajdującej się w szczególnie dużym stężeniu w obrębie nowopowstających naczyń guza, powodowało skuteczne zahamowanie ich wzrostu i prowadziło do znaczącego spowolnienia rozwoju nowotworu.

Zagadnienie regulacyjnej roli PAI-1 w patomechanizmie angiogenezy i rozwoju guza nowotworowego stanowi od wielu lat przedmiot prac zespołu pod kierunkiem profesora J. Jankuna w Medical College of Ohio w Stanach Zjednoczonych, w którym miałam przyjemność pracować (28, 30, 31, 35, 46, 56, 59-64). Celem badań prowadzonych w ostatnich latach przez tę grupę było wyjaśnienie licznych wątpliwości związanych ze sprzecznymi doniesieniami dotyczącymi roli PAI-1 w patomechanizmie wzrostu guza i angiogenezy nowotworowej oraz uzyskanie odpowiedzi na pytania, w jakim stopniu wynikały one ze złożoności biologicznego układu doświadczalnego w którym PAI-1 działał, w jakim z innych poza efektem antyproteolitycznym właściwości PAI-1 i wreszcie jakie znaczenie miała jego charakterystyka kinetyczna warunkująca krótki okres pełnej aktywności wobec uPA i utrudniająca klarowną interpretację wyników w części badań doświadczalnych.

Zespół ten podjął między innymi prace nad uzyskaniem zmodyfikowanej postaci PAI-1 cechującej się przedłużoną w czasie aktywnością antyproteolityczną. Dokładna analiza struktury tego białka pozwoliła na postawienie hipotezy, że poprzez wprowadzenie odpowiednich mutacji punktowych do struktury pierwszorzędowej PAI-1 możliwe jest znaczące wydłużenie czasu jego półtrwania, a więc okresu w którym efektywnie reaguje z uPA. Przyjęto, że ocena wpływu zmienionych właściwości enzymatycznych na aktywność biologiczną PAI-1 ułatwiłaby zrozumienie mechanizmów jego działania oraz zweryfikowanie wymienionych na wstępie wątpliwości.

Cząsteczka PAI-1 jest w organizmie syntezowana jako związek o strukturze biologicznie aktywnej, który spontanicznie przechodzi do konformacji nieaktywnej z czasem półtrwania ($T_{1/2}$) około 60 minut w temperaturze 37°C (65). Zgodnie z najnowszymi badaniami struktura trzeciorzędowa cząsteczki PAI-1 jest zbliżona do budowy cząsteczek innych serpin i składa się z trzech harmonijek- β A, B i C, dziewięciu helis α oraz zawierającej miejsce aktywne (P4-P10') pętli zlokalizowanej po stronie karboksylowego końca cząsteczki (66). W aktywnym PAI-1 łańcuchy A3 i A5 nie są rozdzielone i tworzą jednorodną harmonijkę, podczas gdy pętla z miejscem aktywnym jest eksponowana na zewnątrz cząstki i gotowa do wysoce swoistego połączenia się z urokinazą.

Patrz rycina IV – kolorowa wkładka.

Natomiast w nieaktywnej postaci PAI-1 fragment pętli zlokalizowany bliżej jej końca anionowego wsuwa się do harmonijki – β , w zakresie od reszty P15 do P4 i tworzy centralny łańcuch A4, umiejscowiony pomiędzy łańcuchami 3 i 5 (2). W efekcie zarówno miejsce aktywne (P1-P1'), jak i wtórne miejsca kontaktu z urokinazą nie są dostępne dla tego enzymu.

Patrz rycina V – kolorowa wkładka.

Opisana konformacja jest termodynamicznie bardzo efektywna, co tłumaczy wysoką stabilność latentnej formy PAI-1 oraz jej brak aktywności antyproteolitycznej. Analizując strukturę obu konformacji PAI-1 założono, że poprzez zmniejszenie ruchomości łańcuchów A3 i A5, jak również ograniczenie giętkości obszaru helisy D możliwe jest zablokowanie przemieszczenia do wnętrza cząsteczki, pętli zawierającej miejsce aktywne dla urokinazy a co za tym idzie wydłużenie okresu stabilności postaci aktywnej i czasu jej półtrwania.

Zdecydowano również o podjęciu nowatorskiej próby stabilizacji aktywnej konformacji PAI-1

poprzez wprowadzenie do niej silnych wiązań kowalencyjnych, zamiast wykorzystywanych przez innych badaczy znacznie słabszych i mniej trwałych wiązań wodorowych. Opierając się na strukturze aktywnego PAI-1 wytypowano aminokwasy, których podstawienie przez zamienniki cysteinowe miało doprowadzić do powstania mostków dwusiarczkowych łączących górną i dolną część łańcuchów A3 i A5, jak również do utrwalenia pozycji helisy D – poprzecznie w stosunku do łańcuchów harmonijki A.

Patrz rycina VI – kolorowa wkładka.

Jako potencjalnie najefektywniejsze wybrano mutację do Cys aminokwasów z pozycji 31 oraz 97 (Val31, Ala97→Cys) w obrębie helisy D, która miała doprowadzić do powstania wiązania ograniczającego giętkość cząsteczki poprzez powiązanie jej anionowego końca do najbliższej helisy, mutację do Cys aminokwasów z pozycji 192 i 347 (Leu192, Val347→Cys) w celu ścisłego połączenie wiązaniem dwusiarczkowym obu łańcuchów A3 i A5 oraz mutację do Cys na pozycjach 197 oraz 355 (Gln197, Gl355→Cys), która dzięki mostkowi powstałemu w jej efekcie umożliwiałaby stabilizację wysuniętej pętli z miejscem aktywnym oraz zapobiegałaby jej wsunięciu się do wnętrza cząstki PAI-1. Zaprojektowano w sumie siedem wariantów zmodyfikowanych form PAI-1 różniących się liczbą i lokalizacją wprowadzonych wiązań dwusiarczkowych. Wykorzystując techniki analizy restrykcyjnej DNA, reakcji łańcuchowej polimerazy zaprojektowane mutacje wprowadzono do DNA PAI-1, następnie zweryfikowano sekwencję CysPAI-1 metodą Sangera, doko-

nano ich ligacji z wektorem plazmidowym pTYB12 i transformowano do komórek szczepu *Escherichia coli* ER 2567 metodą precypitacji chlorkiem rubidu (34).

Niniejsza praca jest praktyczną realizacją przedstawionej powyżej hipotezy, wstępnie potwierdzonej jedynie obliczeniami teoretycznymi i modelowaniem komputerowym, która zakładała możliwość uzyskania znacząco stabilniejszej konformacji aktywnego PAI-1 poprzez wprowadzenie do jego struktury zamienników cysteinowych i spontaniczne powstanie mostków dwusiarczkowych. Hipoteza ta została wstępnie przetestowana drogą obliczeń teoretycznych i modelowaniem komputerowym. Uzyskanie w ramach przeprowadzonych doświadczeń ekspresji oraz wyizolowanie zmodyfikowanych wariantów PAI-1 o przedłużonym czasie półtrwania pozwoliło na podjęcia badań nad znaczeniem aktywności anty-proteolitycznej PAI-1 dla jego regulacyjnej roli w patomechanizmie rozwoju nowotworu, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na podstawowy proces warunkujący wzrost guza i powstawanie przerzutów – angiogenezę. Przeprowadzona następnie analiza interakcji PAI-1 z komórkami śródbłonna naczyniowego o różnej charakterystyce czynnościowej, w tym z komórkami endotelium kapilarów płucnych, które pełnią kluczową rolę w procesie formowania przerzutów nowotworowych w płucach, umożliwiła dokonanie unikalnych obserwacji na temat wpływu PAI-1 i procesów proteolizy na aktywność angiogenną tych komórek, bardzo istotnych z punktu widzenia miejscowej i odległej inwazyjności guza nowotworowego.

Cele pracy

1. uzyskanie w komórkach kompetentnych ekspresji zmodyfikowanych białek PAI-1 zawierających podstawniki cysteinowe oraz ich izolacja w czystej postaci
2. dokonanie analizy aktywności anty-proteolitycznej i właściwości kinetycznych zmodyfikowanych białek PAI-1 w porównaniu do natywnej formy PAI-1
3. ocena aktywności biologicznej zmodyfikowanych białek PAI-1 wobec komórek śródbłoka naczyniowego o zróżnicowanym fenotypie czynnościowym w teście angiogenezy *in vitro*.
4. zbadanie wpływu zmodyfikowanych form PAI-1 na produkcję i uwalnianie urokinazy przez komórki śródbłoka naczyniowego o zróżnicowanym fenotypie czynnościowym

Materialy

Hodowle bakteryjne

Komórki

ER 2567 Escherichia coli transformowane plazmidem pTYB12-PAI-1 (New England Laboratories, USA)
TUNER (DE3)pLacI (Novagen, USA)

Podłoża hodowlane

Podłoże Luria-Bertoni (Fisher Scientific, USA)
Ampicylina (Fisher Scientific, USA)
Na-Hepes (Fisher Scientific, USA)
PMSF (Fisher Scientific, USA)
PBS (Fisher Scientific, USA)
EDTA (Fisher Scientific, USA)
MgCl₂ (Fisher Scientific, USA)
DNaza wolna od proteinaz (New England Laboratories, USA)
IPTG (Fisher Scientific, USA)

Hodowle komórkowe

Komórki

Ludzkie komórki śródbłonna żyły pepowinowej (HUVEC) (Cambrex Inc. East Rutheford, NJ, USA)
Ludzkie komórki śródbłonna kapilarów płucnych (HLMVEC) (Cambrex Inc. East Rutheford, NJ, USA)

Podłoża hodowlane

EBM-2MV - podłoże zawierające hFGF-B, VEGF, R³-IGF-1, hEGF (Cambrex Inc. East Rutheford, NJ, USA)
Podłoże SOC (New England Laboratories, USA)
RPMI 1640 (GIBCO, USA)
Płyn Hanksa (GIBCO, USA)
PBS bez jonów Ca i Mg (GIBCO, USA)

Odczynniki

Żelatyna wieprzowa (Fisher Scientific, USA)
Trypsyna (Gibco, USA)
Agaroz (Fisher Scientific, USA)
Fibrynogen ludzki (typ III, 60% białka zdolnego do krzepnięcia) (Fisher Scientific, USA)
Trombina ludzka (Sigma, USA)
Barwiony standard do SDS-PAGE zakres 20,7–103,0 kDa (BIO-RAD Laboratories, USA)
Wzorzec DNA – 1kB DNA ladder (New England BioLabs, USA)
NdeI (New England BioLabs, USA)
SacI (New England BioLabs, USA)

Inne odczynniki

Urokinaza o niskim ciężarze cząsteczkowym (LMW uPA) (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA)
Przeciwciała kozie przeciw ludzkiemu PAI-1 (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA)
SPECTROZYME (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA)
Zestaw Immubind uPA ELISA (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA)
DTT (Fisher Scientific, USA)
NaCl (Fisher Scientific, USA)
EDTA (Fisher Scientific, USA)
Glukoza (Fisher Scientific, USA)
Tris (Fisher Scientific, USA)
Albumina wołowa (Sigma, USA)
Glukoza (Fisher Scientific, USA)
Glicerol (Fisher Scientific, USA)
Błękit bromofenolu (Fisher Scientific, USA)
Merkaptoetanol (Fisher Scientific, USA)

Metody

Ekspresja PAI-1 w komórkach kompetentnych

Rycina VII – patrz kolorowa wkładka.

Izolacja DNA plazmidu pTYB12-PAI-1

Komórki szczepu ER 2567 *Escherichia coli* transformowane wektorem pTYB12-PAI-1 wysiewano na płytce Petri pokryte agarem z domieszką ampicyliny (100 µg/ml) i inkubowano w temperaturze 37°C. Następnie pojedynczą kolonię przenoszono do probówki zawierającej podłoże Luria-Bertoni (LB) z dodatkiem ampicyliny i hodowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C, stale mieszając. Izolacji DNA plazmidu pTYB12-PAI-1 z transfekowanych komórek szczepu ER 2567 *E.coli* dokonywano metodą lizy alkalicznej. Po odwirowaniu (1', 12 000 g, 4°C), peletkę komórkową zawieszano w 100 µl roztworu I (50 mM glukozy, 25mM Tris-HCl; pH=8,0, 10 mM EDTA pH=8,0) o temperaturze 4°C, ponownie wirowano, dodawano 200 µl roztworu II (0,2 NaOH, 1% SDS) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 150 µl roztworu III (5 M octan potasu, lodowy kwas octowy, woda destylowana) o temperaturze 4°C i ponownie inkubowano przez 5-10 minut w temperaturze 40°C. Po odwirowaniu (10', 12 000 g), nadsącz przenoszono do nowej probówki, dodawano 0,5 ml izopropanolu, wirowano (10', 12 000 g) i zawieszano peletkę w 300 µl etanolu, ponownie wirowano (10', 12 000 g, 4°C) i odparowywano resztki alkoholu. DNA zawieszano w wodzie destylowanej i przechowywano w -20°C.

Transformacja komórek kompetentnych

Komórki TUNER (DE3)pLacI po uprzednim delikatnym wymieszaniu, inkubowano z plazmidem DNA na lodzie przez 5 minut, następnie ogrzewano w łaźni wodnej przez 30 sekund w temperaturze 42°C i ponownie inkubowano na lodzie przez 2 minuty. Po dodaniu podłoża wzrostowego SOC komórki hodowano w temperaturze 37°C, stale mieszając przez 60 minut, po czym wysiewano na podłoże agarowe z domieszką ampicyliny (100 µg/ml) i inkubowano w temperaturze 37°C. Następnego dnia pojedyncze kolonie przenoszono do probówek zawierających podłoże Luria-Bertoni (LB) z dodatkiem ampicyliny i hodowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C, stale mieszając.

Analiza restrykcyjna DNA

Oczyszczone DNA trawiono enzymami NdeI, SacI przez 2 godziny w temperaturze 37°C, następnie zawieszono w buforze (Tris, lodowy kwas octowy, 0,5 M EDTA; pH=8,0) poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym (100mV, 60 minut). Kontrolę stanowił wzorzec DNA zawierający fragmenty DNA w przedziale 0,5-10 kD.

Izolacja białek PAI-1

Uzyskiwanie ekstraktu białkowego

Do 1 litra świeżo przygotowanego jałowego podłoża Luria-Bertoni z dodatkiem ampicyliny wszczepiano kulturę *E.coli* i hodowano w temperaturze 37°C stale mieszając, aż do uzyskania wartości 0,6 gęstości optycznej mierzonej dla fal świetlnych o długości 600 nm. Ekspresję PAI-1 stymulowano w hodowli przez dodanie izopropyl-β-D-1-tiogalaktopyranozydu (IPTG) w końcowym stężeniu 0,5 mM. Po uzyskaniu wymaganej gęstości hodowli komórki odwirowywano, dwukrotnie płukano w PBS, a później w buforze lizującym o temperaturze 4°C (20 mM Na-HEPES, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 20 µM PMSF, 5mM MgCl₂, 10 µg DNazy wolnej od proteinaz (pH=8,0)). Następnie komórki zawieszano w 30 ml buforu lizującego i miażdżono na prasie francuskiej. Resztki komórek oddzielano za pomocą wirowania, a nieoczyszczoną zawiesinę białek zamrażano w temperaturze -20°C.

Chromatografia powinowactwa

Białka PAI-1 izolowano na kolumnie charakteryzującej się wysokim powinowactwem do inteiny. Kolumnę wypełnioną zawiesiną 30 ml kulek chitynowych przepłukiwano buforem I (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1mM EDTA (pH=8.0) (przepływ 0,5 ml/min) w ilości odpowiadającej 10-krotnej objętości łożyska kolumny (przepływ 1,0 ml/min), a następnie opłaszczano białkami zawartymi w ekstrakcie uzyskanym z 1 L hodowli bakteryjnej (przepływ 0,5 ml/min). By usunąć białka nieopłaszczono na chitynie, kolumnę ponownie płukano buforem w ilości odpowiadającej 20-krotnej objętości łożyska kolumny (przepływ 2,0 ml/min). W końcowym etapie kolumnę przepłukiwano szybko trzema objętościami buforu odcinającego (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50mM DTT (pH=8.0) (przepływ 2 ml/min), po czym inkubowano przez 40 godzin w temperaturze 4°C. Białko wypłukane

z kolumny buforem I, zbierano w 8 ml frakcjach, a następnie zagęszczano metodą wirowania stosując filtry z membraną o punkcie odcięcia 5 kD (Millipore, USA).

Średnia ilość uzyskanego w ten sposób białka wynosiła 1-2 mg na 1L hodowli bakteryjnej.

Jonowa chromatografia wymienna

Wykorzystując różnice w charakterystyce izoelektrycznej dokonano dalszej izolacji białka PAI-1. Zawiesinę uprzednio oczyszczonych i zagęszczonych białek w buforze (25 mM Tris-HCl pH=8,00) PAI-1 przefiltrowywano przez kolumnę Vivapure S (Sartorius AG, Niemcy) przepłukaną uprzednio samym buforem, wirując przez 5 min 500x g. Następnie kolumnę dwukrotnie płukano czystym buforem. Oczyszczone białko PAI-1 wypłukiwano z kolumny metodą stopniowej elucji solą (0,25-1 M NaCl w 25 mM Tris-HCl; pH=8,00), następnie płukano w PBS i zagęszczano wirując na kolumnach z filtrem o punkcie odcięcia Mw 5000. Białko PAI-1 wykorzystywano do dalszych doświadczeń, lub natychmiast zamrażano w porcjach w temperaturze -20°C.

Metoda sekwencjonowania białek

Sekwencjonowanie białek wykonano przy współpracy z Protein Structure Facility, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan przy użyciu systemu Applied Biosystems (ABI) model 420 H.

Identyfikacja białek PAI-1

Elektroforeza białek w 10% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Ekstrakt białkowy hodowli bakteryjnej oraz oczyszczone białka PAI-1 zawieszano w buforze (0,5 M Tris-HCl; pH=6,80, 10% glicerol, 10% SDS, 0,1% błękit bromofenolu, 2,7 mM β-merkaptotanol) poddawano elektroforezie w 10 % żelu poliakrylamidowym (75 mV, 4 godziny). Następnie żel zanurzano w roztworze barwiącym na okres 1 godziny w temperaturze pokojowej i poddawano działaniu roztworu odbarwiającego podczas całkowitej inkubacji.

Analiza białek PAI-1 metodą Western blot

Białka PAI-1 poddawano analizie elektroforetycznej w 10% żelu poliakrylamidowym. Następnie żel inkubowano przez 5 minut w buforze transportowym (20% metanolu, 193 mM glicyny,

25 mM Tris-HCl), po czym oddziałując napięciem 100 V przez okres 2 godzin dokonywano przeniesienia białek z żelu na membranę nitrocelulozową (0,45 μm). Membranę płukano w buforze blokującym (PBS (pH=7,4), 0,05% Tween), inkubowano przez 60 minut w 5% roztworze odtłuszczonego mleka krowiego w temperaturze pokojowej i następnie płukano. Membranę przez kolejnych 60 minut poddawano działaniu przeciwciał kozich skierowanych przeciw ludzkiemu PAI-1 w stężeniu 5 μg/ml buforu (PBS (pH=7,4), 0,05% Tween, 1% albuminy bydlęcej). Następnie, po wypłukaniu i 60 minutowej inkubacji w roztworze 1:2000 przeciwciał skierowanych przeciw immunoglobulinie koziej sprzężonych z peroksydazą chrzanową zawieszonych w buforze (PBS (pH=7,4), 0,05% Tween, 1% albuminy bydlęcej), membranę ponownie płukano i poddawano działaniu substratu dla peroksydazy chrzanowej (roztwór 1:10 3,3'-cztetrochloru dwuaminobenzydiny) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję zatrzymywano płuczając membranę wodą destylowaną. Następnie membranę suszono.

