

BIĄŁKO AKTYWUJĄCE FIBROBLASTY α (FAP α) – UDZIAŁ W GOJENIU TKANEK I KANCEROGENEZIE

FIBROBLAST ACTIVATION PROTEIN α - CONTRIBUTION
IN TISSUES WOUND HEALING AND CANCEROGENESIS

Magdalena JURZAK, Paweł ANTONCZAK, Katarzyna ADAMCZYK

Zakład Kosmetologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie: Białko aktywujące fibroblasty α (FAP α) nazywane także seprazą zaliczane jest do typu II integralnych białek błonowych. FAP α /sepraza zakotwiczona w błonie komórkowej wykazuje aktywność peptydazy serynowej i aktywność żelatynolityczną. FAP α należy do podrodziny S9B post-prolilowych aminopeptydaz dipeptylowych (dipeptylopeptydaz post-prolilowych) peptydaz serynowych. Do podrodziny tej oprócz FAP α /seprazy należy także dipeptylopeptydaza IV (DPPIV). Aktywne FAP α jest homodimerem o masie cząsteczkowej 170 kDa, w skład którego wchodzi dwie podjednostki każda o masie cząsteczkowej 97 kDa. FAP α może także tworzyć heteromeryczny aktywny kompleks enzymatyczny z DPPIV. Oba kompleksy enzymatyczne mogą brać udział w proteolizie składników macierzy pozakomórkowej (ECM). Oprócz zdolności do enzymatycznej degradacji niektórych komponentów macierzy pozakomórkowej, FAP α kontroluje wzrost fibroblastów i interakcje pomiędzy nabłonkiem a mezenchymą podczas embriogenezy, a także procesy naprawy tkanek i kancerogenezy. Białko to jest indukowalnym antygenem ulegającym selektywnej ekspresji na aktywowanych fibroblastach podczas procesów gojenia tkanek, swoistych dla nowotworów fibroblastach (CAFs), podczas tworzenia przerzutów raków nabłonkowych oraz na komórkach niektórych nowotworów złośliwych. Proces gojenia tkanek i kancerogenezy wykazują pewne podobieństwa. Wiele czynników wzrostu, cytokin i proteaz, które produkowane są przez komórki nowotworowe podczas transformacji i progresji nowotworów, bierze udział w procesach gojenia i włóknienia tkanek. FAP α jest markerem miofibroblastów obecnych zarówno podczas gojenia tkanek, procesów włóknienia czy procesu nowotworzenia. Nadekspresja FAP α jest także charakterystyczna dla keloidów (bliznowców), łagodnych rozrostów nowotworowych tkanki łącznej, będących konsekwencją nieprawidłowego procesu gojenia.

Słowa kluczowe: Białko aktywujące fibroblasty α (FAP α), sepraza, fibroblasty, miofibroblasty, fibroblasty związane z nowotworami (CAFs), metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMPs), żelatyna, gojenie tkanek, włóknienie, kancerogeneza.

Summary: Fibroblast activation protein α (FAP α) also known as seprase belongs to type II integral membrane proteins. FAP α /seprase bounded to cell membrane is serine proteinase with gelatinase activity. Serine proteases family included among others S9B post-prolyl dipeptidyl aminopeptidase subfamily. Besides FAP α /seprase, to S9B subfamily belongs dipeptidyl peptidase IV (DPPIV). Catalytically active

FAP α is a 170 kDa homodimer, consisting of two 97 kDa subunits. FAP α besides homodimers also forms heteromeric, catalytically active complexes with DPPIV. Both protease complexes play a role in the degradation of extracellular matrix components (ECM). FAP α besides degradation of selected ECM components controls fibroblasts growth and epidermis – mesenchyme interaction during embryogenesis, as well as tissue repair and carcinogenesis. This protein is an inducible antigen that is selectively expressed in activated fibroblasts during wound healing, in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) during metastasis of epithelial cancers and in cells of some malignant tumors. Wound healing and cancerogenesis exhibit similarities at some points. Many growth factors, cytokines and proteases produced by cancer cells during cancerogenesis and tumor metastasis also play essential role in wound healing and tissue fibrosis. FAP α is a myofibroblast marker. Myofibroblasts are present during wound healing, tissues fibrosis as well as cancerogenesis. FAP α overexpression is also characteristic in keloids that are nonmalignant fibrotic tumors forming in a consequence of improper wound healing.

Key words: fibroblast activation protein a (FAP α), seprase, fibroblasts, myofibroblasts, carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), matrix metalloproteinases (MMPs), gelatinases, wound healing, fibrosis, cancerogenesis.