Test tworzenia kompleksów uPA/PAI-1

20 μl roztworu 2,0 mg/ml urokinazy (LMW uPA) w buforze (50 mM Na₃PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH=7,0) zmieszano z 40, 50 i 60 μl roztworu 2,0 mg/ml PAI-1 w buforze i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki poszczególnych zawiesin poddawano analizie metodą analizy elektroforetycznej w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach nieredukcyjnych. Żel zanurzano w roztworze barwiącym na okres 1 godziny w temperaturze pokojowej i poddawano następnie działaniu roztworu odbarwiającego podczas całkowitej inkubacji.

Metoda określania czasu półtrwania białek PAI-1

Badane białka PAI-1 zawieszano w buforze (150 mM NaCl, 50mM Tris (pH=7,5), 100 μg albuminy wołowej) i inkubowano w temperaturze pokojowej. Oceny aktywności anty-proteolitycznej białek PAI-1 dokonywano za pomocą testu chromogenego. Mieszano równe objętości (50 μl) badanego białka PAI-1 i urokinazy o niskim ciężarze cząsteczkowym (25 IU/ml), po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano 100 μl substratu SPECTROZYME i ponownie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze 37°C. Następnie w odstępach 15 sekundowych przez okres 15 minut dokonywano kolejnych pomiarów gęstości optycznej dla fal świetlnych o długości 405 nm. Stopień

zahamowania aktywności urokinazy obliczano porównując szybkość reakcji w układzie kontrolnym i w obecności białka PAI-1. Zmiany procentowego wskaźnika aktywności PAI-1 w czasie wyrażano na wykresie za pomocą równania wykładnikowego $y=ae^{-bx}$, gdzie a odpowiada amplitudzie, b – stałej rozkładu (k_{obs}). Czas półtrwania poszczególnych białek wyliczano z równania $T^{1/2}=(\ln 2)/k_{obs}$.

Metoda oceny swoistej aktywności inhibicyjnej białek PAI-1

Pomiaru swoistej aktywności inhibicyjnej białek PAI-1 skierowanej przeciw urokinazie dokonywano za pomocą testu chromogennego. Seryjne rozcieńczenia badanego białka PAI-1 (0,22-1,35 nM) zawieszono w buforze (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH=7,5), 100 µg albuminy wołowej) mieszano z równą objętością urokinazy o niskim ciężarze cząsteczkowym (50 IU/ml) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie, przez dodanie substratu SPECTROZYME w stężeniu docelowym 0,17 mM określano resztkową aktywność urokinazy dokonując w odstępach 30 sekundowych przez okres 15 minut pomiaru gęstości optycznej dla fal świetlnych o długości 405 nm. Swoistą aktywność inhibicyjną PAI-1 obliczano określając stężenia aktywnego białka PAI-1, które powodowało 50% zahamowanie aktywności urokinazy w porównaniu do układu kontrolnego. Wartość referencyjną określano na podstawie pomiaru aktywności samej urokinazy.

Metoda oceny stałej hamowania (K_i) białek PAI-1

Stalą hamowania dla badanych białek PAI-1 określono przy pomocy testu chromogennego metodą seryjnych rozcieńczeń substratu SPECTROZYME. Równe objętości PAI-1, LMW uPA (12,5 IU/ml) i substratu SPECTROZYME zawieszono w buforze (50 mM Tris (pH=8,80), 0,01% Tween 80) mieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dokonywano pomiaru gęstości optycznej dla fal świetlnych o długości 405 nm. Stałą K_i wyliczano za pomocą wykresu Lineweaver-Burke.

Hodowle komórkowe

Komórki śródbłonka hodowano w butelkach hodowlanych na podłożu stałym z 1,5% żelatyny w standardowych warunkach podłoża płynnego EGM-2MV do uzyskania wzrostu konfluentnego w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

Test angiogenezy *in vitro*

Przygotowanie agregatów komórek śródbłonka

Komórki śródbłonka hodowano w standardowych warunkach podłoża EBM-2MV, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ do uzyskania konfluentnego wzrostu. Następnie komórki poddawano działaniu trypsyny, zawieszano w stężeniu 2×10^6 /ml medium hodowlanego EBM-2MV, wysiewano na płytki hodowlane Petri pokryte 0,5% roztworem agarozą i inkubowano w warunkach podłoża EBM-2MV, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Po 24 godzinach zawiesinę agregatów komórkowych przenoszono do konikalnej próbówki i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie podłoże zlewano, zawieszając agregaty w 5 ml świeżego EBM-2MV.

Przygotowanie żelu fibrynowego

Trójwymiarowy żel fibrynowy przygotowywano w 12-dołkowych płytkach hodowlanych przez zmieszanie 960 µl roztworu ludzkiego fibrynogenu zawieszono w stężeniu 2,5 mg/ml RPMI 1640, 40 µl zawiesiny agregatów komórek śródbłonka oraz 12,5 µl ludzkiej trombiny zawieszono w stężeniu 25 IU/ml RPMI 1640. Po ostrożnym zmieszaniu zawiesinę inkubowano przez 4-5 minut w temperaturze 37°C celem przyspieszenia tworzenia żelu, a następnie pokrywano 1 ml podłoża hodowlanego EBM-2MV. Badane białka PAI-1 dodawano do zawiesiny, tak by ich stężenie w żelu wynosiło 0,75 µM, 1,5 µM lub 3,0 µM. Po 72 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ podłoże odsysano i hodowle utrwalano *in situ* przez dodanie na okres 24 godzin 2 ml 10% roztworu formaliny. Następnie obrazy hodowli agregatów zapisywano metodą cyfrową wykorzystując aparat sprzężony z mikroskopem fazowo-kontrastowym.

Przetwarzanie i analiza obrazu cyfrowego

Analizy cyfrowego zapisu obrazów dokonano przy pomocy programu komputerowego Scion Image (National Institute of Health, USA). Obrazy cyfrowe hodowli agregatów komórek śródbłonka stanowiły zapis wyjściowy, który poddawano analizie binarnej pozwalającej na skontrastowanie struktur zawiązków naczyńniowych w stosunku do podłoża. Następnie dokonywano pomiaru długości i powierzchni zawiązków naczyńniowych, wyrażając uzyskane wielkości w pikselach. Opisana metoda dokonywania pomiarów pozwalała jedynie na okre-

ślenie parametrów przestrzeni dwuwymiarowej, podczas gdy poddane analizie zawiązki naczyniowe były strukturami trójwymiarowymi. Z tego względu pomiaru zawiązków utworzonych przez poszczególne agregaty komórkowe dokonywano wykonując kolejne ujęcia struktur dokonane na różnych poziomach pola mikroskopu. Analizowano przynajmniej pięć agregatów w każdym z zastosowanych układów doświadczalnych – dla poszczególnych stężeń badanych białek PAI-1. Ze względu na warstwowy charakter analizy obrazu poszczególnych zawiązków liczba dokonanych pomiarów była jednak z reguły wyższa. W efekcie proces powstawania zawiązków naczyniowych charakteryzowano określając średnią całkowitą długość zawiązków jednostkowego agregatu, średnią długość i średnią powierzchnię jednostkowego zawiązka naczyniowego w danym układzie doświadczalnym. Wskaźnik redukcji badanych parametrów zawiązków naczyniowych (długości bądź powierzchni) obliczano według wzoru $x=100\% \times (1-a/b)$, gdzie x – wskaźnik redukcji, a – wartość oznaczona dla zawiązków naczyniowych hodowanych w obecności białek PAI-1, b – wartość oznaczona dla zawiązków naczyniowych w hodowlach kontrolnych bez białek PAI-1.

Metoda ilościowej oceny uwalniania i produkcji urokinazy w hodowlach komórek śródbłonna

Przygotowanie homogenatów i nadsączy hodowli komórkowych

Komórki śródbłonna wysiewano do 24-dołkowych płytek i hodowano w warunkach podłoża EBM-2MV, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ do uzyskania konfluentnego wzrostu. Następnie hodowle dwukrotnie płukano medium pozbawionym surowicy bydłowej i po dodaniu świeżego, pełnego medium oraz badanych białek PAI-1 w docelowych stężeniach 0,75 μM, 1,5 μM, 3,0 μM inkubowano przez okres 12 godzin w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂. Następnie nadsącz zbierano i zamrażano w temperaturze -20°C. Komórki poddawano trypsynizacji, następnie liczone, homogenizowano i zamrażano w temperaturze -20°C.

Pomiar stężenia antygeny urokinazy w homogenatach komórek i nadsączach hodowli

Stężenie antygeny urokinazy oceniano ilościową metodą immunoenzymatyczną Elisa, dokonując pomiarów przy użyciu zestawu gotowych odczynników, zgodnie z zaleceniami producenta. Stężeniami referencyjnymi były kolejne rozcieńczenia ludzkiej urokinazy

Uzyskane wyniki przeliczono w zależności od liczby komórek izolowanych z danej hodowli i przedstawiono jak ng/10⁴ komórek śródbłonna.

Analiza statystyczna wyników

Wyniki badań opracowano statystycznie wyliczając średnie wartości (\bar{x}) oraz odchylenie standardowe (SD). Wpływ badanych białek oceniano przy pomocy analizy wariancji ANOVA oraz testu t -Studenta dla zmiennych niezależnych.

Wartość $p < 0.05$ przyjmowano za znamienne statystycznie.

Obliczeń dokonano posługując się programem SPSS dla MS WINDOWS.

WYNIKI

Transformacja komórek kompetentnych

Celem pierwszego etapu prac było uzyskanie ekspresji zmodyfikowanych białek CysPAI-1 w hodowlach komórek kompetentnych oraz ich izolacja w czystej postaci. W tym celu DNA plazmidów pTYB12-PAI-1 poszczególnych CysPAI-1 oraz wPAI-1 otrzymane z transformowanych komórek *E.coli* wykorzystano do transformacji komórek kompetentnych TUNER zawierających w swoim genomie gen polimerazy T7.

Następnie, aby osiągnąć maksymalną efektywność planowanej izolacji białek, transformowane komórki kompetentne wysiano na podłoże z domieszką ampicyliny i wykorzystując obecność genu oporności na ten antybiotyk w plazmidzie pTYB12 uzyskano pojedyncze kolonie pochodzące od jednej komórki kompetentnej. Metodą analizy restrykcyjnej DNA zidentyfikowano kolonie transformowanych komórek kompetentnych charakteryzujące się najsilniejszą ekspresją zmodyfikowanego DNA poszczególnych CysPAI-1 oraz wPAI-1, przyjmując je następnie jako podstawę do prowadzenia hodowli bakteryjnych.

Izolacja białek wPAI-1 i CysPAI-1

Hodowle wyodrębnionych kultur komórek transformowanych stymulowano izopropylo- β -D-1-tiogalaktopyranozydem, standardowym induktorem bezinteresownym, inicjującym wzmożoną transkrypcję zmodyfikowanych białek PAI-1. Uzyskany w wyniku ich homogenizacji ekstrakt białkowy poddano wstępnej analizie metodą elektroforezy w 10% żelu poliakrylamidowym, jak również metodą Western blot przy pomocy swoistych przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw ludzkiemu PAI-1.

Patrz ryciny VIII i X – kolorowa wkładka.

Analiza białek osadzonych na membranach nitrocelulozowych wykazała, że w ekstrakcie białkowym obecny był dodatnio wybarwiony prążek o ciężarze molekularnym $M_r = 90$ kD, który mógł odpowiadać kompleksowi inteina – PAI-1. Poszczególne ekstrakty białkowe zawierające wPAI-1 lub zmodyfikowane formy CysPAI-1 poddano następnie jednostopniowemu procesowi oczyszczania metodą chromatograficzną na kolumnie wiążącej inteinę.

W celu określenia efektywności dokonanej izolacji kolejne frakcje białka wyplukiwane z kolumny

wstępnie analizowano stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Barwienie metodą Coomassie-Brilliant-Blue potwierdziło, że kolejne frakcje numer 3-5 zawierają dwa dominujące prążki odpowiadające białkom o masie molekularnej 43 oraz 78 kDa.

Patrz rycina IX – kolorowa wkładka.

Pomiar intensywności wybarwienia prążków metodą densytometryczną wykazał, że reprezentują one odpowiednio 70,7% ($M_r = 43$ kDa) oraz 26,7% ($M_r = 78$ kDa) białek uwidocznionych na żelu. Pozostały odsetek (2,6%) stanowiły trzy niewielkie prążki o zróżnicowanej masie molekularnej.

Do identyfikacji białka o masie 43 kDa, odpowiadającej masie cząsteczkowej PAI-1, wykorzystano barwienie immunohistochemiczne metodą Western blot z zastosowaniem swoistych przeciwciał skierowanych przeciw ludzkiemu PAI-1. Bezpośrednia analiza frakcji uzyskanych z kolumny wykazała obecność dodatniej reakcji pomiędzy użytym przeciwciałem, a białkiem tworzącym prążek o masie molekularnej 43kDa, potwierdzając tym samym, że jest ono tożsame z ludzkim PAI-1.

Patrz rycina X – kolorowa wkładka.

Równolegle podjęto próbę identyfikacji białka tworzącego prążek odpowiadający masie molekularnej 78 kDa (Ryc IX). Jego obecność stwierdzano w roztworze białkowym wyplukiwanym z kolumny w trakcie każdej z przeprowadzonych izolacji, niezależnie od rodzaju zmodyfikowanej cząstki PAI-1. Sformułowano wstępną hipotezę badawczą zakładając, że omawiany dodatkowy prążek odpowiada zdimeryzowanej postaci wPAI-1 lub poszczególnych zmodyfikowanych wariantów CysPAI-1. Hipotetyczna masa molekularna dimeru PAI-1 wynosiłaby bowiem 86 kDa i byłaby zbliżona do wartości 78 kDa reprezentowanej przez dodatkowy prążek. Dimeryzacja jest naturalną, spontaniczną reakcją zachodzącą w trakcie procesu formowania się zmutowanych postaci białka do którego cząsteczki wprowadzono zamienniki warunkujące powstanie dodatkowych wiązań modyfikujących jego konformację.

Jednak w badaniu metodą Western blot nie wykazano w obrębie analizowanego prążka dodatniej reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciw ludzkiemu PAI-1 (Ryc X). W tej sytuacji zastosowano nowatorską metodę jonowej chromatografii wymiennej i dokonano rozdziału obu białek wykorzystując odmienną charakterystykę PAI-1 (zmodyfikowanych wariantów białka lub natywnej postaci) oraz niezidentyfikowanego białka o $M_r = 78$ kDa.

Patrz rycina XI – kolorowa wkładka.

1	*	20	*	40	Białko 78kDa
AAKDKVFKGN	DARVKMLARGV	N	LGPKGRNVVL	DKSFGAPTIT	GroEL
MAAKDKVFKGN	DARVKMLARGV	NVLADAVKVT			

Ryc. XII Zgodność początkowych sekwencji aminokwasów białka o masie molekularnej $M_r = 78$ kD i białka opiekuńczego typu *GroEL*

Oczyszczoną frakcję o masie molekularnej 78 kD poddano następnie analizie metodą sekwencjonowania białek, potwierdzając całkowity brak zgodności z sekwencją aminokwasów charakterystyczną dla PAI-1. Wykazano natomiast, że uszeregowanie pierwszych 20 aminokwasów tworzących strukturę tego białka jest identyczne z sekwencją aminokwasów 2-21 cząsteczki białka opiekuńczego typu Hsp60 GroEL (*Hsp60 GroEL chaperone*) (Ryc. XII).

Ocena aktywności proteolitycznej białek PAI-1

Wstępnej oceny aktywności enzymatycznej oczyszczonych postaci natywnej oraz zmodyfikowanych form PAI-1 dokonano z zastosowaniem testu tworzenia kompleksów. Analiza elektroforetyczna w żelu poliakrylamidowym wykazała, że po 30 minutach inkubacji w zawiesinie poszczególnych wariantów PAI-1 i urokinazy pojawiał się dodatkowy prążek odpowiadający masie molekularnej 77 000 Da. W ten sposób potwierdzono, że każda z wyizolowanych postaci PAI-1 była zdolna do reakcji i tworzenia kompleksu z urokinazą. W żelu widoczne były również prążki o masie 43 kDa i 33 kDa reprezentujące, odpowiednio PAI-1 oraz lekki łańcuch urokinazy (LMW uPA).

Patrz rycina XIII – kolorowa wkładka.

Dodatnie barwienie przeciwciałami anty-PAI-1 w technice Western blot potwierdziło, że dodatkowy prążek o masie cząsteczkowej 77 kDa odpowiadał stabilnemu kompleksowi LMW uPA/PAI-1.

Głównym celem wstępnego etapu pracy było stworzenie zmodyfikowanych wariantów CysPAI-1 charakteryzujących się wyższą niż postać natywna stabilnością konformacji aktywnej, a więc dłuższym czasem półtrwania. Kluczowym badaniem w tej fazie pracy była więc ocena dynamiki zmian aktywności anty-proteolitycznej – skierowanej przeciw urokinazie. Pomiarów aktywności inhibicyjnej każdej z badanych form PAI-1 wobec uPA dokonano wykorzystując test chromogenny.

Stwierdzono znaczne zróżnicowanie tempa spadku aktywności inhibicyjnej charakteryzującego poszczególne formy CysPAI-1 (Ryc. XIV) (Tab I),

co pozwoliło na orientacyjne wyróżnienie trzech wzorców zmian reaktywności badanych CysPAI-1 w czasie.

Tab I Czas półtrwania zmodyfikowanych postaci białka PAI-1

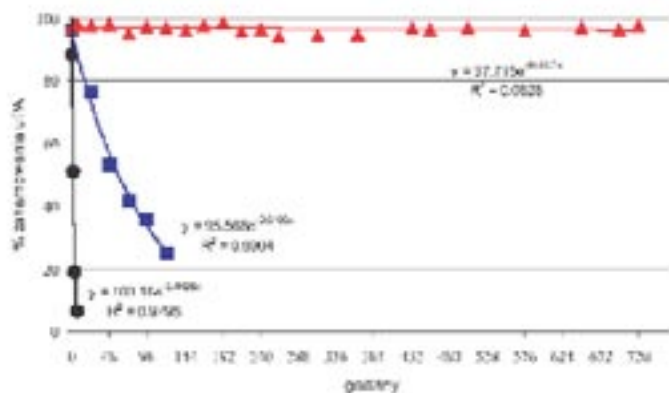
Białko	Stała rozpadu (k_{obs})	Czas półtrwania ($T_{1/2}$) (godziny)
wPAI	-0.4428	1.57
helix D β sheet TB	-0.2967	2.34
helix D	-0.0315	22
helix D β sheet T	-0.0109	63.59
helix D β sheet B	-0.0076	91.2
β sheet TB	-0.0049	141.46
β sheet B	-0.0035	198.04
β sheet T	-0.0001*	6931.47*

* wartość obliczona hipotetycznie ze względu na brak istotnego spadku aktywności białka w trakcie obserwacji

Pierwsza grupa do której należała zmodyfikowana postać hD β TB CysPAI-1 – zawierająca mutacje punktowe w obrębie helisy D oraz górnym i dolnym fragmencie harmonijki- β (helix D β -sheet Top Bottom, hD β TB), charakteryzowała się niską stabilnością cząsteczki. Aktywność anty-proteolityczna tego wariantu spadała gwałtownie, w tempie zbliżonym do typowego dla wPAI-1. Obliczony czas jego półtrwania wynosił 2,34 godziny, podczas gdy w PAI-1 – 1,57 godziny.

Kolejną grupę modyfikowanych form PAI-1 stanowiły trzy warianty białka – hD CysPAI-1 z mutacjami tylko w obrębie helisy D (helix D, hD), hD β T CysPAI-1 z podstawnikami cysteinowymi w helisie D oraz górnym odcinku harmonijki- β (helix D β -sheet Top, hD β T), a także hD β B CysPAI-1 z mutacjami w helisie D oraz u podstawy harmonijki- β (helix D β -sheet Bottom, hD β B). Cechowała je umiarkowanie wydłużona w czasie zdolność do wchodzenia w reakcję z urokinazą. Czas półtrwania wyliczony dla tych postaci różnił się znacząco i wahał w przedziale od 22 do 91,2 godziny.

Do trzeciej grupy należały zmutowane postaci CysPAI-1 o bardzo znacząco wydłużonej w czasie aktywności anty-proteolitycznej wobec uPA – wariant zawierający mutacje w obu odcinkach harmonijki- β , β TB CysPAI-1 (β -sheet Top Bottom, β TB) oraz postaci z wiązaniami u podstawy harmo-



Ryc XIV Spadek aktywności zmodyfikowanych postaci PAI-1 względem urokinazy na przestrzeni czasu oceniany w teście chromogennym • – wPAI-1, ■ – helix D β sheet T, ▲ – β sheet T

nijki- β , β B CysPAI-1 (β -sheet Bottom, β B), a także w jej odcinku górnym β T CysPAI-1 (β -sheet Top, β T). Dla dwóch postaci (β TB, β B) czas półtrwania wydłużył się w porównaniu do wPAI-1 o około 100 razy, jednak ze względu na unikalne parametry kinetyczne największe znaczenie miał wynik uzyskany dla wariantu β T PAI-1. Przez cały czas trwania eksperymentu – 700 godzin nie wykazano istotnego spadku aktywności inhibicyjnej tego białka wobec uPA. Wynosiła ona średnio $97 \pm 3\%$ wartości mierzonej dla kontroli, a wyliczony czas półtrwania tego wariantu białka PAI-1 wyniósł 6 900 godzin.

Charakterystyka farmakokinetyczna białek PAI-1

Dalszej analizie poddano jedynie dwa spośród siedmiu zmodyfikowanych białek CysPAI-1, charakteryzujących się umiarkowanie przedłużonym oraz najdłuższym czasem półtrwania – odpowiednio białko hD β T CysPAI-1 z podstawnikami cysteinowymi w helisie D oraz górnym odcinku harmonijki- β ($T_{1/2} = 63,59$ godzin) oraz postać β T CysPAI-1 z dwoma mutacjami punktowymi w górnym odcinku harmonijki- β ($T_{1/2} = 6931,47$ godzin). Ich właściwości farmakokinetyczne porównano z wartościami kontrolnymi wyznaczonymi w tych samych układach doświadczalnych dla natywnego białka PAI-1 ($T_{1/2} = 1,57$ godzin).

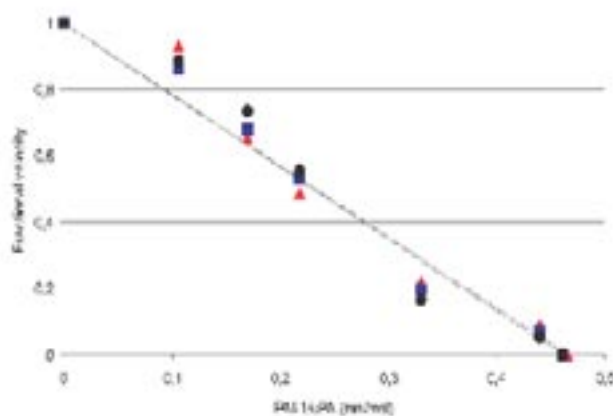
Stała hamowania (K_i) wyznaczona dla każdego z badanych białek PAI-1 za pomocą analizy metodą Lineweaver-Burke były zbliżona. Ich wartość wynosiła dla wPAI-1 – $1,39 \times 10^{-7}M$, dla hD β T CysPAI-1 – $1,68 \times 10^{-7}M$, oraz dla β T CysPAI-1 – $1,64 \times 10^{-7}M$ (Ryc XV). Swoista aktywność inhibicyjna badanych białek wyznaczona względem urokinazy o niskim

ciężarze molekularnym (LMW uPA) była również porównywalna i wynosiła dla wPAI-1 – $63,13 IU/\mu g$, dla hD β T CysPAI-1 – $54,14 IU/\mu g$ oraz dla β T CysPAI-1 – $50,17 IU/\mu g$.

Analiza aktywności białek PAI-1 w teście angiogenezy *in vitro*

Komórki śródbłoka naczyniowego hodowane w warunkach zbliżonych do środowiska macierzy zewnątrzkomórkowej mnożą się i różnicują tworząc struktury naśladujące budowę naczyń kapilarnych.

Proces ten jest określany mianem angiogenezy w warunkach *in vitro*. W niniejszej pracy dla określenia aktywności biologicznej wykorzystano test tworzenia zawiązków naczyniowych (*sprout formation assay*) w którym ocenie podlega zdolność do tworzenia wypustek naczyniowych przez zagregowane komórki śródbłoka zawieszono w trójwymiarowym żelu fibrynowym. Agregaty komórkowe były hodowane przez 72 godziny w obecności rosnących stężeń badanych białek PAI-1. Na podstawie wcześniejszych badań arbitralnie przyjęto, że minimalnym zastosowanym stężeniem PAI-1 będzie $0,75 \mu M$ (35).



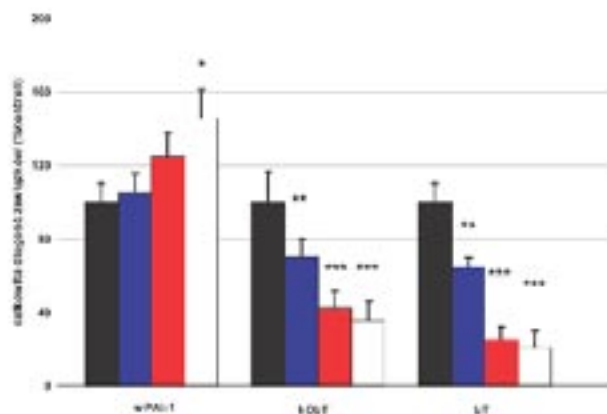
Ryc XV Stoichiometryczny charakter hamowania aktywności urokinazy przez białka CysPAI-1. • – wPAI-1, ■ – helix D β sheet T, ▲ – β sheet T

Komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)

Komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej należą do typowych pod względem czynnościowym komórek śródbłonna naczyń i z tego względu posłużyły w niniejszej pracy jako model referencyjny dla oceny wpływu badanych białek na aktywność angiogenną w warunkach doświadczalnych *in vitro*.

Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 na aktywność angiogenną komórek HUVEC (Ryc XVI-XIX)

Obie zmodyfikowane formy PAI-1 wpływały hamująco w sposób zależny od dawki na zdolność agregatów komórek HUVEC do tworzenia związków naczyniowych, którą oceniano badając ich wpływ na całkowitą długość pączków w jednostkowym agregacie



Ryc XVI Wpływ wPAI-1 i zmodyfikowanych postaci CysPAI-1 (hDβT i βT PAI-1) na tworzenie związków naczyniowych przez komórki HUVEC w teście angiogenezy *in vitro*. Oceniano działanie rosnących stężeń PAI-1 ■ – kontrola, ■ – 0,75 µM, ■ – 1,5 µM, □ – 3,0 µM. Dane przedstawiają średnią wartość z trzech doświadczeń. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

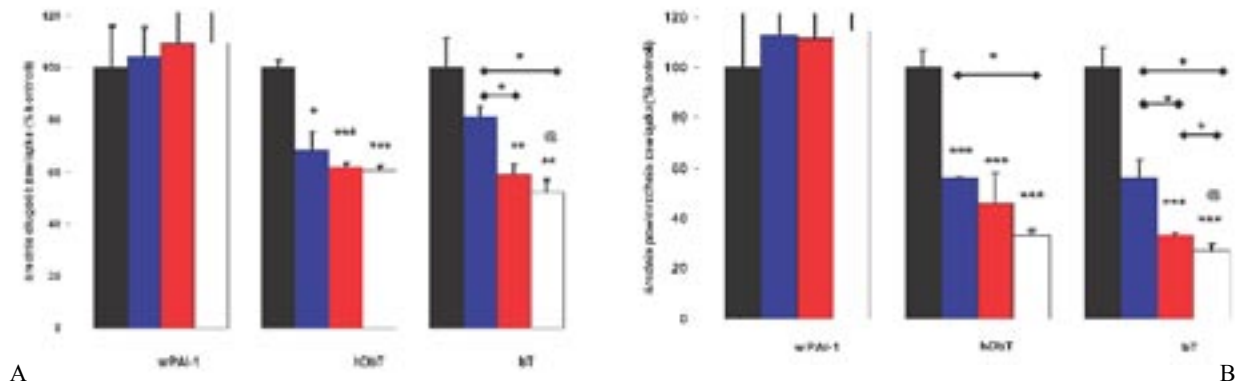
Najsilniejsze działanie supresyjne proporcjonalne do zastosowanej dawki wykazywała zmodyfikowana postać βT CysPAI-1 o stabilnej aktywności anty-proteolitycznej. Białko hDβT CysPAI-1 również charakteryzowało się działaniem antyangiogennym, lecz o mniejszym nasileniu. W hodowlach komórek HUVEC poddanych działaniu natywnej postaci PAI-1 wraz ze wzrostem stężenia tego białka w żelu fibrynowym stwierdzano znamienne przyrost całkowitej długości związków naczyniowych.

Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 na morfologię pączków naczyniowych tworzonych przez zagregowane komórki HUVEC (Ryc XVII-XIX)

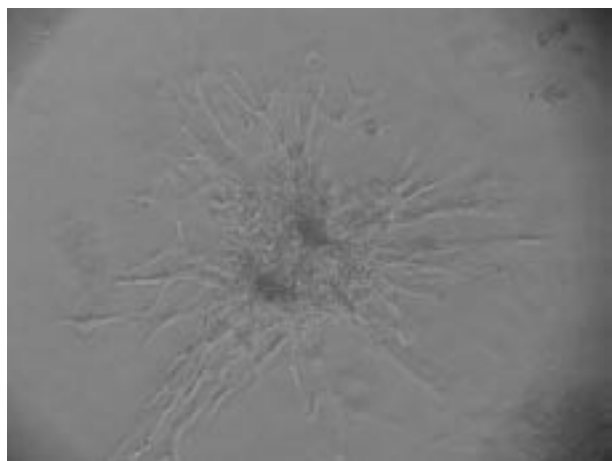
W ramach niniejszej pracy dokonano również oceny wpływu badanych białek PAI-1 na strukturę powstających związków naczyniowych. W warunkach doświadczalnych tak agregaty komórek, jak i związki naczyniowe są strukturami trójwymiarowymi, natomiast zastosowana metoda pomiaru z wykorzystaniem zapisu cyfrowego pozwalała jedynie na ocenę parametrów dwuwymiarowych. Analizie poddano więc długość i powierzchnię utworzonych związków.

Wykazano, że zmodyfikowane białka PAI-1 znacząco zmieniały budowę związków naczyniowych tworzonych w ich obecności przez komórki śródbłonna. Proporcjonalnie do zastosowanej dawki obniżeniu uległa średnia długość związków oraz ich powierzchnia. Znacząco silniejszym działaniem charakteryzowało się białko βT CysPAI-1 dla którego maksymalny wskaźnik redukcji średniej długości wyniósł $47,88\% \pm 4,93$ w porównaniu do $39,41\% \pm 1,71$ dla białka hDβT CysPAI-1. Podobnie maksymalny wskaźnik redukcji średniej powierzchni związka naczyniowego wyniósł $72,26\% \pm 2,22$ dla białka βT CysPAI-1 w porównaniu do $66,1\% \pm 2,215$ dla białka hDβT Cys PAI-1. Średnia powierzchnia związka naczyniowego była więc parametrem znacząco bardziej zmienionym niż jego długość – odpowiednio $72,26\% \pm 2,22$ i $48,88\% \pm 4,93$ dla białka βT CysPAI-1 oraz $66,1\% \pm 2,215$ i $39,41\% \pm 1,71$ dla białka hDβT CysPAI-1.

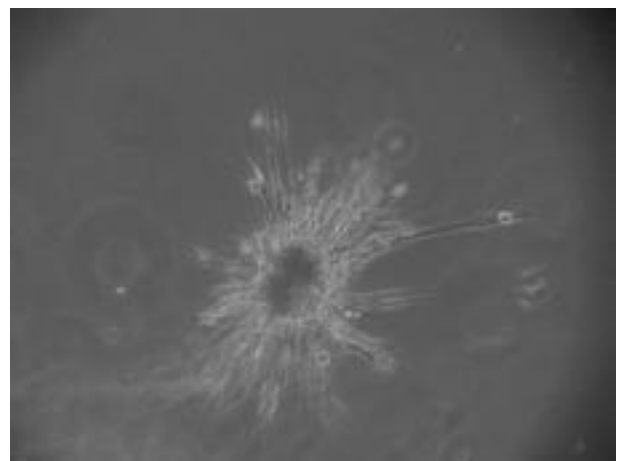
Natywna postać PAI-1 nie zmieniała w znaczący statystycznie sposób wartości badanych parametrów, choć obserwowano powiększenie wartości średniej długości i powierzchni związka naczyniowego tworzonych przez agregaty komórek HUVEC – odpowiednio $109,3\% \pm 19,33$ i $114,4\% \pm 16,948$.



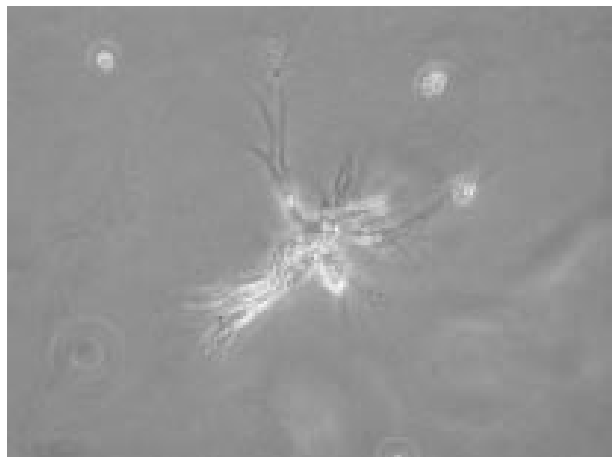
Ryc XVII Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 (hDβT i βT PAI-1) na kształt zawiązków naczyniowych tworzonych przez komórki HUVEC w teście angiogenezy *in vitro*. Zmianę kształtu oceniano jako: A) średnią długość zawiązka B) średnią powierzchnię zawiązka. Oceniano działanie rosnących stężeń PAI-1 ■ – kontrola, ■ – 0,75 μM, ■ – 1,5 μM, □ – 3,0 μM. Dane przedstawiają średnią wartość z trzech doświadczeń ● p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 vs kontrola, @ p<0,01 vs komórki poddane działaniu hDβT PAI-1.



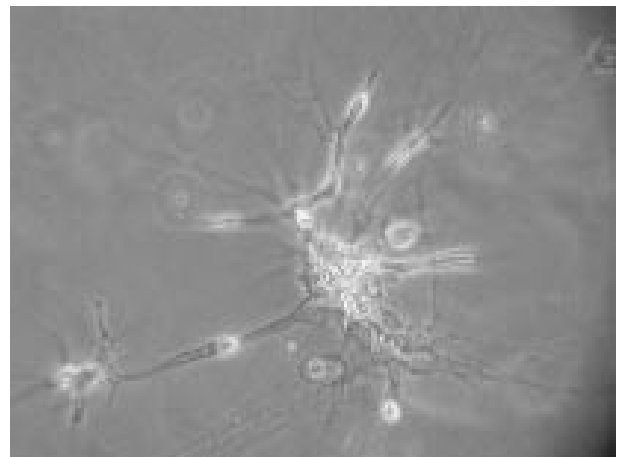
A) Kontrola



B) 0,75 μM wPAI-1

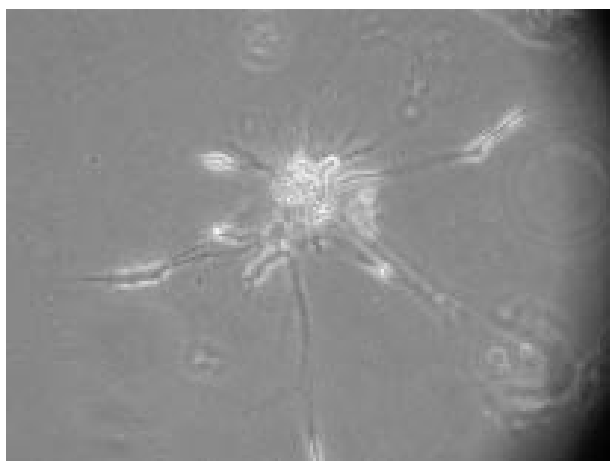


c) 1,5 μM wPAI-1

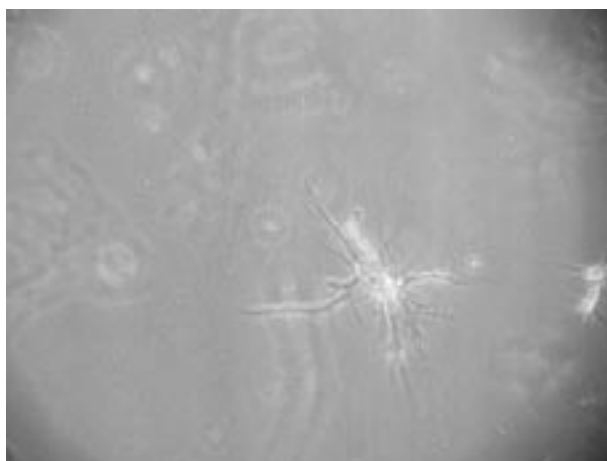


B) 3,0 μM wPAI-1

Ryc XVIII Agregaty komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej hodowane w obecności rosnących stężeń natywnej postaci PAI-1.



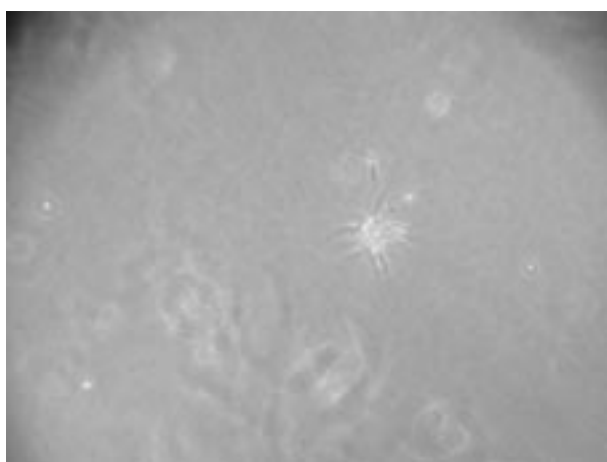
A) Kontrola



B) 0,75 μM βT CysPAI-1



C) 1,5 μM βT CysPAI-1



D) 3,0 μM βT CysPAI-1

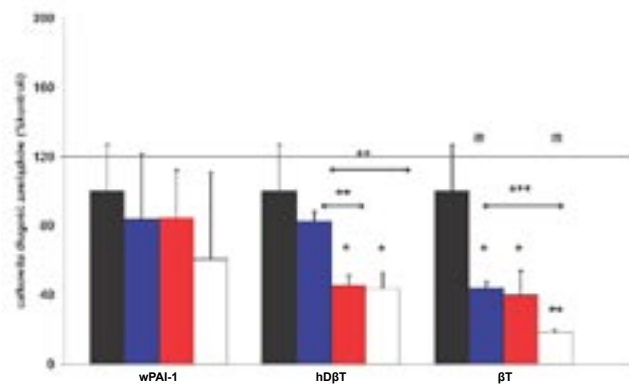
Ryc XIX Agregaty komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej hodowane w obecności rosnących stężeń postaci βT CysPAI-1 charakteryzującej się niezmienną w czasie aktywnością anty-proteolityczną.