WSTĘP

Gojenie tkanek i kancerogeneza są dynamicznie postępującymi procesami wykazującymi wiele podobieństw. Oba procesy angażują interakcje komórek różnych tkanek, cytokiny i enzymy proteolityczne [61].

Gojenie tkanek budujących różne narządy (skórę, wątrobę, płuca, nerki) to proces stanowiący jeden z mechanizmów obrony i zachowania homeostazy po zadziałaniu różnego rodzaju czynników uszkodzających. Naprawa uszkodzonych tkanek wymaga aktywacji komórek w ich obrębie, syntezy cytokin umożliwiających komunikację pomiędzy komórkami i ich interakcje ze składowymi macierzy pozakomórkowej – ECM (ang. *extracellular matrix*), a także syntezy enzymów umożliwiających degradację uszkodzonych składowych ECM. W ostatnim etapie gojenia zaktwowowane komórki syntetyzują białka niezbędne do odbudowy uszkodzonej tkanki i enzymy zaangażowane w jej przebudowę [19]. Proces gojenia u dorosłych osobników ma jedynie charakter naprawczy, polegający zazwyczaj na zastąpieniu uszkodzonej tkanki przez tkankę łączną [7, 81].

Skóra jest organem najbardziej narażonym na działanie różnych czynników uszkodzających. Charakter ubytku i uszkodzenie tkanek, istotnie wpływa na sposób gojenia się rany [75]. Powstała blizna skórna może być płaska i niewidoczna. Częściej jednak tworzą się blizny przerosłe lub keloidy, charakteryzujące się nieregularnie rozmieszczonymi, grubymi włóknami kolagenowymi. Zarówno w keloidach, jak i w bliznach przerosłych znamienne zwiększona jest synteza i zmniejszona degradacja białek kolagenowych (szczególnie kolagenu typu I) oraz innych składowych macierzy pozakomórkowej. Są to cechy charakterystyczne procesów fibroproliferacyjnych (włóknienia) [13, 25, 78].

Zasadniczo wyróżnia się trzy główne fazy gojenia ran pełnej grubości skóry: fazę zapalną, fazę proliferacyjną oraz przebudowę nowoutworzonej tkanki (remodelowanie).

Pierwsza faza gojenia – zapalenie rozpoczyna się bardzo szybko, tuż po zadziałaniu czynnika uszkodzającego. W następstwie urazu uruchomione zostają mechanizmy hemostazy obejmujące obkurczenie naczyń, agregację płytek krwi i tworzenie skrzepu, który staje się pierwotnym środowiskiem dla komórek zapalnych. Uszkodzone tkanki są naciekane przez leukocyty obojętnochłonne i makrofagi. Płytki krwi biorące udział w hemostazie są źródłem czynników wzrostu TGF- β 1 (ang. *transforming growth factor beta 1*), TGF- α (ang. *transforming growth factor alpha*), bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) oraz PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*), a aktywowane makrofagi wydzielają PDGF i VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz TGF- β 1. Czynniki te zapoczątkowują tworzenie ziarniny [19, 21, 72].

Faza proliferacyjna trwa zwykle do trzech/czterech tygodni po zadziałaniu czynnika uszkodzającego. W fazie tej dochodzi do transformacji niezróżnicowanych komórek mezenchymatycznych i fibrocytów w fibroblasty. Następnie zaktywowane fibroblasty rozpoczynają migrację do rany. Najważniejszym czynnikiem chemotaktycznym dla fibroblastów jest PDGF. Jest on wydzielany przez makrofagi i płytki krwi. Proliferyację fibroblastów stymulują również TGF- β 1 i TNF- α (ang. *tumor necrosis factor alpha*). Fibroblasty syntetyzują składowe pierwotnej ECM, która ma odbudować uszkodzoną tkankę. ECM działa także jako rezerwuuar cytokin, które zwrótnie wpływają na aktywność fibroblastów. Obydwa te procesy – wzmożonej proliferacji fibroblastów i syntezy ECM określa się terminem fibroplazji [72].

Proces powstawania nowych naczyń krwionośnych – angiogenezy, który jest czynnikiem krytycznym w procesie gojenia rany, inicjowany jest prawdopodobnie przez bFGF wydzielany przez makrofagi i uszkodzone komórki śródbłónki oraz VEGF wydzielany przez keratynocyty i makrofagi brzegów rany pod wpływem TGF- α oraz KGF (ang. *keratinocyte growth factor*) [19, 35].