Komórki śródbłonna ludzkich kapilarnych naczyń płucnych (human lung microvascular endothelial cells, HLMVEC)

Komórki śródbłonna ludzkich kapilarnych naczyń płucnych izolowane, jak wskazuje nazwa z naczyń włosniczkowych płuc cechuje wyjątkowa charakterystyka czynnościowa, wynikająca między innymi ze szczególnej roli jaką pełnią w procesach interakcji pomiędzy tkanką płuc, a zawartymi we krwi białkami i komórkami, w tym metastatycznymi komórkami nowotworowymi. Sugeruje się, że jednym z elementów tej charakterystyki jest znacząco wyższa w porównaniu z innymi komórkami śródbłonna produkcja urokinazy.

Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 na aktywność angiogenną komórek HLMVEC (Ryc XX-XXIII)

W wykonanych doświadczeniach wykorzystano ten sam doświadczalny model angiogenezy *in vitro*, co w badaniach nad komórkami HUVEC. Stwierdzono, że zmodyfikowane białka CysPAI-1 znacząco hamowały aktywność angiogenną komórek śródbłonna kapilarów płucnych ocenianą za pomocą parametru średniej całkowitej długości związków naczyniowych tworzonych przez pojedynczy agregat, zarówno w porównaniu do kontroli, jak i komórek hodowanych w obecności natywnej formy PAI-1. Co więcej, supresyjny wpływ białka βT CysPAI-1 o stałej aktywności anty-proteolitycznej był we wszystkich użytych stężeniach znamienny statystycznie, począwszy od dawki 0,75 μM (wskaźnik redukcji 56,26 % ±3,77), aż po 3,0 μM (wskaźnik redukcji 81,57%±1,06). Jego największe



Ryc XX Wpływ wPAI-1 i zmodyfikowanych postaci CysPAI-1 (hDβT i βT PAI-1) na tworzenie zawiązków naczyniowych przez komórki w teście angiogenezy *in vitro* HLMVEC. Oceniano działanie rosnących stężeń ■ – kontrola, ■ – 0,75 μM, ■ – 1,5 μM, □ – 3,0 μM. Dane przedstawiają średnią wartość z trzech doświadczeń. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, @ p<0,01 w stosunku do komórek poddanych działaniu hDβT PAI-1 w identycznym stężeniu.

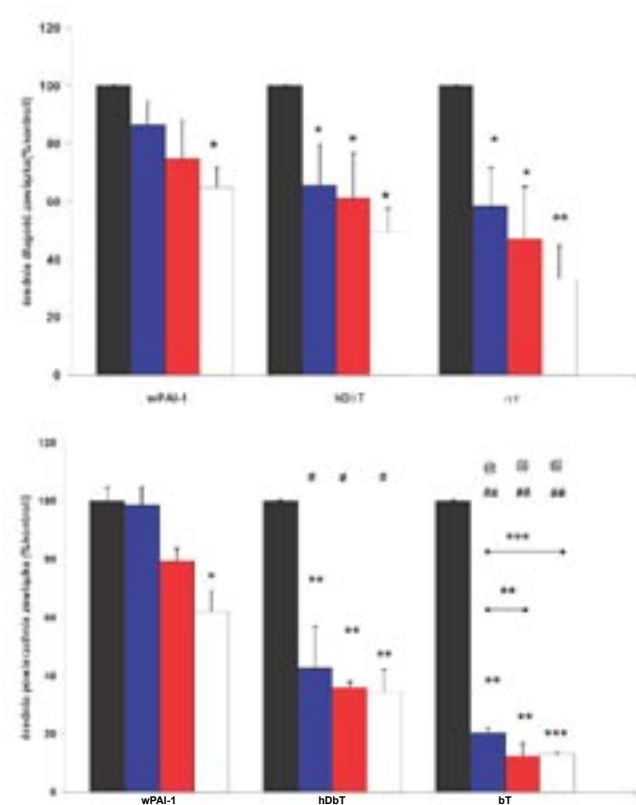
i najmniejsze stężenie działało znacząco silniej niż odpowiednie stężenia białka hDβT CysPAI-1. βT CysPAI-1 nieco silniej obniżało zdolność angiogenną komórek HLMVEC, niż w przypadku referencyjnych komórek HUVEC; maksymalny wskaźnik redukcji średniej całkowitej długości zawiązków wynosił odpowiednio 81,57% ± 1,06 (HLMVEC) oraz 80% ± 1,2 (HUVEC). Natomiast natywna postać PAI-1, inaczej niż w hodowlach komórek śródbłonka żyły pępowinowej, nie zmieniała istotnie średniej całkowitej długości zawiązków naczyniowych tworzonych przez pojedynczy agregat, choć widoczna była tendencja do zmniejszania się wielkości tego parametru (maksymalny wskaźnik redukcji 39,5% ± 50,2).

Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 na morfologię zawiązków naczyniowych tworzonych przez zagregowane komórki HLMVEC (Ryc XXI-XXIII)

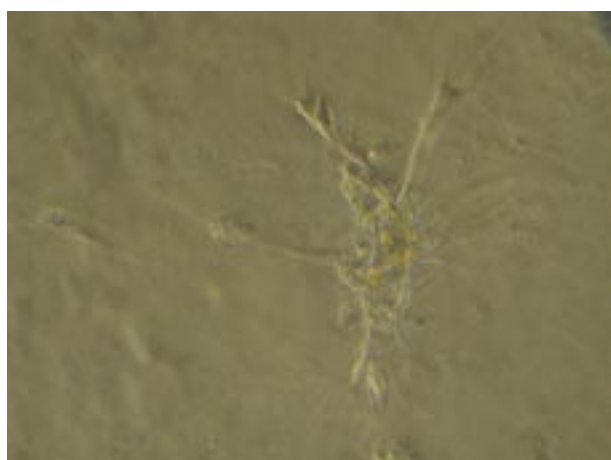
Podobnie jak w hodowlach komórek śródbłonka żyły pępowinowej zmodyfikowane białka CysPAI-1 istotnie wpływały na strukturę zawiązków naczyniowych powstających w agregatach komórek HLMVEC, silniej modyfikując parametr średniej powierzchni jednostkowego zawiązka niż jego średniej długości. Zarówno βT CysPAI-1, jak i hDβT CysPAI-1 znacząco redukowały średnią powierzchnię powstających zawiązków, począwszy od najniższego stężenia 0,75 μM (wskaźnik redukcji dla βT CysPAI-1 79,73 % ± 1,51; wskaźnik redukcji dla hDβT CysPAI-1 57,42 % ± 3,64), aż po najwyższe stężenie 3,0 μM (wskaźnik redukcji dla βT CysPAI-1 87,03 % ± 0,5; wskaźnik redukcji dla hDβT CysPAI-1 65,8 % ± 0,5).

Obserwowany efekt zmodyfikowanego białka βT CysPAI-1 o niezmiennym w czasie aktywności antyproteolitycznej we wszystkich badanych dawkach był znacząco silniejszy niż białka hDβT CysPAI-1 o umiarkowanym wydłużonym czasie półtrwania (p<0,002 dla wszystkich stężeń), jak również w porównaniu do natywnej formy PAI-1 (p<0,001 dla wszystkich stężeń). Średnia całkowita długość zawiązków naczyniowych tworzonych przez pojedynczy agregat uległa skróceniu w mniejszym stopniu (maksymalny wskaźnik redukcji dla βT CysPAI-1 67,03% ± 11,07; maksymalny wskaźnik redukcji dla hDβT CysPAI-1 50,5% ± 7,9).

Obserwowano również znamienny wpływ natywnej formy PAI-1 na strukturę zawiązków tworzonych przez agregaty HLMVEC. Stopień skrócenia średniej długości jednostkowego zawiązka w hodowlach tych komórek był w wyraźny sposób zależny od dawki i istotny dla najwyższego stężenia 3,0 μM wPAI-1 (34,14% ± 8,24). Podobną zależność obserwowano w przypadku średniej powierzchni zawiązka naczyniowego powstającego z agregatu komórek HLMVEC, również stwierdzając znamienny statystycznie wpływ dawki 3,0 μM wPAI-1 (38,4% ± 4,27).



Ryc XXI Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 (hDbT i βT PAI-1) na kształt zawiązków naczyniowych tworzonych przez komórki HLMVEC w teście angiogenezy *in vitro*. Zmianę kształtu oceniano jako: A) średnią długość zawiązka, B) średnią powierzchnię zawiązka. Oceniano działanie rosnących stężeń PAI-1 ■ – kontrola, ■ – 0,75 μM, ■ – 1,5 μM, □ – 3,0 μM. Dane przedstawiają średnią wartość z trzech doświadczeń. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 vs kontrola, # p<0,01, ## p<0,001 vs komórki poddane działaniu wPAI-1, @ p<0,01 vs komórki poddane działaniu hDbT PAI-1.



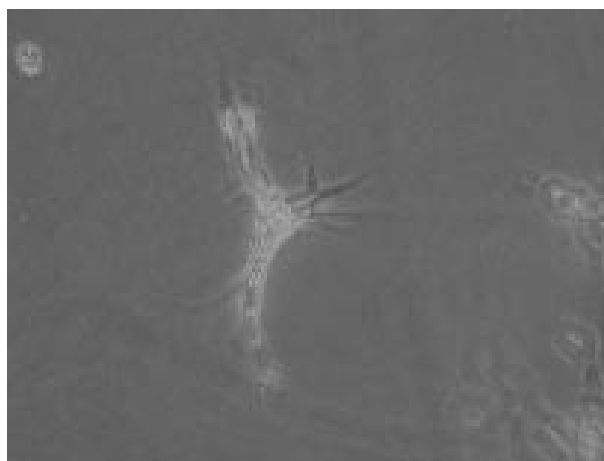
A) Kontrola



B) 0,75 μM wPAI-1



c) 1,5 μM wPAI-1

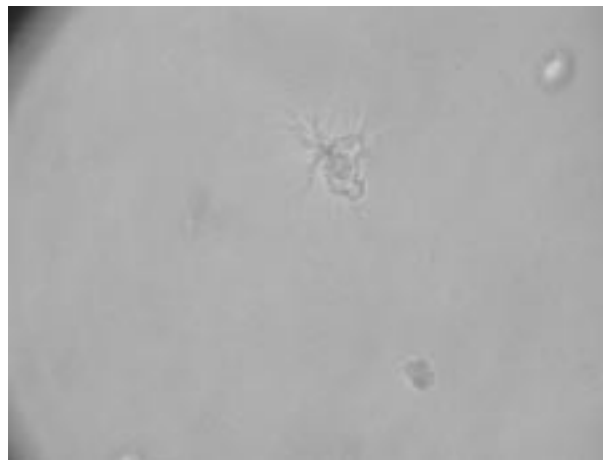


B) 3,0 μM wPAI-1

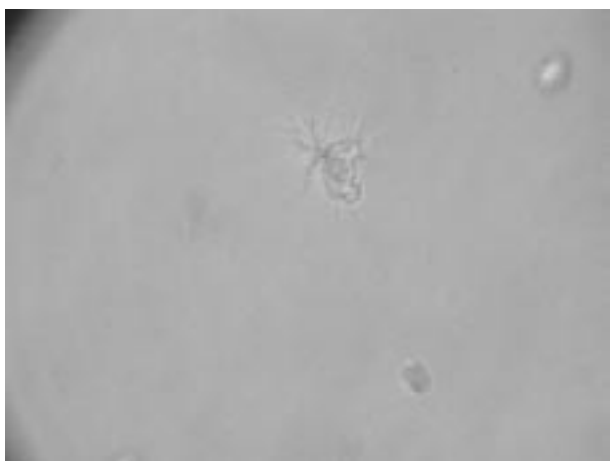
Ryc XXII Agregaty komórek śródbłonna ludzkich kapilarów płucnych hodowane w obecności rosnących stężeń natywnej postaci PAI-1



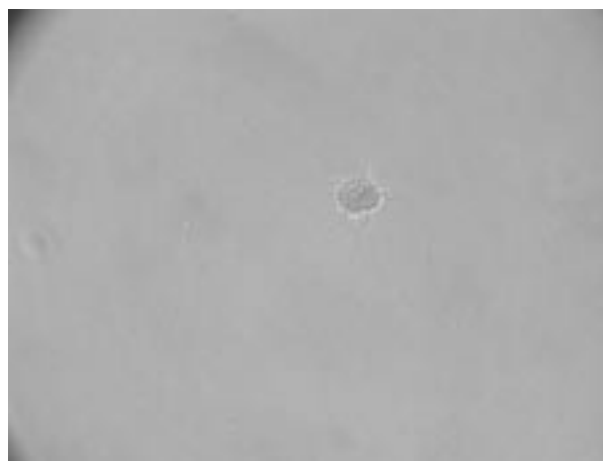
A) Kontrola



B) 0,75 μM βT CysPAI-1



C) 1,5 μM βT CysPAI-1



D) 3,0 μM βT CysPAI-1

Ryc. XXIII Agregaty komórek śródbłonna ludzkich kapilarów płucnych hodowane w obecności rosnących stężeń postaci βT CysPAI-1 charakteryzującej się niezmienną w czasie aktywnością anty-proteolityczną

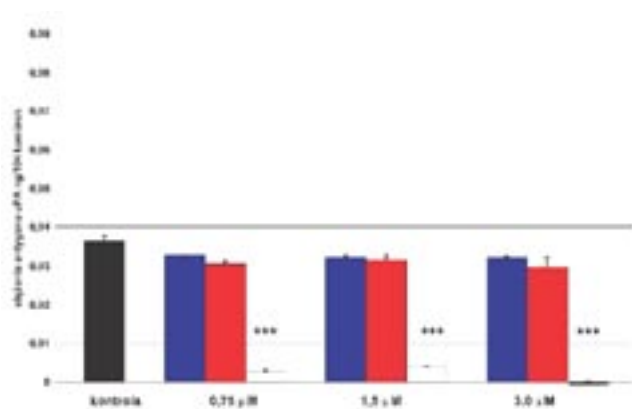
Wpływ białek PAI-1 na produkcję i uwalnianie urokinazy przez komórki śródbłonna

Badania doświadczalne wskazują, że powstające w trakcie procesu neoangiogenezy naczynia kapilarne zawierają znaczne ilości urokinazy, która warunkuje proces rozszerzenia i zwiększenia przepuszczalności naczyń kapilarnych, rozluźnienia połączeń międzykomórkowych w śródbłonku, a także pośredniczy w degradacji błony podstawnej i białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz migracji komórek endotelium. Wprowadzenie inhibitorów urokinazy do mikrośrodowiska otaczającego naczynia włosniczkowe prowadzi do znaczącego zahamowania procesu ich powstawania i wzrostu. Dążąc do określenia roli anty-proteolitycznych właściwości badanych białek PAI-1 w procesie obserwowanego w warunkach *in vitro* zahamowania aktywności angiogennej komórek śródbłonna, oceniono ich

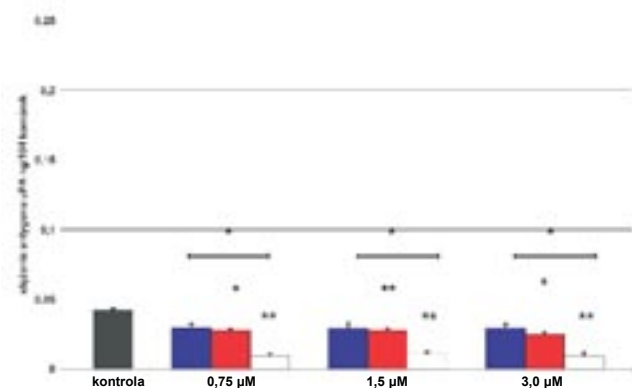
wpływ na produkcję i uwalnianie urokinazy przez konfluentne 12-godzinne hodowle komórek śródbłonna prowadzone w obecności odpowiednich stężeń zmodyfikowanych białek PAI-1 lub wPAI-1 jako kontroli. Stężenie urokinazy oceniane metodą kolorymetryczną ELISA w homogenatach hodowli oraz ich nadsączu zostało przedstawione w ng/10⁴ komórek obecnych w hodowli, aby umożliwić bezpośrednie porównania aktywności badanych komórek śródbłonna.

Komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (Ryc XXIV)

Nadsącz hodowli komórek HUVEC prowadzonych w obecności PBS jako kontroli lub rosnących stężeń natywnej formy PAI-1 zawierał znacząco wyższe ilości urokinazy w przeliczeniu na liczbę 10⁴ komórek w porównaniu do homogenatów tych kultur (odpowiednio: kontrola – p<0,05; wPAI-1 p<0,001



A) homogenaty komórek HUVEC



B) nadsącz hodowli komórek HUVECs

Ryc XXIV Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 (hDβT i βT PAI-1) na stężenia antygenu urokinazy w A) homogenatach komórek HUVEC B) w nadsączu hodowli komórek HUVEC. Komórki hodowano w obecności rosnących stężeń ■ – kontrola, ■ – wPAI-1, ■ – hDβT CysPAI-1, □ – βT CysPAI-1. Wyniki przedstawiono w ng /10⁴ komórek (x±SD): *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 vs kontrola

dla wszystkich badanych stężeń). Podobną tendencję obserwowano w przypadku hodowli komórkowych prowadzonych w obecności βT CysPAI-1, choć różnice pomiędzy zawartością urokinazy w nadsączu i homogenacie komórkowym nie były tak znaczące, jak w kontroli (stężenia 0,75 μM, 1,5 μM p<0,05; oraz 3,0 μM p<0,01).

Jedynie białko βT CysPAI-1 spowodowało znamienne spadek poziomu antygenu urokinazy w komórkach HUVEC w porównaniu do hodowli kontrolnych (p<0,001). W homogenatach komórek hodowanych w obecności najwyższego stężenia tego białka poziom urokinazy znajdował się poniżej poziomu czułości zastosowanego testu Elisa wynoszącego 0,1 ng/ml.

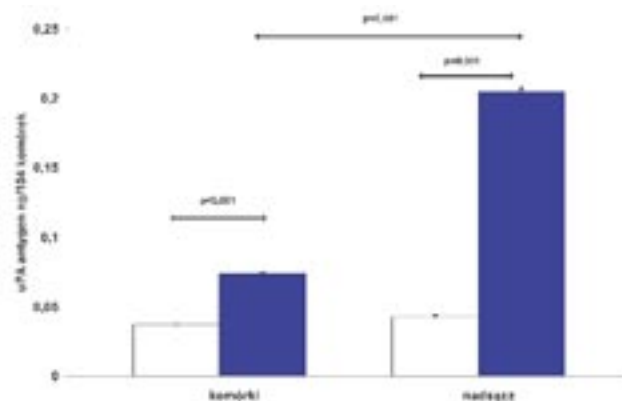
W nadsączach hodowli prowadzonych zarówno w obecności wariantów βT CysPAI-1, jak i hDβT CysPAI-1 stwierdzono znamienne obniżony poziom urokinazy. Nie obserwowano

jednak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy supresyjnym efektem obu zmodyfikowanych postaci PAI-1, choć ilość antygenu w nadsączach hodowli poddanych działaniu βT CysPAI-1 była w widoczny sposób mniejsza.

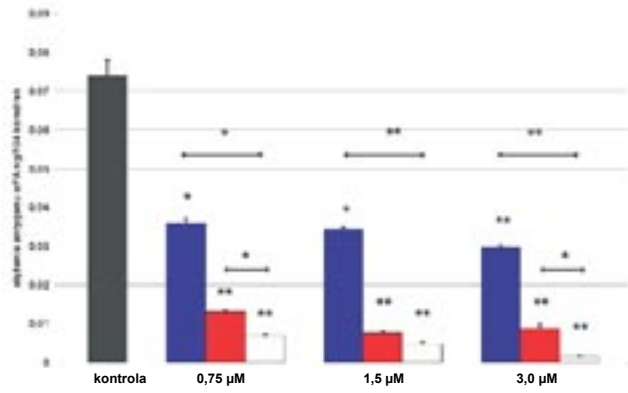
Komórki śródbłonna ludzkich kapilarnych naczyń płucnych (Ryc XXV-XXVI)

Poziom antygenu urokinazy oznaczany metodą Elisa w nadsączu hodowli i homogenatach komórek HLMVEC był kilkukrotnie wyższy w porównaniu do wartości stwierdzanych w hodowlach komórek śródbłonna żyły pępowinowej (p<0,001) (Ryc XXV), co potwierdziło unikalną charakterystykę czynnościową komórek śródbłonna płucnych naczyń kapilarnych.