W fazie proliferacyjnej dochodzi również do reepitelializacji (naskórkowania). Odbudowa naskórkowej bariery oddzielającej środowisko rany od czynników zewnętrznych jest decydującym etapem powrotu do homeostazy podczas gojenia. Powierzchnia ziarniny, dzięki silnemu unaczynieniu jest żywoczerwona i łatwo krwawi przy dotknięciu [52].

Podczas procesu ziarninowania część populacji fibroblastów nabywa morfologiczne i biochemiczne cechy komórek powodujących obkurczanie rany (kontrakcję). Pod wpływem tego procesu zmniejsza się powierzchnia rany, co przyspiesza proces gojenia [38].

Transformacja fibroblastów do miofibroblastów jest stymulowana przez TGF- β 1 i charakteryzuje się zmianami w cytoszkieletie komórek. Zmiana ta dotyczy przede wszystkim znacznego wzrostu ekspresji kurczliwego białka stresowego α -aktyny mięśni gładkich α -SMA (ang. *alpha smooth muscle actin*), tworzącego włókna wewnątrz fibroblastów [38].

W końcowej fazie gojenia, ilość składników macierzy pozakomórkowej oraz gęstość sieci nowopowstałych naczyń ulega zmniejszeniu. Podczas fazy remodelowania, dochodzi również do masowej śmierci apoptotycznej komórek. W szczególności proces ten dotyczy miofibroblastów, których rola sprowadza się do działania obkurczającego ziarninę [38]. Apoptoza warunkuje przekształcenie ziarniny w bliznę [35].

Komórki nowotworowe mogą produkować te same czynniki wzrostu, biorące udział w aktywacji otaczającego nowotwór zrębu (stromy), jakie produkowane są przez komórki podczas gojenia tkanek i procesów włóknienia. Komórkami zrębu [64, 71] lub komórkami mikrośrodowiska nowotworowego nazywa się komórki, które wchodzi w interakcje z komórkami nowotworowymi guza. Komórki nowotworowe współdziałają m.in.: z komórkami śródbłonna, fibroblastami, makrofagami, granulocytami i komórkami tłuszczowymi [8].

W nowotworach występują także komórki pochodzenia mezenchymalnego, swoiste dla nowotworów fibroblasty CAFs (ang. *carcinoma associated fibroblasts*) [36]. CAFs są heterogenną populacją, która różni się znacząco od prawidłowych fibroblastów. Komórki te mają kilka charakterystycznych markerów m.in.: wimentynę i α -SMA. Ze względu na obecność α -aktyny fibroblasty CAFs określa się często mianem miofibroblastów. Białko aktywujące fibroblasty typu α (FAP α) jest markerem miofibroblastów, obecnych zarówno podczas gojenia tkanek, procesów włóknienia, jak i procesu nowotworzenia [26].

ZNACZENIE PROTEAZ W PRZEBUDOWIE MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Proteazy są różnorodną grupą enzymów, do której należą m.in. proteazy serynowe, treoninowe, aspartylowe, cysteinowe oraz metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej MMPs (ang. *matrix metalloproteinases*). Najistotniejszą rolę w procesie degradacji składników ECM odgrywają MMPs i proteazy błonowe. Ze względu na swoistość substratową i budowę chemiczną MMPs dzieli się na: kolagenazy, żelatinazy, stromielizyny, matrylizyny, enamielizyny, metaloelastazy i metaloproteinazy błonowe. Blisko spokrewnionymi enzymami z MMPs są enzymy rodziny adamielizyn ADAMs (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*). Degradacja składników macierzy zależy głównie od równowagi między aktywnością MMPs i ich swoistych tkankowych inhibitorów TIMPs (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*), a także aktywności niespecyficznych inhibitorów takich jak α 2-makroglobulina, α 1-antytrypsyna oraz inhibitor plazminogenu 1 [10, 37, 42, 49].

Metaloproteinazy należą do rodziny wielodomenowych metalozależnych endopeptydaz. W centrum katalitycznym cząsteczki posiadają jon Zn^{2+} [9]. Wymagają również obecności jonów Ca^{2+} , które pełnią rolę stabilizatorów struktury cząsteczki oraz są potrzebne do aktywności proteolitycznej enzymu [45]. Optimum aktywności wykazują w środowisku od obojętnego do słabo zasadowego [76, 79].