W hodowlach prowadzonych w obecności wszystkich badanych stężeń zarówno zmodyfikowanych białek PAI-1, jak i jego natywnej postaci, stwierdzono znaczące obniżenie zawartości antygenu urokinazy w homogenatach komórek oraz nadsączu hodowli. Wskaźnik redukcji w układzie doświadczalnym z komórkami śródbłonna kapilarnych naczyń płucnych był znacząco wyższy w porównaniu do efektu supresyjnego obserwowanego w hodowlach komórek HUVEC. Wspomniana różnica był szczególnie znacząca dla natywnej formy PAI-1 (nadsącz hodowli komórek HUVEC – średni wskaźnik redukcji – 30%, HLMVEC – 79,54%, homogenat komórek HUVEC – 12,8%, HLMVEC – 59,89%) oraz zmodyfikowanego białka hDβT CysPAI-1 (nadsącz hodowli komórek HUVEC – średni wskaźnik redukcji – 58,1%, HLMVEC – 85,58%, homogenat komórek HUVEC – 18,4%, HLMVEC – 88,4%) pomimo, że najsilniejsze działanie supresyjne wykazywało białko o stabilnym działaniu antyproetolitycznym βT CysPAI-1.

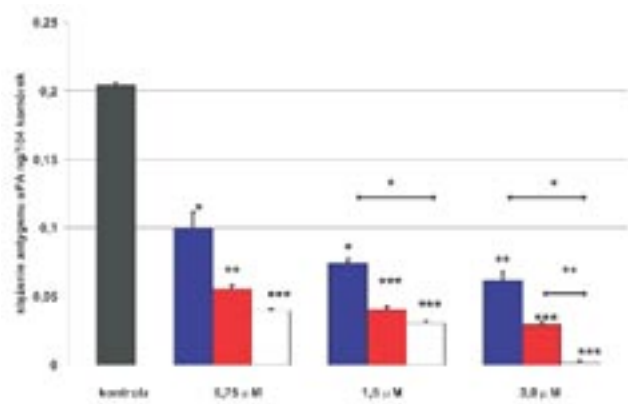


Ryc XXV Produkcja i uwalnianie urokinazy przez komórki śródbłonna naczyń HUVEC (□) i HLMVEC (■) Wyniki przedstawiono w ng /10⁴ komórek (x ± SD).



A) homogenat komórek

Ryc XXVI Wpływ wPAI-1 i CysPAI-1 (hDβT i βT PAI-1) na stężenie antygenu urokinazy w A) homogenatach komórek HLMVEC B) w nadsączu hodowli komórek HLMVEC. Komórki hodowano w obecności rosnących stężeń ■ – kontrola, ■ – wPAI-1, ■ – hDβT CysPAI-1, □ – βT CysPAI-1. Wyniki przedstawiono w ng /10⁴ komórek (x±SD). *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 vs kontrola



B) nadsącz hodowli komórek

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stabilizacja aktywnej konformacji białka PAI-1

Zasadniczym celem niniejszej pracy było uzyskanie zmodyfikowanej postaci PAI-1 cechującej się przedłużoną w czasie, pełną aktywnością anty-proteolityczną, a następnie dokonanie analizy wpływu zmienionych właściwości białka na jego aktywność biologiczną. Wysoki stopień trudności związany z tym projektem wynikał zarówno z konieczności dobrania odpowiedniej lokalizacji mutacji punktowych, jakie planowano wprowadzić do struktury DNA PAI-1, jak również z unikalnego charakteru wiązań, które zamierzano wykorzystać do stabilizacji jego aktywnej konformacji.

Struktura inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 jest pod wieloma względami typowa dla innych białek z rodziny serpin (2). Charakteryzuje go podobna długość łańcucha aminokwasów, zbliżona struktura trzeciorzędowa składająca się z trzech harmonijek- β A, B i C, dziewięciu helis α oraz z pętli wystającej poza cząsteczkę białka i zawierającej miejsce aktywne (P4-P10²). Podobnie jak inne proteazy należące do tej rodziny, PAI-1 reaguje ze swoistymi substratami szybko, tworząc stoichiometryczny kompleks w stosunku 1:1 i znacząco zmieniając w trakcie tej reakcji swoją konformację (67).

Podstawowym fragmentem cząstki PAI-1, który rozstrzyga o jej właściwościach anty-proteolitycznych jest dostępne dla substratu miejsce aktywne – region (P1-P1') z aktywnym wiązaniem peptydowym Arg369-Met370 (68,69). Dążąc do uzyskania zmodyfikowanej postaci PAI-1 charakteryzującej się pełną, niezmienną aktywnością biologiczną, należało więc dokonać wyboru takiej lokalizacji wprowadzanych zamienników, która utrzymując PAI-1 w układzie aktywnym nie zmieniałaby jednocześnie powinowactwa P1-P1' względem substratu. Wiadomo, że zachowanie strukturalnej integralności tego regionu ma kluczowe znaczenie dla utrzymania pełnej aktywności PAI-1, a każda zmiana podstawnika w obrębie P1-P1' zaburza fizjologiczną swoistość miejsca aktywnego względem urokinazy (68,70-72). Gils and Declerc wykazali ponadto, że niektóre mutacje wprowadzone w oddalonych od P1-P1' fragmentach cząsteczki, również zmieniają charakterystykę PAI-1 (73). Dla przykładu, podstawienie proliny w pozycji P6 (PAI-1P6 (Val→Pro)) wzmagало powinowactwo PAI-1 względem tPA, podczas gdy wprowadzenie tego samego aminokwasu na pozycję P10 (PAI-1-P10 (Ser→Pro)) potęgowało jego swoistą aktywność inhibicyjną względem uPA.

Wiadomo, że kolejnym newralgicznym obszarem struktury PAI-1 jest odcinek P12-P15, zlokalizowany w bezpośrednim sąsiedztwie pętli zawierającej P1-P1', który określany jest mianem regionu warunkującego właściwości zbliżone do cech substratu (*substrate determining region*) (73). To właśnie zdolność do spontanicznego tworzenia trzeciej, obok aktywnej i latentnej, tak zwanej konformacji substratu jest unikalną właściwością wPAI-1, odróżniającą go od pozostałych serpin (74). wPAI-1 w tej konformacji jest zdolny do swoistej reakcji z cząstką uPA, nie powoduje jednak trwałego zablokowania jej aktywności proteolitycznej. Podobnie jak w przypadku reakcji z aktywną formą PAI-1, w trakcie powstawania kompleksu uPA z PAI-1 o właściwościach substratu, dochodzi do przyłączenia urokinazy do P1-P1' i rozpadu wiązania peptydowego (75). Jednak pętla zawierająca miejsce aktywne nie zostaje przemieszczona do wnętrza PAI-1 i nie dochodzi do powstania wiązania kowalencyjnego pomiędzy PAI-1 i uPA, co po pewnym czasie skutkuje samoistnym rozpadem kompleksu uPA-PAI-1 i odzyskaniem przez ten enzym pełnej aktywności proteolitycznej (76). Gils i Declerc wykazali, że wprowadzenie zamienników o znaczącym potencjale elektrostatycznym na obszarze P12-P8 oraz P15-P14 sprzyja ujawnieniu się właściwości substratu w zmodyfikowanych białkach PAI-1 (73).

Obok budowy łańcucha aminokwasów, kluczową rolę w procesach katalizowanych przez PAI-1 odgrywa przestrzenne usytuowanie miejsca aktywnego względem zasadniczej struktury jego cząsteczki tego białka. Podstawową cechą aktywnej konformacji PAI-1 jest udostępnienie P1-P1' dla kontaktu z urokinazą poprzez wysunięcie poza obszar cząsteczki pętli zawierającej miejsce aktywne (66). Wykazano bez żadnych wątpliwości, że reaktywność PAI-1 względem urokinazy zależy w dużym stopniu od prawidłowej ruchomości tej pętli, a przede wszystkim od dostatecznego wyeksponowania miejsca aktywnego poza podstawową strukturą PAI-1. Z tego względu wiązania stabilizujące aktywną konformację cząstki PAI-1 powstałe po wprowadzeniu podstawników cysteinowych nie powinny mieć wpływu na zmianę usytuowania pętli względem cząstki PAI-1. Lokalizację mutacji punktowych w zmodyfikowanych formach PAI-1 badanych w ramach niniejszej pracy dobrano więc tak, by nie zmieniając układu jego konformacji aktywnej doprowadzić do ograniczenia elastyczności kluczowych struktur cząsteczki. Innymi słowy zasadniczym celem wprowadzenia podstawników cysteinowych było stworzenie wewnątrz struktury aktywnej postaci PAI-1 wiązań dwusiarczkowych,

których usytuowanie pozwoliłoby na stabilizację i wydłużenie czasu półtrwania, bez zmiany powinowactwa względem uPA.

Odpowiednich zmian dokonano w trzech nentralicznych obszarach cząsteczki PAI-1. W obrębie łańcuchów A3 i A5, które w strukturze aktywnego PAI-1 tworzą jednolitą harmonijkę- β A (β -sheet), wprowadzono mutacje Cys192-347 oraz Cys197-Cys355 gwarantujące wzmocnienie ich wzajemnego powiązania w górnym i dolnym odcinku harmonijki. Dodatkowo mutacja Cys197-Cys355 spinając górne odcinki łańcuchów A3 i A5, miała również stabilizować pętlę zawierającą miejsce aktywne dla uPA, uniemożliwiając jej wsunięcie do wnętrza PAI-1 i ograniczenie dostępu substratu (uPA) do P1-P1'. Z kolei w obrębie helisy D wprowadzono zamienniki cysteinowe na pozycji Cys31-Cys97 tak, aby wzmocnić „trwałości” aktywnej postaci PAI-1 poprzez ograniczenie jej giętkości, czyli wzajemnych przesunięć poszczególnych struktur w tym obszarze.

Zaproponowana lokalizacja mutacji punktowych pozwalała też na ich równoczesne wprowadzenie do poszczególnych wariantów zmodyfikowanego PAI-1 i stworzenie kilku form tego białka, różniących się zarówno liczbą, jak i lokalizacją mutacji. W ramach niniejszej pracy uzyskano trzy postaci białka PAI-1 z dwoma mutacjami punktowymi, w których wiązania były zlokalizowane w jednym z wybranych regionów cząsteczki (helix D (hD), β -sheet Top (β T), β -sheet Bottom (β B)); trzy białka z czterema mutacjami punktowymi (helix D β -sheet Top (hD β T), helix D β -sheet Bottom, (hD β B), β -sheet Top Bottom (β TB)) oraz jedno białko z sześcioma podstawnikami cysteinowymi (helix D β -sheet Top Bottom (hD β TB)).

Dokonana ocena czasu półtrwania wyizolowanych białek wykazała, że kluczowe znaczenie dla stabilizacji aktywnej postaci PAI-1 ma odpowiednio dobrana lokalizacja mutacji punktowych, a nie ich liczba. Najkorzystniejsze okazało się wprowadzenie dwóch punktowych mutacji w górnej części łańcuchów A i B, a więc u podstawy pętli zawierającej aktywne miejsce dla urokinazy. Tak zlokalizowane wiązanie dwusiarczkowe zapewniało zarówno wzmocnienie integralności harmonijki- β A, a więc ściślejsze powiązanie łańcuchów A3 i A5, jak i utrudniało penetrację pętli do wnętrza cząsteczki PAI-1. Korzyści związane z wprowadzeniem mutacji punktowych w tym rejonie potwierdzają również badania innych autorów (77). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono natomiast obserwacji dotyczących prób uzyskania zmodyfikowanych form PAI-1 zawierających tylko jedno wiązanie o podobnej lokalizacji.

Warto również podkreślić, że wprowadzenie do cząsteczki PAI-1 kolejnych, obok wspomnianego, wiązań skutkowało obniżeniem jej stabilności w porównaniu do cząsteczki zawierającej pojedynczy mostek siarczkowy w górnej części harmonijki- β A (β T). Najwyraźniej postać β T CysPAI-1 charakteryzowała się najkorzystniejszym i najbardziej ekonomicznym rozkładem energii wewnętrznej, pozwalającym na długotrwałe (niezmienne w naszej obserwacji) zachowanie stabilności jej cząsteczki. Wprowadzenie dodatkowych wiązań, stan ten naruszało i powodowało skrócenie czasu półtrwania z około 7000 godzin do 141,46 (β TB CysPAI-1), 63,59 (hD β T CysPAI-1), a nawet 2,34 godzin (hD β TB CysPAI-1).

Potwierdzeniem tej hipotezy była również zaskakująca charakterystyka zmodyfikowanej formy hD β TB CysPAI-1, która zawierała maksymalną liczbę sześciu mutacji punktowych. Projektując ten wariant CysPAI-1 oczekiwano, że trzy wiązania dwusiarczkowe zapewnią jej strukturze najwyższą stabilność spośród zmodyfikowanych postaci PAI-1. Tymczasem zmiana jej aktywności w czasie charakteryzowała się dynamiką zbliżoną do obserwowanej w przypadku wPAI-1. Również obliczony czas półtrwania był niewiele dłuższy i wynosił 2,37 godziny, podczas gdy dla wPAI-1 $T_{1/2} = 1,57$ godziny. Wydaje się, że podobnie jak w przypadku niekorzystnego wpływu dodatkowych wiązań na stabilizujący efekt pojedynczego mostku (β T), przyczyną tak krótkiego czasu półtrwania wariantu hD β TB CysPAI-1 mogło być wystąpienie zaburzeń w trakcie procesu formowania mostków dwusiarczkowych w cząsteczce. Wprowadzenie aż sześciu mutacji indukujących powstanie trzech wiązań dwusiarczkowych mogło doprowadzić do wystąpienia nieprzewidzianych interakcji i napięć wewnątrz cząsteczki CysPAI-1, z jej następowym szybkim przejściem do postaci latentnej. Zbyt duża liczba wiązań dwusiarczkowych mogła być również przyczyną nieprawidłowego przebiegu procesu fałdowania białka do struktury trzeciorzędowej, a w efekcie jego niestabilności.

Próby dokonania mutacji w DNA PAI-1 i wprowadzenie do jego cząsteczki zmienionych podstawników w celu stabilizacji aktywnej formy tego białka, były w przeszłości podejmowane już kilkakrotnie. Jako pierwsza podjęła ją grupa Ginsburga w 1994 uzyskując dla jednej z mutacji Arg30→Glu czas półtrwania 2,1 godziny (78). Z kolei Tucker i wsp. osiągnęli trzykrotne wydłużenie $T_{1/2}$ PAI-1 wprowadzając dwie mutacje punktowe, 303Leu, 53Arg→Tyr w rejonie tak zwanych „wrót” cząsteczki, czyli w obrębie helisy D (79). Dopiero jednak Berkenpass i wsp. uzyskali znaczące opóźnienie spontanicznej zmiany konformacji

PAI-1 do postaci latentnej z czasem półtrwania 145 godzin, wymieniając cztery podstawniki 173Asn→His, 177Lys→Thr, 342Gln→Leu, 377Met→Ile (77).

Pomimo, że lokalizacja niektórych z wymienionych powyżej mutacji zarówno w obrębie łańcuchów A3 i A5, jak i helisy D była zbliżona do zastosowanych w niniejszej pracy, jednak żaden z cytowanych autorów nie uzyskał tak znaczącego wydłużenia czasu półtrwania modyfikowanej cząstki PAI-1, jak w przypadku wariantu β T CysPAI-1.

Wyjątkowość rozwiązań zaproponowanych w niniejszej pracy wynika nie tylko z trafnego doboru lokalizacji podstawników wprowadzonych do łańcucha DNA, ale również z unikalnej charakterystyki wiązań, które powstały wewnątrz cząstki CysPAI-1 jako efekt dokonanych mutacji.

W zdecydowanej większości zmodyfikowanych postaci PAI-1 uzyskiwanych przez innych autorów, wydłużenie czasu półtrwania uzyskiwano poprzez wprowadzenie do cząsteczki mostków solnych, bądź też wiązań wodorowych, które charakteryzuje słabe przyciąganie elektrostatyczne. Wykorzystywano również oddziaływania hydrofobowe pomiędzy niepolarnymi łańcuchami bocznymi „nowych” aminokwasów. Jednak wiązania niekowalencyjne do których zaliczają się wymienione rodzaje oddziaływań cechuje stosunkowo niska energia, a więc i ograniczona trwałość. Typowa energia wiązania wodorowego w temperaturze 25°C wynosi 1-10 kcal x mol⁻¹, podczas gdy wiązań kowalencyjnych – ponad 90 kcal x mol⁻¹ (80). Z tego względu stabilność zmodyfikowanych cząstek PAI-1 udawało się wydłużyć jedynie w ograniczonym zakresie od ~ 6 do maksymalnie ~ 160 godzin. Tymczasem wiązania dwusiarczkowe, których użyto w niniejszej pracy mają charakter kowalencyjny i cechują się w związku z tym znacznie wyższą siłą i stabilnością. Przypisuje się im również szczególny, stabilizujący wpływ na aktywne konformacje białek enzymatycznych, dokonujący się poprzez obniżenie entropii podstawowej struktury tych cząstek (81,82).

W żadnej z dotychczas opublikowanych prac nie donoszono o wykorzystaniu wiązań dwusiarczkowych do stabilizacji aktywnej postaci PAI-1, choć próby takie podejmowano w przypadku innych białek, uzyskując bardzo dobre efekty. Ivens i wsp. 13-krotnie wydłużyli stabilność badanego enzymu białkowego wprowadzając do jego struktur jeden tylko mostek dwusiarczkowy (81). Wysoki stopień trudności związany z uzyskaniem tego typu wiązań w cząsteczce PAI-1 wynika z konieczności wytypowania odpowiedniej lokalizacji podstawników cysteinowych, wprowadzanych do struktury PAI-1, jak również z szeregu problemów technicznych komplikujących sam proces uzyskiwania ekspresji i izolacji białka.

Warunkiem spontanicznego powstania trwałych wiązań dwusiarczkowych jest zachowanie ściśle określonych warunków dotyczących między innymi dostatecznej odległości pomiędzy wprowadzonymi mutacjami, jak również pomiędzy nowo powstałym wiązaniem, a miejscem aktywnym białka (81). Uważa się ponadto, że samoistne formowanie mostków dwusiarczkowych jest możliwe, o ile ich liczba w cząsteczce nie przekracza trzech (83,84). W niniejszej pracy dokładną i trafną identyfikację pozycji podstawników cysteinowych warunkujących spontaniczne tworzenie się wiązań dwusiarczkowych zapewniła precyzyjna komputerowa symulacja rozkładu przestrzennego i energetycznego, której dokonano dla projektowanych zmodyfikowanych form PAI-1.

Należy również podkreślić, że spontaniczne powstanie wiązań dwusiarczkowych w białkach podlegających ekspresji w komórkach *Escherichia coli*, użytych również do produkcji CysPAI-1, jest na ogół możliwe dopiero po dostarczeniu im bodźca oksydacyjnego (81). Tymczasem wiadomo, że PAI-1 w warunkach utleniania podlega unieczynnieniu na skutek gwałtownej zmiany konformacji cząsteczki (85). Z tego względu na wszystkich etapach izolacji PAI-1 konieczne było zachowanie szczególnej ostrożności i wyeliminowanie ryzyka ekspozycji badanego białka na warunki oksydacyjne.

Obecność wiązań dwusiarczkowych w zmodyfikowanych postaciach PAI-1 uzyskanych w ramach niniejszej pracy wymaga ostatecznego potwierdzenia w analizie krystalograficznej. Jednak zarówno symulacje struktury molekularnej tych białek, jak i trójprzestrzenne modelowanie budowy ich cząstek jednoznacznie wskazały, że uzyskane znaczące wydłużenie czasu półtrwania białek CysPAI-1 jest bezpośrednim skutkiem powstania tych wiązań. Ich wysoka efektywność w zachowaniu aktywnej konformacji cząsteczki pozwoliła uzyskać wysoką stabilność części białek CysPAI-1, w tym białka β T charakteryzującego się stałą aktywnością antyproteolityczną.

W cytowanej wcześniej badaniach Tuckera dwie jednopunktowe mutacje wprowadzone w dolnej części cząsteczki, w rejonie helisy-D (hD), tak zwanych „wrót” PAI-1, wydłużyły czas półtrwania tego białka do 6 godzin (79). Tymczasem w niniejszej pracy 50% spadek aktywności białka hD CysPAI-1, o podobnej lokalizacji wiązania następował po około 22 godzinach. Wydaje się, że jego istotnie dłuższa aktywność wynikała nie tyle z nieco odmiennego umiejscowienia mutacji w obrębie helisy D, co z unikalnej charakterystyki wprowadzonych do PAI-1 wiązań – mostków dwusiarczkowych, a nie solnych, czy też wiązań wodorowych.

Izolacja białek wPAI-1 i wariantów CysPAI-1

Adekwatna ekspresja CysPAI-1 w komórkach kompetentnych *E. coli*, a następnie efektywna izolacja czynnego CysPAI-1, które zostały potwierdzone wykazaniem obecności DNA CysPAI-1 zligowanego z pTYB12 w tych komórkach oraz ekspresji poszczególnych postaci CysPAI-1 w ekstrakcie białkowym, były kluczowym punktem niniejszej pracy, warunkującym możliwość przystąpienie do dalszego etapu badań biologicznej aktywności zmodyfikowanych postaci PAI-1. Do izolacji CysPAI-1 z ekstraktów białkowych zastosowano metodę chromatografii wykorzystując wysokie powinowactwo inteiny do chityny stanowiącej fazę stałą w kolumnie (*affinity chromatography*). Jednak analiza elektroforetyczna eluatu w żelu poliakryloamidowym wykazała obecność dwóch intensywnych prążków białkowych o masie 43 kDa i 78 kDa, zamiast spodziewanego pojedynczego prążka 43 kDa odpowiadającego czystej postaci PAI-1. Uzasadnione wydawało się postawienie tezy, że białko skupione w dodatkowym prążku odpowiada zdimeryzowanej frakcji CysPAI-1. Fakt, że jego masa cząsteczkowa (78 kDa) była zbliżona do podwojonej masy PAI-1 (43 kDa) mógł potwierdzać tę hipotezę. Jednak barwienie swoistymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiemu PAI-1 w badaniu Western blot dało wynik ujemny, natomiast analiza sekwencyjna białka 78 kDa wykazała silną homologię jego początkowych dwudziestu aminokwasów do białka opiekuńczego *E. coli* typu GroEL (*chaperonin GroEL*).

Wiadomo, że główna funkcja GroEL polega na wspomaganie procesu fałdowania innych białek (80). Kontrolując wspomniany proces białko opiekuńcze zmniejsza ryzyko nieprawidłowego ukształtowania pośredniej struktury trzeciorzędowej przez organizującą się cząstkę proteinową. Wydaje się, że ekspresja białka GroEL obserwowana w frakcjach izolowanych z kolumny chitynowej mogła być ubocznym efektem silnej stymulacji transkrypcji białka w komórkach kompetentnych pod wpływem działania IPTG. Należy również podkreślić, że obecność GroEL w eluowanych frakcjach, będąca dowodem jego wysokiego powinowactwo do chityny, była już opisywana przez Gibson'a i wsp oraz producenta odczynników, którymi się posługiwano w niniejszej pracy (86). Sugerowano, że jej powodem mogą być zaburzenia w procesie fałdowania izolowanego białka, które pozostawało w kompleksie z GroEL. Obserwowana przez nas różnica pomiędzy masą molekularną GroEL, wynoszącą 57-60 kDa, a masą białka tworzącego prążek

równą 78 kDa może faktycznie odzwierciedlać istnienie kompleksu pomiędzy białkiem, a inteiną będącą białkiem docelowym na kolumnie afinitycyjnej. Taki właśnie kompleks charakteryzowałoby wysokie powinowactwo do chityny skutkujące jego obecnością w eluacie.

Ocena aktywności proteolitycznej i charakterystyka farmakokinetyczna białek PAI-1

Trafny dobór lokalizacji podstawników wprowadzonych do łańcucha DNA, jak również unikalna charakterystyka wiązań dwusiarczkowych stabilizujących aktywną konformację PAI-1 bez naruszenia integralności pętli i miejsca aktywnego P1-P1' sprawiły, że zmodyfikowane postaci CysPAI-1 obok wydłużonego czasu półtrwania zachowały pełną aktywność anty-proteolityczną, porównywalną z wPAI-1. Aktywność inhibicyjna CysPAI-1 (50-54 IU/ μ g), jak również wyliczona stała hamowania ($1,3-1,7 \times 10^{-7}$ M) były zbliżone do wartości prezentowanych przez natywną postać PAI-1 izolowaną w niniejszej pracy oraz uzyskanych przez innych autorów (71,87-89). Zachowanie pełnej aktywności anty-proteolitycznej oraz niezmienną dynamiką reakcji wobec urokinazy są pośrednimi dowodami strukturalnego podobieństwa uzyskanych w niniejszej pracy zmodyfikowanych białek do natywnej postaci PAI-1. Zasadniczą różnicą pomiędzy CysPAI-1, a wPAI-1 wydaje się być właśnie obecność mostków dwusiarczkowych i związane z tym faktem zahamowanie spontanicznej zmiany konformacji. Definitywnym potwierdzeniem, hipotetycznego na obecnym etapie, podobieństwa będą dopiero wyniki badań krystalograficznych CysPAI-1.

Analiza aktywności białek PAI-1 w teście angiogenezy *in vitro*

Zmieniona charakterystyka czynnościowa CysPAI-1 – wydłużony czas półtrwania aktywnej postaci cząsteczki przy w pełni zachowanym powinowactwie wobec urokinazy, pozwalała oczekiwać znaczącego efektu biologicznego badanych białek. Na tym etapie pracy poddano analizie efekty działania wybranych wariantów CysPAI-1 o umiarkowanie (hD β T) i bardzo znacznie (β T) przedłużonej stabilności, a więc różniących się przede wszystkim aktywnością anty-proteolityczną.

Jak wiadomo, PAI-1 charakteryzuje udowodnione działanie modulujące wobec procesów nowotworzenia naczyń krwionośnych. Jednak dostępne piśmiennictwo dostarcza na ten temat wielu prze-

ciwstawnych informacji. Zastosowanie aktywnych wariantów CysPAI-1 o różnej stabilności w środowisku doświadczalnym stworzyło unikalną szansę oceny faktycznego znaczenia anty-proteolitycznych właściwości PAI-1 dla jego wpływu na procesy angiogenezy.

Neowaskularyzacja odgrywa kluczową, regulacyjną rolę w procesach wzrostu guza, warunkuje również powstawanie przerzutów. Nowotworzenie naczyń jest bezpośrednio stymulowane przez działanie hipoksji oraz czynników wzrostowych pochodzących z otaczających tkanek (VEGF, bFGF), które mobilizują komórki śródbłonka naczyń, inicjując ich przejście ze stanu spoczynku do fazy aktywnej proliferacji, aktywują również niezbędne dla dalszych przemian składowe układu plazminogen – plazmina (90,91). Pobudzone komórki endotelium, uwalniają mediatory i proteiny aktywnie trawiące barierę błony podstawnej, co umożliwia reorientację, migrację i proliferację śródbłonka (92,93). W efekcie ukierunkowanej migracji tych komórek powstają kolejno zawiązki naczyniowe i formacje kapilaro-podobne, tworzy się światło naczyń, które następnie przekształcają się we właściwe struktury kapilarne. Proces neoangiogenezy wymaga więc w równej mierze udziału komórek śródbłonka już istniejących naczyń, jak i zaistnienia na poziomie molekularnym swoistej, ukierunkowanej ekspresji cząstek adhezyjnych oraz proteinaz trawiących elementy macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie kolagenaz i aktywatorów plazminogenu (94).

Zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w tkance nowotworowej, uPA i PAI-1 obecne są w znaczących ilościach wokół tworzących się naczyń (10,93,95). Naruszenie delikatnej równowagi charakteryzującej *in vivo* układ biologiczny nowopowstających kapilarów, jak również wzorowany na nim model doświadczalny *in vitro*, prowadzi do zmian w aktywności poszczególnych elementów tego systemu, a w efekcie do zahamowania, bądź stymulacji procesu angiogenezy (22,37,48). Obserwowany w niniejszej pracy silny, supresyjny efekt wywierany przez zmodyfikowane postaci CysPAI-1 charakteryzujące się wydłużoną aktywnością anty-proteolityczną jasno dowodzi znaczącej roli, jaką w przebiegu neowaskularyzacji pełni zależna od urokinazy proteoliza.

Wprowadzenie do środowiska doświadczalnego wariantów CysPAI-1 o przedłużonej stabilności zapewniło dominującą pozycję antyproteolityczną, powodując gwałtowne zahamowanie tak produkcji, jak i uwalniania urokinazy przez komórki śródbłonka. Bezpośrednim następstwem tych zaburzeń była znacząca redukcja powstawania zawiązków naczyniowych w obu zastosowanych modelach angio-

genezy, różniących się pochodzeniem i fenotypem komórek śródbłonka naczyń (96). Obserwowany efekt hamujący był zależny od dawki i najsilniejszy w hodowlach prowadzonych w obecności białka β T CysPAI-1 o stabilnej, niezmienniej w czasie aktywności antyproteolitycznej.

Zaprezentowane wyniki badań są bezspornym dowodem potwierdzającym sugestię o regulacyjnej roli PAI-1 w angiogenezie i pozostają w zgodności z doniesieniami innych autorów analizujących udział tego białka w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych.

W oparciu o wyniki własne, jak również przytoczone prace można stwierdzić, że podstawowe znaczenie w regulacji powstawania zawiązków naczyniowych, a następnie tworzenia naczyń włosowatych ma zdolność PAI-1 do łączenia się z kompleksem uPA-uPAR i indukowania jego internalizacji w komórce (97,98). W ten sposób PAI-1 współtworzy barierę czynnościową chroniącą komórki, w tym również śródbłonka oraz macierz przed nadmierną destrukcją spowodowaną przez znaczącą aktywność uPA (22). Oprócz hamowania proteolizy w bezpośrednim otoczeniu komórek, PAI-1 konkuruje z integrynami i uPAR o połączenie z witronektyną. Blokując ją, uniemożliwia interakcję z śródbłonkiem, zaburza przyleganie jego komórek do macierzy i w efekcie migrację – procesy nieodzowne w formowaniu nowych naczyń (2,6,93).

Znacząco bardziej wyrażony supresyjny efekt białka β T CysPAI-1 w porównaniu do hD β T CysPAI-1, który był obserwowany w zastosowanym modelu angiogenezy *in vitro*, jak również istotnie silniejsze blokowanie przez ten wariant produkcji i uwalniania urokinazy w hodowlach komórek śródbłonka, jednoznacznie potwierdza fundamentalną rolę powinowactwa do urokinazy i anty-proteolitycznej aktywności PAI-1 w regulacji angiogenezy. W niniejszej pracy po raz pierwszy zaprezentowano efekty działania zmodyfikowanej postaci PAI-1 charakteryzującej się niezwykle długim czasem półtrwania ($T_{1/2} \sim 7000$ godzin), który warunkuje jego stałą i pełną aktywnością względem urokinazy przez cały czas trwania eksperymentu.

Supresyjne działanie zmodyfikowanych postaci PAI-1 o wydłużonym czasie działania obserwowali wcześniej inni autorzy w warunkach *in vitro* w teście formowania zawiązków naczyniowych (22,35), jak również *in vivo* w teście zarodków kurzych (36,99). Stefansson i wsp. wykazali, że wysokie stężenia zmutowanej postaci 14-1b PAI-1 ($T_{1/2} = 145$ godzin) powodowały silne zahamowanie proteolizy, co z kolei osłabiało fibrynolizę składowych macierzy niezbędną dla migracji komórek i hamowało angiogenezę (36). Zauważono, że nadmierna proteoliza

może być też przyczyną utraty punktów adhezji zlokalizowanych na powierzchni komórek, co w konsekwencji zaburza ich interakcję z otoczeniem i negatywnie wpływa na proces formowania naczyń (45). Jednak w żadnej z cytowanych publikacji nie udało się z powodu trudności technicznych, czyli ograniczonego czasu półtrwania zmutowanych wariantów PAI-1, stworzyć tak czytelnego modelu doświadczalnego jak w niniejszej pracy. Co więcej, wyjątkowa charakterystyka wariantu β T CysPAI-1 do pewnego stopnia upodabnia zastosowany układ *in vitro* do modeli *in vivo* z udziałem zwierząt transgenicznych o nadmiernej ekspresji PAI-1. W obu przypadkach badane środowisko doświadczalne cechuje stała obecność aktywnej postaci tego białka.

Stabilna aktywność anty-proteolityczna wariantu β T CysPAI-1 ma również liczne analogie z nadmierną ekspresją PAI-1, często obserwowaną w tkankach nowotworowych. Należy jednak zauważyć, że w tym ostatnim przypadku istotne znaczenie ma również wzmożona produkcja uPA i wzajemna interakcja obu tych białek.

Warto również raz jeszcze podkreślić widoczną dla obu badanych wariantów CysPAI-1 zależność pomiędzy efektem supresyjnym, a zastosowaną dawką. Im wyższe stężenie białka w żelu fibrynowym, czy też hodowli komórek, tym silniejsze hamowanie. Wspomniana relacja jest kolejną przesłanką potwierdzającą regulacyjne działanie PAI-1 wynikające z jej interakcji z samą urokinazą, jak również uPA – uPAR- zależnymi mechanizmami.

Bardzo interesujące wnioski przyniosły też dokonane w ramach niniejszej pracy obserwacje dotyczące wpływu rosnących stężeń wPAI-1 na proces angiogenezy. Podczas gdy oba badane warianty CysPAI-1 ujawniały swe działanie hamujące niezależnie od fenotypu komórek śródbłonna formujących zawiązki naczyniowe w warunkach *in vitro*, wPAI-1 wykazał całkowicie odmienną aktywność, różną w hodowlach komórek HUVEC i HLMVEC.

W agregatach typowych komórek śródbłonna, jakimi są komórki HUVEC stwierdzono zależną od dawki stymulację powstawania zawiązków naczyniowych. Obserwowanemu pobudzeniu aktywności proangiogennej nie towarzyszyły jednak równoległe zmiany w produkcji i uwalnianiu urokinazy przez te komórki. Dowodzi to bezspornie braku anty-proteolitycznej aktywności wPAI-1 w prezentowanym układzie podczas trwania doświadczeń.

Przedstawione wyniki wydają się więc potwierdzać tezę, że wPAI-1 wraz z utratą zdolności do reagowania z uPA, zyskuje nową charakterystykę czynnościową. Przytoczone wyniki są prawdopodobnie bezpośrednim następstwem utraty właściwości anty-proteolitycznych i ujawnienia się

aktywności wPAI-1 związanej z blokowaniem interakcji pomiędzy integrzynami $\alpha_v\delta_3$ i $\alpha_v\delta_5$, a witronektyną oraz z następczą stymulacją migracji komórek śródbłonna i tworzeniem nowych struktur naczyniowych. W piśmiennictwie dostępne są też doniesienia sugerujące istnienie dodatkowego, niezidentyfikowanego mechanizmu proangiogenego, który może być związany z nabywaniem nowej charakterystyki czynnościowej przez postaci nieaktywne – latentne, bądź zmienione strukturalnie, jak to ma miejsce w przypadku niektórych serpin (22). Stwierdzono, że nieaktywne formy antytrombiny II oraz czynnika wzrostu pochodzenia nabłonkowego cechują całkowicie nowe modulacyjne właściwości (100).

Podobnie radykalna zmiana aktywności wydaje się dotyczyć również wPAI-1. W warunkach fizjologicznych wPAI-1 kompetycyjnie konkuruje z kompleksem uPA-uPAR oraz integrzynami prezentowanymi na macierzy zewnątrzkomórkowej o dostęp do miejsca aktywnego na witronektynie. Jednak w razie utraty właściwości anty-proteolitycznych jego działanie biologiczne ulega całkowitej zmianie i w efekcie wPAI-1 pozbawiony zdolności do blokowania proteolizy, staje się czynnikiem działającym raczej pro-migracyjnie i pro-angiogenicznie (101). Zaprezentowana hipoteza, oparta na przytoczonych obserwacjach własnych, pozostaje w zgodzie z wynikami innych autorów, którzy opisywali podobne efekty działania latentnych form tego białka (22).

Obserwowany w ramach niniejszej pracy wpływ wPAI-1 na komórki śródbłonna płucnych naczyń kapilarnych (HLMVEC) był całkowicie odmienny niż w hodowlach HUVEC (102). Na szczególne podkreślenie zasługuje znamienne statystycznie działanie hamujące wywierane przez najwyższe z zastosowanych stężeń wPAI-1. Wydaje się prawdopodobnym, że stopień zahamowania uPA w hodowlach komórek śródbłonna kapilarów płucnych, znacząco wyższy niż w przypadku komórek HUVEC (51,32% - 69,86% w hodowlach komórek HLMVEC wobec 28,9% - 31,24% w nadsączu hodowli komórek HUVEC) był na tyle duży, iż spowodował przesunięcie równowagi w układzie doświadczalnym w stronę aktywności anty-angiogennej. Innymi słowy, spadek wyjściowo bardzo wysokiej aktywności proteolitycznej mikrośrodowiska był wystarczający, aby przewagę zyskały czynniki anty-angiogenne, niezależnie od obecności w układzie latentnej postaci wPAI-1.

Warto również rozważyć hipotezę, że istotne znaczenie dla obserwowanego efektu hamującego wPAI-1 może mieć odmienny fenotyp komórek HLMVEC. Ich wysoka spontaniczna produkcja uPA może być związana z istnieniem pewnych

odmienności w zależności od urokinazy regulacji mechanizmów warunkujących proangiogenną aktywność tych komórek.

Potwierdzeniem tej tezy wydaje się być obserwacja, że czas konieczny do odtworzenia równowagi w układzie, tzn. uwolnienia przez komórki urokinazy w ilości wystarczającej dla zneutralizowania działania wPAI-1, był dłuższy niż 12 godzinny okres hodowli. Znaczące obniżenie poziomu uPA w homogenatach komórek, o prawie 50-60% w zależności od użytego stężenia PAI-1, w porównaniu do 10-12% spadku w homogenatach komórek HUVEC, obserwowano również po upływie tego czasu. Opisane różnice w charakterystyce czynnościowej obu typów komórek śródbłonna są też najprawdopodobniej podstawową przyczyną obserwowanych rozbieżności w działaniu wPAI-1 w modelu angiogenezy *in vitro*. Wysoki wyjściowy poziom produkcji uPA przez komórki HLMVEC w porównaniu do HUVEC spowodował, że względny efekt supresyjny wPAI-1 w tym układzie doświadczalnym, choć krótkotrwały był jednak wystarczający dla uzyskania znaczącego zahamowania produkcji uPA, a w konsekwencji procesu tworzenia zawiązków naczyniowych. Uprawniona jest również hipoteza, że komórki HLMVEC produkując znacząco wyższe ilości urokinazy, dysponują też istotnie większą pulą uPA związanego z receptorem uPAR na powierzchni tych komórek i internalizują ten kompleks znacznie efektywniej niż HUVEC. W efekcie szybciej dochodzi do unieczynnienia uPA w środowisku okołokomórkowym, a w następstwie do zahamowania angiogenezy.