Są one wydzielane w postaci proenzymu poza komórkę lub pozostają związane z błoną komórkową [50]. MMPs syntetyzowane są przez szereg komórek, w tym: fibroblasty, keratynocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, komórki dendrytyczne Langerhansa, neurony, komórki mikrogleju, miocyty, monocyty, limfocyty T, granulocyty obojętnochłonne oraz komórki nowotworowe [24, 79].

Aktywność MMP regulowana jest na wielu poziomach w procesach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Zależy przede wszystkim od: ekspresji genów regulowanej przez liczne cytokiny i czynniki wzrostu, stabilizacji bądź destabilizacji ich mRNA, modyfikacji potranslacyjnych (glikozylacji), szybkości sekrecji z komórki, aktywacji proenzymów, hamowania ich aktywności przez TIMPs, a także szybkości katabolizmu [40].

Główną funkcją tych enzymów jest przebudowa i degradacja błony podstawnej oraz składowych ECM [57]. Degradacja składowych ECM znosi fizyczne i strukturalne bariery, umożliwiając tym samym migrację komórek zarówno w warunkach prawidłowych, jak i patologicznych. Enzymy te pełnią krytyczną rolę w przebudowie tkanek w prawidłowym jak i zaburzonym gojeniu ran, a także nowotworzeniu i przerzutowaniu [49].

W przebudowie ECM, a także w sygnalizacji międzykomórkowej oraz sygnalizacji między komórkami i ECM w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, istotne znaczenie ma wypadkowa procesów zachodzących na powierzchni komórek i w najbliższym ich otoczeniu. Kluczowe znaczenie w procesach tych odgrywają proteazy błonowe, do których należą błonowe metaloproteinazy macierzy MT-MMP (ang. *membrane-type matrix metalloproteinase*), wolne MMPs mające zdolność wiązania (zakotwiczenia) w błonie komórkowej (żelatynazy typu A i B), a także inne enzymy związane z błoną komórkową, takie jak FAP α i dipeptylopeptydaza IV (DPPIV) [61].

BIAŁKO AKTYWUJĄCE FIBROBLASTY A (FAP α)

FAP α , wcześniej znany jako antygen powierzchniowy F19, jest indukowalną glikoproteiną powierzchniową komórek, zidentyfikowaną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych F19 (mAb F19) w 1986 roku w hodowli fibroblastów. W 1994 roku, antygen powierzchniowy F19 został nazwany białkiem aktywującym fibroblasty α (FAP α) [61, 69].

W roku 1990 w linii komórkowej ludzkiego czerniaka złośliwego (linia LOX) została zidentyfikowana żelatynaza o masie cząsteczkowej 170 kDa, która w 1994 roku została nazwana seprazą (ang. *surface expressed protease*) [55, 67]. Klonowanie ludzkiego genu FAP α i seprazy wykazało, iż oba białka są tą samą błonową proteazą serynową, kodowaną przez gen zlokalizowany na chromosomie 2 (2q23) [15].

UMIEJSCOWIENIE BIAŁKA AKTYWUJĄCEGO FIBROBLASTY α (FAP α) W KLASYFIKACJI PEPTYDAZ SERYNOWYCH

FAP α należy do integralnych błonowych peptydaz serynowych SIMPs (ang. *serine integral membrane peptidases*). FAP α zakotwiczone w błonie komórkowej wykazuje aktywność peptydazy serynowej i żelatynazy. Białko to zostało za-

klasyfikowane do rodziny oligopeptydaz proliowych (S9), podrodziny S9B post-proliowych aminopeptydaz dipeptylowych (post-proliowe dipeptyllopeptydazy) i do klanu SC (zawiera endopeptydazy i egzopeptydazy). Do podrodziny S9B oprócz FAP/seprazy należą także inne białka enzymatyczne: dipeptyllopeptydaza IV (DPPIV), dipeptyllopeptydaza 8 (DPP8) i dipeptyllopeptydaza 9 (DPP9) oraz dwa białka nie-enzymatyczne DPL1 i DPL2 (ang. *dipeptidyl peptidase-like*) [11, 34].

GEN BIAŁKA AKTYWUJĄCEGO FIBROBLASTY I JEGO WARIANTY SPLICINGOWE

Ludzkie FAP α kodowane jest przez gen liczący 79846 pz (par zasad) (GeneBank NG_027991), który znajduje się na chromosomie 2 (2q23) i liczy 26 eksonów, zaś mRNA FAP α liczy 2788 pz, a sekwencja kodująca – 2283 pz (GeneBank NM_004460).