W pełni zasadne wydaje się więc przypuszczenie, że biologiczny efekt działania PAI-1 jest istotnie silniejszy, a przez to czynnościowo bardziej znaczący w mikrośrodowisku charakteryzującym się wysoką produkcją/poziomem urokinazy, co wielokrotnie wykazywano dla litych guzów nowotworowych oraz komórek śródbłonna kapilarów płucnych (96,103).

Badania *in vitro* potwierdziły, że proces formowania kapilaro-podobnych struktur przez komórki śródbłonna naczyń w krytycznym stopniu zależy od degradacji fibryny inicjowanej przez uPA i plazminogen znajdujące się na powierzchni komórki, a przede wszystkim na jej krawędzi nadającej kierunek migracji – skierowanej ku przodowi (*leading edge*) (104). Wiadomo, że uPAR zarówno w postaci wolnej, jak i związanej w kompleksy z uPA koncentruje się w miejscach szczególnie intensywnego kontaktu (*focal adhesion*) pomiędzy komórką, a macierzą. W tych samych obszarach błony komórkowej gromadzą się również integryny (*clustering*), które wchodzi w interakcję z filamentami aktyno-

wymi, a więc składnikami strukturalnymi komórki (10). W rezultacie uPA, obok licznych wielokrotnie wspomnianych efektów działania na czynność komórki, indukuje znaczące zmiany w strukturze jej cytoskieletu i kształcie. Analizując w niniejszej pracy wpływ PAI-1 na aktywność angiogenną komórek śródbłonna, zauważono również jego istotny modulujący wpływ na kształt tworzących się zawiązków naczyniowych. Stwierdzono, że PAI-1 równoległe do zmiany ich całkowitej długości modulował również, w sposób zależny od dawki, średnią długość oraz powierzchnię jednostkowego zawiązku. Nieoczekiwanie, najsilniej zmienionym parametrem była nie długość, lecz powierzchnia jednostkowego zawiązku, a więc średnia wartość powierzchni pojedynczej struktury wyrastającej z danego agregatu komórek. Wydaje się więc, że zawiązki naczyniowe inwoluuje na skutek działania rosnących stężeń CysPAI-1 zmniejszają najpierw swój wymiar poprzeczny (stają się węższe), a dopiero później podłużny (stają się krótsze).

Przytoczone obserwacje dobrze wpisują się w aktualne poglądy na zróżnicowaną rolę mechanizmów proteolitycznych i nieproteolitycznych w procesach inwazyjności komórek. Przez analogię z mechanizmami migracji komórek przyjmuje się, że na skierowanym ku przodowi (*leading edge*) brzegu zawiązku dominują zależne od uPAR mechanizmy nieproteolityczne do których zalicza się przede wszystkim stymulujące adhezję oddziaływanie pomiędzy uPAR i witronektyną oraz pomiędzy uPAR i integrzynami. Pełnią one kluczową rolę w ukierunkowywaniu wzrostu zawiązku, jak również zapewniają trącję adekwatną aby stymulować jego wydłużanie. Natomiast na bocznych powierzchniach zawiązku, znów przez analogię do migrującej komórki, lokalizuje się przede wszystkim plazminogen. W efekcie katalizowany przez plazminę rozpad białek macierzy i receptorów integrzynowych ułatwia przemieszczanie w środowisku zewnątrzkomórkowym i uwolnienie tylnej części migrującej komórki (*trailing edge*) (93). Taki rozkład aktywności proteolitycznej na powierzchni zawiązku oznacza, że silna anty-proteolityczna aktywność CysPAI-1 w pierwszym rzędzie zmieniałaby aktywność elementów dominujących na jego bocznej powierzchni, co faktycznie potwierdziły nasze obserwacje (105).

Warto również podkreślić, że wPAI-1 pomimo znaczącego działania proangiogennego, ocenianego przez pryzmat rosnącej całkowitej długości powstających zawiązków, nie zmienił w żadnym stopniu ich kształtu – średniej powierzchni, czy też długości. Wydaje się jednak, że sprzeczność ta ma charakter pozorny i jest doskonałym przykładem

wpływu, jaki na wynik końcowy ma zastosowanie odmiennego niż zazwyczaj sposobu obliczania danych. Całkowita długość zawiązków przypadająca na jednostkowy agregat komórek była uzyskiwana w niniejszej pracy w wyniku prostego sumowania długości poszczególnych zawiązków. Tymczasem wartość średniej długości jednostkowego zawiązku powstawała poprzez uśrednienie danych jednostkowych. W oczywisty sposób obie metody wpływały na wartość rozrzutu standardowego, który był znacznie wyższy dla uśrednianych wartości jednostkowej powierzchni i długości niż dla sumy jaką był parametr całkowitej długości.

Implikacje dla regulacji procesu formowania przerzutów do płuc

Białka należące do układu plazminogen – plazmina, poza efektywną proteolizą okołokomórkową, sprawnie regulują również zależną od uPAR polaryzację ekspresji proteinaz w kontaktach międzykomórkowych i w oddziaływaniu komórki z macierzą lub też na wiodącym krańcu komórki (*leading edge*) (2). Dzięki temu gwarantują ściśle określony porządek wydarzeń w szerokim spektrum procesów, począwszy od migracji komórek zapalnych i nowotworowych w tkankach, przez fizjologiczną i patologiczną angiogenezę, aż po procesy rozwoju guza i formowania przerzutów lokalnych oraz odległych (106). Pozyskanie wariantu β CysPAI-1 charakteryzującego się stabilną aktywnością antyproteolityczną stwarza możliwość, na poziomie doświadczalnym, zneutralizowania zbędnej aktywności uPA, a co za tym idzie przejęcia kontroli nad przebiegiem wymienionych procesów. Szczególnie interesująca wydaje się możliwość kontrolowania procesów rozwoju guza nowotworowego, jego progresji lokalnej oraz do odległych narządów.

Mechanizmy regulujące powstawanie przerzutów, są podobnie jak neoangiogeneza – zbliżone w dużej mierze do procesów migracji komórek w tkankach. Kluczową rolę odgrywa w nich punktowa proteoliza zależna od plazminy oraz enzymów trawiących macierz (2). Dlatego też, bezspornie wy-

kazana w niniejszej pracy supresyjna aktywność β T CysPAI-1 wobec procesów angiogenezy pozwala mieć nadzieję, że dalsza kontynuacja badań nad zastosowaniem genetycznie modyfikowanych wariantów PAI-1 zaowocuje w przyszłości opracowaniem nowych form terapii anty-nowotworowej (107).

Obiecujące wydają się również wykazane w niniejszej pracy różnice pomiędzy efektami działania PAI-1 w hodowlach śródbłonna naczyniowego o różnym fenotypie czynnościowym. Komórki endotelium kapilarów płucnych charakteryzuje intensywna ekspresja i uwalnianie znacznych ilości urokinazy, wielokrotnie wyższych niż stwierdza się w przypadku innych komórek śródbłonna (108). Ta unikalna charakterystyka nabiera kluczowego znaczenia w sytuacji, gdy w ich bezpośrednim sąsiedztwie, w naczyniach włosniczkowych płuc pojawiają się komórki nowotworowe, na ogół intensywnie ekspozujące powierzchni receptory dla urokinazy (39). Wielokrotnie wykazywano istnienie bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją uPA, bądź uPAR na komórkach nowotworowych, a ich zdolnością metastatyczną (49,60,109,110). Wysoka ekspresja uPA w skojarzeniu z intensywnym ekspozowaniem uPAR stanowią przyjazne środowisko dla komórek podejmujących próbę przeniknięcia przez barierę błony podstawnej. Wiadomo, że zdolność inwazyjna komórek przerzutów jest w dużej mierze zależna od wzbudzenia enzymów proteolitycznych, a więc wiąże się bezpośrednio z aktywnością urokinazy i przekształceniem plazminogenu do plazmidy (2,6,93). Obserwowane w niniejszej pracy bardzo silne działanie hamujące β T CysPAI-1, zarówno na proces tworzenia zawiązków naczyniowych przez komórki śródbłonna kapilarów płucnych, jak i produkcję/uwalnianie przez nie urokinazy uzasadnia ostrożne nadzieje na wykorzystanie tych doświadczeń w przyszłości. Regulacyjna rola PAI-1 we kluczowych procesach decydujących o postępie szeroko rozumianej choroby nowotworowej w połączeniu z unikalną strukturą β T CysPAI-1 i jego wysoką efektywnością wobec komórek śródbłonna kapilarów płucnych stanowi silną argumentację dla podjęcia dalszych badań w tym kierunku.

WNIOSKI

1. Wprowadzenie do struktury białka PAI-1 podstawników cysteinowych zmienia stabilności jego konformacji aktywnej, prawdopodobnie na skutek powstania dodatkowych wiązań dwusiarczkowych w trzeciorzędowej strukturze białka. Kluczowe znaczenie dla nasilenia uzyskanego efektu ma lokalizacja wprowadzonych wiązań, a nie ich liczba. Najefektywniejsze działania stabilizujące, zachowujące pełną aktywność PAI-1 ($T_{1/2} \sim 6900$ godzin) zapewniło wprowadzenie dwóch punktowych mutacji Cys197-Cys355 zlokalizowanych w górnej części łańcuchów A3 i A5, u podstawy pętli zawierającego aktywne miejsce cząsteczki PAI-1. Wbrew teoretycznym przewidywaniom CysPAI-1 z sześcioma punktowymi mutacjami charakteryzował czas półtrwania o długości zbliżonej do wPAI-1.
2. Powstanie mostków dwusiarczkowych w obrębie struktury białkowej PAI-1 prowadzi do wydłużenia czasu półtrwania niektórych białek CysPAI-1 bez towarzyszących zmian w ich aktywności antyproteolitycznej wobec urokinazy oraz właściwościach kinetycznych ocenianych w porównaniu do wPAI-1.
3. Modyfikowane postaci PAI-1 o przedłużonym czasie półtrwania silnie hamują aktywność angiogenną komórek śródbłónka naczyniowego niezależnie od jego fenotypu czynnościowego, modyfikują również strukturę powstających związków naczyniowych.
4. wPAI-1 pozbawiony aktywności proteolitycznej wykazuje znaczące działanie proangiogenne wobec komórek śródbłónka ludzkiej żyły pępowinowej, lecz nie wobec komórek śródbłónka ludzkich kapilarów płucnych.
5. Zahamowaniu aktywności angiogennej komórek śródbłónka pod wpływem zmodyfikowanych białek PAI-1 towarzyszy znaczące ograniczenie uwalniania i produkcji urokinazy przez te komórki, co potwierdza kluczowe znaczenie urokinazy w procesach neowaskularyzacji, jak również mechanizmu antyproteolitycznego w hamującym działaniu PAI-1. Zależności te potwierdza znacząco silniejszy efekt supresyjny wywierany na komórki przez Cys PAI-1 o niezmiennej w czasie aktywności antyproteolitycznej.
6. Komórki śródbłónka kapilarów płucnych charakteryzuje szczególny fenotyp czynnościowy związany z intensywną ekspresją i uwalnianiem znacznych ilości urokinazy. Znaczenie tego fenotypu dla procesów formowania się przerzutów nowotworowych do płuc, jak również potencjalna rola wPAI-1 i Cys PAI-1 wymagają dalszych badań.

STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Rola inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 w regulacji aktywności angiogennej komórek śródbłonna naczyniowego – implikacje dla regulacji procesu powstawania przerzutów nowotworowych do płuc

Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (*plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1*) jest ważnym elementem decydującym o zachowaniu fizjologicznej równowagi układów krzepnięcia i fibrynolizy w warunkach *in vivo*, pełniąc kluczową rolę w regulacji aktywności urokinazy (uPA) i powstawania plazminy. Nieprawidłowa ekspresja PAI-1 stwierdzana jest w wielu stanach chorobowych, odgrywa również kluczową rolę w procesach rozrostu i inwazji guza nowotworowego oraz powstawania przerzutów.

Wzrost i rozprzestrzenianie komórek nowotworowych oraz nierozłącznie z nimi związane procesy angiogenezy nowotworowej, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych pod wpływem mediatorów uwalnianych przez komórki guza, są od lat przedmiotem intensywnych badań w celu wyjaśnienia rządzących nimi zależności, a w efekcie pozyskania możliwości bezpośredniego hamowania rozwoju choroby. Jednak mimo wieloletnich badań nad rolą PAI-1 w procesach patogenezy nowotworu, mechanizm jego działania nadal pozostaje niejasny. Niejednoznaczne wyniki badań doświadczalnych dotyczących wpływu PAI-1 na kluczowe elementy patomechanizmu rozwoju guza nowotworowego – migrację i inwazyjność komórek nowotworowych, angiogenezę nowotworową, oraz powstawanie przerzutów odległych pozostają w sprzeczności z doniesieniami o kluczowej w wymienionych procesach stymulującej roli urokinazy, której PAI-1 jest najsilniejszym fizjologicznym antagonistą oraz z silnym działaniem antyangiogennym i przeciwnowotworowym syntetycznych inhibitorów urokinazy (toksycznych w warunkach *in vivo*).

Jednoznaczne określenie wpływu PAI-1 na wymienione procesy utrudnia przede wszystkim jego unikalna charakterystyka kinetyczna ($T_{1/2}$ =1-2 godzin) warunkująca krótki okres pełnej aktywności PAI-1 wobec uPA i utrudniająca klarowną interpretację wyników badań doświadczalnych.

W zespole badawczym Department of Physiology and Molecular Biology Medical College of Ohio (Stany Zjednoczone) od lat pracującym nad zagadnieniami roli PAI-1 w patogenezie nowotworów podjęto prace nad uzyskaniem zmodyfikowanej postaci PAI-1 cechującej się przedłużoną w czasie aktywnością anty-proteolityczną, co pozwoliłoby na zweryfikowanie wymienionych wątpliwości i uzyskanie znaczącego postępu w rozumieniu mechanizmów działania PAI-1. Po przeanalizowaniu budowy cząsteczki PAI-1 do jego struktury pierwszorzędowej wprowadzono odpowiednie mutacje punktowe, tak by zamienniki cysteinowe spontanicznie tworząc mostki dwusiarczkowe, stabilizowały strukturę białka znacząco wydłużając czas jego półtrwania, czyli okres efektywnej interakcji PAI-1 z uPA.

Niniejsza praca stanowi kontynuację projektu. Jej celem było uzyskanie w komórkach kompetentnych ekspresji zaprojektowanych zmodyfikowanych białek PAI-1 zawierających podstawniki cysteinowe oraz ich izolacja

w czystszej postaci, a następnie dokonanie pełnej analizy ich aktywności anty-proteolitycznej i właściwości kinetycznych w porównaniu do natywnej postaci (wPAI-1), a w dalszych etapach przebadanie właściwości biologicznych w teście angiogenezy *in vitro*.

Wykorzystując nowoczesne techniki biologii molekularnej uzyskano w sumie siedem zaprojektowanych wariantów zmodyfikowanych form PAI-1 różniących się liczbą i lokalizacją wprowadzonych wiązań dwusiarczkowych. Analiza ich właściwości anty-proteolitycznych i kinetycznych wykazała, że powstanie mostków dwusiarczkowych w obrębie struktury białkowej PAI-1 prowadziła do umiarkowanego, bądź znacznego wydłużenia czasu półtrwania jedynie części zmodyfikowanych białek CysPAI-1, a kluczowe znaczenie dla nasilenia uzyskanego efektu miała lokalizacja zamienników cysteinowych i wprowadzonych wiązań, a nie ich liczba. Najefektywniejsze działanie stabilizujące, zachowujące pełną, niezmienną w czasie, aktywność PAI-1 ($T_{1/2}$ ~ 6900godzin) zapewniło wprowadzenie dwóch punktowych mutacji zlokalizowanych w górnej części łańcuchów A i B, u podstawy łańcucha zawierającego aktywne miejsce cząsteczki PAI-1. Natomiast CysPAI-1 z sześcioma punktowymi mutacjami charakteryzował czas półtrwania o długości zbliżonej do wPAI-1. Wykazano również, że wprowadzenie do struktury białka PAI-1 podstawników cysteinowych zmienia stabilności jego konformacji aktywnej, prawdopodobnie na skutek powstania dodatkowych wiązań dwusiarczkowych w trzeciorzędowej strukturze białka. Nie powoduje jednak zmian w ich aktywności anty-proteolitycznej wobec urokinazy oraz właściwościach kinetycznych ocenianych w porównaniu do wPAI-1.

Oceny aktywności biologicznej zmodyfikowanych białek PAI-1 wobec komórek śródbłonna naczyniowego dokonano w teście angiogenezy *in vitro* wykorzystując komórki śródbłonna naczyniowego o zróżnicowanym fenotypie czynnościowym – komórki śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC) i komórki śródbłonna kapilarnych naczyń płucnych (HLMVEC). Wykazano, że zmodyfikowane postaci PAI-1 o przedłużonym czasie półtrwania silnie hamują aktywność angiogenną komórek śródbłonna naczyniowego niezależnie od jego fenotypu czynnościowego, modyfikując strukturę powstających zawiązków naczyniowych – ich długość i powierzcnięcie. Uzyskany efekt hamujący był zależny od dawki, jak również czasu półtrwania aktywnej postaci zmodyfikowanej formy PAI-1. Najsilniejsze działanie wykazywała postać CysPAI-1 charakteryzująca się stabilną, niezmienną w czasie aktywnością anty-proteolityczną. Należy również podkreślić, że wPAI-1 pozbawiony aktywności proteolitycznej wykazywał znaczące działanie proangiogenne wobec komórek ludzkiego śródbłonna żyły pępowinowej, ale nie wobec komórek ludzkiego śródbłonna kapilarów płucnych, co wynikało z odmiennej charakterystyki czynnościowej tych komórek. Powyż-

sza obserwacja wydaje się być ważnym przyczynkiem w analizie niejednoznacznych wyników części doniesień dotyczących roli PAI-1 w patogenezie nowotworów.

Wykazano ponadto, że zahamowaniu aktywności angiogennej komórek śródbłonna pod wpływem zmodyfikowanych białek PAI-1 towarzyszyło znaczące ograniczenie uwalniania i produkcji urokinazy. Obserwacja ta potwierdziła kluczowe znaczenie urokinazy w procesach neowaskularyzacji, jak również mechanizmu anty-proteolitycznego w hamującym działaniu PAI-1, uzasadnia również znacząco silniejszy efekt supresyjny wywierany na komórki przez Cys PAI-1 o niezmienniej w czasie aktywności antyproteolitycznej.

W części badań *in vitro* przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wykorzystano komórki śródbłonna

kapilarów płucnych charakteryzujące się szczególnym fenotypem czynnościowym związanym z intensywną ekspresją i uwalnianiem znacznych ilości urokinazy. Wydaje się on mieć kluczowe znaczenie dla procesów formowania się przerzutów nowotworowych do płuc ze względu na istnienie bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją powierzchniowych receptorów dla urokinazy na komórkach nowotworowych, a ich inwazyjnością. Silne działanie supresyjne badanych zmodyfikowanych postaci PAI-1 o przedłużonym czasie działania na aktywność angiogenną i produkcję oraz uwalnianie urokinazy przez komórki śródbłonna kapilarów płucnych uzasadnia dalszą kontynuację badań i pozwala mieć nadzieję na zastosowanie zmodyfikowanych postaci PAI-1 do prac nad uzyskaniem nowych terapii przeciwnowotworowych.

Joanna Chorostowska-Wynimko

The role of plasminogen activator inhibitor type-1 in the regulation of endothelial cells activity – implications for the lung metastasis formation control.

Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), is a unique member of serpin (*serine proteinase inhibitors*) superfamily, the primary regulator of plasminogen activation and therefore essential factor regulating physiological thrombotic/fibrinolytic balance *in vivo*. PAI-1 is considered one of the key regulators of tumor invasion and metastasis, as well as cancer-related angiogenesis, moreover its abnormal expression has been reported in many other human diseases.

Although PAI-1 decisive role in number of pathologies including tumor growth and neovascularization has been commonly accepted, detailed mechanism of its action needs further clarification. In particular, the contradictory results concerning its role in cancerogenesis are most inconsistent with the significant stimulatory effect of urokinase (uPA) – strongly and specifically inhibited by PAI-1 as well as proven anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic uPA inhibitors. It was repeatedly suggested that unique kinetic PAI-1 characteristics, mainly its short half-life time ($T_{1/2}=1-2$ hours) might considerably affect the experimental data. Therefore, it was proposed by Jankun et al that substituting certain aminoacids with cysteine residues might produce disulfide bridges stabilizing PAI-1 molecule in the active conformation. Presently first as a practical experimental confirmers of this hypothesis.

Its aim study was to express and isolate the modified CysPAI-1 proteins, analyze their anti-proteolytic activity and kinetic characteristics as well as examine biological activity, specifically PAI-1 – endothelial cells interaction.

The evaluation of seven constructed CysPAI-1s properties has proven that the localization of disulfide bonds but not their number was decisive in achieving the stabilization of PAI-1 active conformation and prolonging its half-life time. Introduction of Cys197-Cys355 residues at the top of the β -sheet produced the CysPAI-1 characterized by the stable anti-proteolytic activity towards urokinase ($T_{1/2} \sim 6900$ hours), while the CysPAI-1 with maximal number of six point mutations presented $T_{1/2}$ equivalent to wPAI-1 half-life time. It was proven as well that Cys residues did not affect the Cys PAI-1s kinetic

properties as compared to wPAI-1.

The biological activity of CysPAI-1 characterized by the prolonged half-life time and specifically PAI-1 – endothelial cell interaction has been analyzed in the *in vitro* sprout formation assay using two functionally different EC systems – human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human lung microvascular endothelial cells (HLMVECs). Examined CysPAI-1s significantly inhibited the *in vitro* angiogenic activity of both HUVEC and HLMVEC cells, modifying as well the newly-formed sprouts structure – their length and area. The exerted effect was dose-dependent and stronger for the CysPAI-1 characterized by the longest $T_{1/2}$ with stable-in-time anti-proteolytic activity. Moreover, it was paralleled by the corresponding suppression of the urokinase production and release by the endothelial cells.

The wPAI-1 effect was diverse, with dose-dependent induction of sprout formation by HUVECs and no significant effect in HLMVECs cultures. This observation might prove important in understanding contradictory experimental data concerning the PAI-1 effect on tumorigenesis as demonstrated divergent wPAI-1 effects in functionally different settings.

Similarly, of particular interest seems the distinctive inhibitory effect of CysPAI-1 characterized by the prolonged anti-proteolytic activity on the lung capillaries endothelial cells representing specific functional characteristics – ability to express and produce extremely high amounts of uPA. Direct relationship between the expression of urokinase receptors on the cancer cells and their invasiveness as well as HLMVECs strategic position in the lungs as a first-line cells interacting with metastasizing cancer cells further on proves exceptional importance of CysPAI-1 phenomenon. Therefore, further studies on the implementation of modified PAI-1 forms might prove extremely valuable for the development of the new anti-tumor treatments.

PIŚMIENICTWO:

1. Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L i wsp. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest* 1986;78:1673-1680.
2. Chorostowska-Wynimko J, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Plasminogen activator inhibitor type-1: Its structure, biological activity and role in tumorigenesis (Review). *Int J Mol Med* 2004;13:759-766.
3. Yamamoto K, Saito H. A pathological role of increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human or animal disorders. *Int J Hematol*. 1998;68:371-385.
4. Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* 2003;126:1590-1598.
5. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L i wsp. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:463-473.
6. Stefansson S, McMahon GA, Petitclerc E, Lawrence DA. Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling. *Curr Pharm Des* 2003;9:1545-1564.
7. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L i wsp. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:463-473.
8. Conese M, Blasi F. The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Baillieres Clin Haematol*. 1995;8:365-389.
9. Lijnen HR, Maquoi E, Hansen LB, Van Hoef B, Frederix L, Collen D. Matrix metalloproteinase inhibition impairs adipose tissue development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:374-379.
10. Andreasen PA, Egelund R, Peterson HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:25-40.
11. Blasi F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today* 1997;18:415-417.
12. 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.
13. Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol* 1998;8:51-54.
14. Sitrin RG, Todd RF, Petty HR, Brock TG, Albrecht E. The urokinase receptor (CD87) facilitates CD11b/CD18-mediated adhesion of human monocytes. *J Clin Invest* 1996;97:1942-1951.
15. Ciambone GJ, McKeown-Longo PJ. Plasminogen activator inhibitor type-1 stabilizes vitronectin-dependent adhesions in HT-1080 cells. *J Cell Biol*. 1990;111:2195-2200.
16. Cariello MV, Del Vecchio S, Franco P, Potena MI, Chiaradonna F, Botti G. Vitronectin binding to urokinase receptor in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1308-1311.
17. Stefansson S, Lawrence D. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin binding to vitronectin. *Nature* 1996;383:441-443.
18. Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J i wsp. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J* 1997;16:2610-2620.
19. Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem. Cell Biol*. 1999;31:539-544.
20. Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 2003;10:544-549.
21. Freyer AM, Johnson SR, Hall IP. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:569-576.
22. McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ i wsp. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:33964-33968.
23. Kanse SM, Chavakis T, Al-Fakhri N, Monard D, Preisner KT. Reciprocal regulation of urokinase receptor (CD87)-mediated cell adhesion by plasminogen activator inhibitor-1 and protease nexin-1. *J Cell Sci* 2004;117:477-485.
24. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 2003;160:781-791.
25. Festuccia C, Vincentini C, di Pasquale AB, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L i wsp. Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncol Res* 1995;7:131-138.
26. Festuccia C, Dolo V, Guerra F, Violini S, Muzi P, Pavan A i wsp. Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:513-528.
27. Gershtein ES, Kushlinskii NE. Urokinase and tissue plasminogen activators and their inhibitor PAI-1 in human tumors. *Bull Exp Biol Med* 2001;131:67-72.
28. Swiercz R, Wolfe JD, Zaher A, Jankun J. Expression of the plasminogen activation system in kidney cancer correlates with its aggressive phenotype. *Clin Cancer Res* 1998;4:869-877.
29. Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci* 2003;94:43-49.
30. Jankun J, Skrzypczak-Jankun E. Molecular basis of specific inhibition of urokinase plasminogen activator by amiloride. *Cancer Biochem Biophys* 1999;17:109-123.
31. Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E, Merrell MM, Selman SH, Jankun J. Angiostatic activity of synthetic inhibitors of urokinase type plasminogen activator. *Oncol Rep* 1999;6:523-526.
32. Bacharach E, Itin A, Keshet E. In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10686-10690.
33. Ploplis VA, Balsara R, Sandoval-Cooper MJ, Yin ZJ, Batten J, Modi N i wsp. Enhanced in vitro proliferation of aortic endothelial cells from PAI-1^{-/-} mice. *J Biol Chem*. 2004;279:6143-6151.
34. Chorostowska-Wynimko J, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E, Wojtowicz A, Selman SH, Jankun J. A novel form of the plasminogen activator inhibitor created by cysteine mutations extends its half-life: relevance to cancer and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2003;2:19-28.
35. Swiercz R, Keck RW, Skrzypczak-Jankun E, Selman SH, Jankun J. Recombinant PAI-1 inhibits angiogenesis and reduces size of LNCaP prostate cancer xenografts in SCID mice. *Oncol Rep* 2001;8:463-470.
36. Stefansson S, Petitclerc E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA. Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 2001;276:8135-8141.
37. Penn JS, Rajaratnam VS. Inhibition of retinal neovascularization by intravitreal injection of human rPAI-1 in a rat model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5423-5429.
38. Brodsky S, Chen J, Lee A, Akassoglou K, Norman J, Goligorsky MS. Plasmin-dependent and -independent effects of plasminogen activators and inhibitor-1 on ex vivo angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1784-H1792.
39. Duffy MJ. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:613-618.
40. Hildenbrand R, Dilger I, Horlin A, Stutte HJ. Urokinase plasminogen activator induces angiogenesis and tumor vessel invasion in breast cancer. *Pathol Res Pract* 1995;191:403-409.

41. Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, Brem S i wsp. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest* 1995;96:2593-2600.
42. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C i wsp. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998;4:923-928.
43. Eitzman DT, Krauss JC, Shen T, Cui J, Ginsburg. Lack of plasminogen activator inhibitor-1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma. *Blood* 1996;87:4718-4722.
44. Almholt K, Nielsen BS, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Johnsen M. Metastasis of transgenic breast cancer in plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. *Oncogene* 2003;22:4389-4397.
45. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M i wsp. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol* 2001;152:777-784.
46. Swiercz R, Keck RW, Skrzypczak-Jankun E, Selman SH, Jankun J. Recombinant PAI-1 inhibits angiogenesis and reduces size of LNCaP prostate cancer xenografts in SCID mice. *Oncol Rep* 2001;8:463-470.
47. Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res* 2000;60:5839-5847.
48. Lambert V, Munaut C, Carmeliet P, Gerard RD, Declerck PJ, Gils A i wsp.. Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2791-2797.
49. He C, He P, Liu LP, Zhu YS. Analysis of expressions of components in the plasminogen activator system in high- and low-metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:180-186.
50. Chazaud B, Ricoux R, Christov C, Plonquet A, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G. Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol.* 2002;160:237-246.
51. Liu G, Shuman MA, Cohen RL. Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer* 1995;60:501-506.
52. Khatib AM, Nip J, Fallavollita L, Lehmann M, Jensen G, Brodt P. Regulation of urokinase plasminogen activator/plasmin-mediated invasion of melanoma cells by the integrin vitronectin receptor alpha beta₃. *Int J Cancer* 2001;91:300-308.
53. Ma D, Gerard RD, Li XY, Alizadeh H, Niederkorn JY. Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in an athymic mouse model. *Blood* 1997;90:2738-2746.
54. Steinmetzer T. Synthetic urokinase inhibitors as potential antitumor drugs. *Drugs.* 2003;6:138-146.
55. Billstrom A, Hartley-Asp B, Lecander I, Batra S, Astedt B. The urokinase inhibitor p-aminobenzamidine inhibits growth of a human prostate tumor in SCID mice. *Int J Cancer* 1995;61:542-547.
56. Jankun J, Keck RW, Skrzypczak-Jankun E, Swiercz R. Inhibitors of urokinase reduce size of prostate cancer xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 1997;57:559-563.
57. Evans DM, Sloan-Stakleff K. Suppression of the invasive capacity of human breast cancer cells by inhibition of urokinase plasminogen activator via amiloride and B428. *Am Surg* 2000;66:460-464.
58. Magdolen V, Arroyo DP, Sperl S, Muehlenweg B, Luther T, Wilhelm OG i wsp. Natural and synthetic inhibitors of the tumor-associated serine protease urokinase-type plasminogen activator. *Adv Exp Med Biol* 2000;477:331-341.
59. Jankun J, Matsumura F, Kaneko H, Trosko JE, Pellicer A, Greenberg AH. Plasmid-aided insertion of MMTV-LTR and ras DNAs to NIH 3T3 fibroblast cells makes them responsive to 2,3,7,8-TCDD causing overexpression of p21ras and down-regulation of EGF receptor. *Mol Toxicol* 1989;2:177-186.
60. Jankun J, Maher VM, McCormick JJ. Malignant transformation of human fibroblasts correlates with increased activity of receptor-bound plasminogen activator. *Cancer Res* 1991;51:1221-1226.
61. Jankun J. Antitumor activity of the type 1 plasminogen activator inhibitor and cytotoxic conjugate in vitro. *Cancer Res* 1992;52:5829-5832.
62. Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ. Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers. *J Cell Biochem* 1993;53:135-144.
63. Jankun J, Skrzypczak-Jankun E. Binding site of amiloride to urokinase plasminogen activator depends on species. *Int J Mol Med* 2001;8:365-371.
64. McCabe NP, Angwafo FF, III, Zaher A, Selman SH, Kouinche A, Jankun J. Expression of soluble urokinase plasminogen activator receptor may be related to outcome in prostate cancer patients. *Oncol Rep* 2000;7:879-882.
65. Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol* 2000;297:683-695.
66. Wilczynska M, Fa M, Ohlsson PI, Ny T. The inhibition mechanism of serpins. Evidence that the mobile reactive center loop is cleaved in the native protease-inhibitor complex. *J Biol Chem* 1995;270:29652-29655.
67. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987;69:381-387.
68. Lindahl TL, Ohlsson PI, Wiman B. The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. *Biochem J* 1990;265:109-113.
69. Wind T, Hansen M, Jensen JK, Andreassen PA. The molecular basis for anti-proteolytic and non-proteolytic functions of plasminogen activator inhibitor type-1: roles of the reactive centre loop, the shutter region, the flexible joint region and the small serpin fragment. *Biol Chem* 2002;383:21-36.
70. Gils A, Declerck PJ. Proteinase specificity and functional diversity in point mutants of plasminogen activator inhibitor 1. *J Biol Chem* 1997;272:12662-12666.
71. Sherman PM, Lawrence DA, Yang AY, Vandenberg ET, Paielli D, Olson ST i wsp. Saturation mutagenesis of the plasminogen activator inhibitor-1 reactive center. *J Biol Chem* 1992;267:7588-7595.
72. Wang Q, Shaltiel S. Distal hinge of plasminogen activator inhibitor-1 involves its latency transition and specificities toward serine proteases. *BMC Biochem* 2003;4:5.
73. Gils A, Knockaert I, Declerck PJ. Substrate behavior of plasminogen activator inhibitor-1 is not associated with a lack of insertion of the reactive site loop. *Biochemistry* 1996;35:7474-7481.
74. Debrock S, Declerck PJ. Neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitory properties: identification of two different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1997;1337:257-266.
75. Xue Y, Bjoquist P, Inghardt T, Linschoten M, Musil D, Sjolín L i wsp. Interfering with the inhibitory mechanism of serpins: crystal structure of a complex formed between cleaved plasminogen activator inhibitor type 1 and a reactive-centre loop peptide. *Structure* 1998;6:627-636.
76. Declerck PJ, De Mol M, Vaughan DE, Collen D. Identification of a conformationally distinct form of plasminogen

- activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1992;267:11693-11696.
77. Berkenpas MB, Lawrence DA, Ginsburg D. Molecular evolution of plasminogen activator inhibitor-1 functional stability. *EMBO J* 1995;14:2969-2977.
78. Lawrence DA, Olson ST, Palaniappan S, Ginsburg D. Engineering plasminogen activator inhibitor 1 mutants with increased functional stability. *Biochemistry* 1994;33:3643-3648.
79. Tucker HM, Mottonen J, Goldsmith EJ, Gerard RD. Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nat Struct Biol* 1995;2:442-445.
80. Brown TA. Rola białek wiążących DNA, W: Brown T.A.: Genomy, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2000, 143-170.
81. Ivens A, Mayans O, Szadkowski H, Jurgens C, Wilmanns M, Kirschner K. Stabilization of a (betaalpha)8-barrel protein by an engineered disulfide bridge. *Eur J Biochem* 2002;269:1145-1153.
82. Shaw A, Bott R. Engineering enzymes for stability. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:546-550.
83. Picone D, Crescenzi O, Angeli S, Marchese S, Brandaza A, Ferrara L i wsp. Bacterial expression and conformational analysis of a chemosensory protein from *Schistosoma gregaria*. *Eur J Biochem* 2001;268:4794-4801.
84. Ronnmark J, Hansson M, Nguyen T, Uhlen M, Robert A, Stahl S i wsp. Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*. *J Immunol Methods* 2002;261:199-211.
85. Strandberg L, Lawrence DA, Johansson LB, Ny T. The oxidative inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 results from a conformational change in the molecule and does not require the involvement of the P1' methionine. *J Biol Chem* 1991;266:13852-13858.
86. Gibson LC, Jensen PE, Hunter CN. Magnesium chelata-se from *Rhodobacter sphaeroides*: initial characterization of the enzyme using purified subunits and evidence for a Bchl-BchD complex. *Biochem J* 1999;337 (Pt 2):243-251.
87. Lawrence D, Strandberg L, Grundstrom T, Ny T. Purification of active human plasminogen activator inhibitor 1 from *Escherichia coli*. Comparison with natural and recombinant forms purified from eucaryotic cells. *Eur J Biochem* 1989;186:523-533.
88. Wagner OF, de Vries C, Hohmann C, Veerman H, Pannekoek H. Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA. *J Clin Invest* 1989;84:647-655.
89. Alessi MC, Declercq PJ, De Mol M, Nelles L, Collen D. Purification and characterization of natural and recombinant human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *Eur J Biochem* 1988;175:531-540.
90. Tacchini L, Matteucci E, De Ponti C, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1. *Exp Cell Res* 2003;290:391-401.
91. Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol* 1998;177:439-452.
92. Ingber D, Folkman J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* 1989;58:805.
93. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L i wsp. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:463-473.
94. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2002;30:173-177.
95. Bajou K, Devy L, Masson V, Albert V, Francken F, Noel A i wsp. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in tumor angiogenesis. *Therapie* 2001;56:465-472.
96. Takahashi K, Uwabe Y, Sawasaki Y, Kiguchi T, Nakamura H, Kashiwabara K i wsp. Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;275:L47-L54.
97. Bajou K, Lewalle JM, Martinez CR, Soria C, Lu H, Noel A i wsp. Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression. *Int J Cancer* 2002;100:501-506.
98. Stefansson S, Lawrence DA. Old dogs and new tricks: proteases, inhibitors, and cell migration. *Sci STKE* 2003;189:24.
99. Roca C, Primo L, Valdembri D, Cividalli A, Declercq P, Carmeliet P i wsp. Hyperthermia inhibits angiogenesis by a plasminogen activator inhibitor 1 – dependent mechanism. *Cancer Res* 2003;63:1500-1507.
100. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996;2:688-692.
101. Sugiura Y, Ma L, Sun B, Shimada H, Laug WE, Seeger R i wsp. The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis. *Cancer Res* 1999;59:1330-1336.
102. Chorostowska-Wynimko J, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E, Selman SH, Jankun J. Plasminogen activator inhibitor type-1 mutants regulate angiogenesis of human umbilical and lung vascular endothelial cells. *Oncology Rep* 2004;12: 1155-1162.
103. Salden M, Splinter TAW, Peters HA, Look MP, Timmermans M, Foekens JA. The urokinase-type plasminogen activator system in resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2000;11:327-332.
104. Kroon ME, Koolwijk P, van Goor H. Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. *Am J Pathol* 1999;154:1742-1745.
105. Chorostowska-Wynimko J, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. The plasminogen activator inhibitor type-1 controls the process of the in vitro sprout formation. *J Physiol Pharmacol* 2004;55,suppl.3: 49-56.
106. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H i wsp. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:3129-3136.
107. Dunbar SD, Ornstein DL, Zacharski LR. Cancer treatment with inhibitors of urokinase-type plasminogen activator and plasmin. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:2085-2092.
108. Muth H, Maus U, Wygrecka M, Lohmeyer J, Grimminger F, Seeger W i wsp. Pro- and antifibrinolytic properties of human pulmonary microvascular versus artery endothelial cells: impact of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med* 2004;32:217-226.
109. Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F i wsp. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer* 2001;37:1554-1561.
110. Morita S, Sato A, Hakayawa H, Ihara H, Urano T, Takada A. Cancer cells overexpress mRNA of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitors in human non-small-cell lung cancer tissue: analysis by Northern blotting and in situ hybridization. *Int J Cancer* 1998;78:286-292.