Gen kodujący FAP α zidentyfikowano u kilku gatunków zwierząt i u ludzi. Mysi homolog genu FAP α liczy około 60 kpz i podobnie jak gen ludzki, zawiera 26 eksonów. Organizacja mysiego genu FAP α jest podobna do ludzkiej [58].

Badania na modelach mysich wykazały istnienie w tkankach 3 odmiennych izoform FAP α będących wynikiem alternatywnego składania pierwotnych transkryptów mRNA (pre-mRNA) [60].

Wykazano także istnienie wariantu splicingowego w ludzkiej linii komórkowej czerniaka amelanotycznego (linia komórkowa LOX). Wariant ten koduje 239 aminokwasowy polipeptyd o masie cząsteczkowej 27 kDa (sepraza-s), ściśle zachodzący na C-końcowy katalityczny region seprazy typu dzikiego, wykazujący wysoki stopień homologii u różnych gatunków [33].

STRUKTURA BIAŁKA

Aktywne ludzkie FAP α jest białkiem liczącym 760 aminokwasów (GeneBank NP_004451) o masie cząsteczkowej 170 kDa. Jest homodimerem dwóch podjednostek N-glikozylowanych, każda o masie cząsteczkowej 97 kDa. Monomer FAP α ma 5 potencjalnych miejsc N-glikozylacji, 13 reszt cysteinowych, 3 domeny, które odpowiadają wysoce konserwatywnym domenom proteaz serynowych: segment sygnałowy liczący około 20 aminokwasów, międzybłonowy segment hydrofobowy i krótką N-końcową domenę cytoplazmatyczną liczącą około 6 aminokwasów [3]. W badaniu struktury krystalicznej wykazano pięć potencjalnych miejsc glikozylacji na reszcie asparaginy, tj. 49, 92, 227, 314 i 679 [3].

FAP α należy do typu II białek transbłonowych, zakotwiczonych w błonie komórkowej przez nieodciętą sekwencję sygnałową liczącą około 20 aminokwasów.

Najnowsze badania wskazują jednakże na obecność FAP α również w surowicy [18], jako rozpuszczalnej formy enzymu tnącego antyplazminę APCE (ang. *antiplasmin cleaving enzyme*) [46].

W formie FAP α zakotwiczonej w błonie komórkowej, większa część białka wraz z domeną katalityczną, jest eksponowana na środowisko pozakomórkowe. Domena katalityczna zawiera katalityczną serynę (S624), oflankowaną przez reszty glicyny w klasycznej sekwencji GWSYG. Seryna ta w połączeniu z asparaginą (D702) i histydyną (H734) tworzy katalityczną triadę. Ułożenie takie jest charakterystyczne dla oligopeptydaz proлилowych, a jego strukturalna organizacja podobna jest do organizacji DPPIV.

Każda podjednostka tworząca dimer FAP α zakotwiczony w błonie komórkowej zawiera dwie topologicznie odległe domeny: domenę β -śmigła (ang. *β -propeller*) utworzoną przez aminokwasy 54-492 i domenę α/β hydrolazy utworzoną przez aminokwasy 27-53 i 493-760. Domena β -śmigła jest odpowiedzialna za regulację proteolizy. Domenę β -śmigła tworzy osiem łopatek, a każda z łopatek śmigła mieści w sobie trzy lub cztery antyrównoległe skręty struktury β -harmonijki. Oscylujące łopatki śmigła działają jak wrota filtrujące podczas katalizy, pozwalając na połączenie się z miejscem aktywnym peptydom o małej masie cząsteczkowej, eliminując równocześnie białka o dużej masie cząsteczkowej i uniemożliwiając przypadkową proteolizę [27].

Katalityczna triada (S624, D702, H734) jest zlokalizowana na złączu domen: β -śmigła i α/β hydrolazy. Układ katalityczny triady w porządku nukleofilowo-kwaso-zasadowym jest charakterystycznym dla domeny α/β -hydrolazy [63].

Miejsce aktywne jest dostępne na dwa sposoby. Pierwszym sposobem jest dostępność przez środkowy otwór uformowany przez osiem łopatek struktury β -śmigła, drugim jest utworzenie wgłębienia pomiędzy domenami β -śmigła i hydrolazy.

DPPIV wykazuje podobieństwo struktury do FAP α . W strukturze DPPIV N-terminalny region hydrofobowy stanowi nieodcinany peptyd sygnałowy funkcjonujący także jako domena umożliwiająca zakotwiczenie w błonie komórkowej. W FAP α N-terminalna domena (aminokwasy 106-473) prawdopodobnie pełni podobne funkcje jak peptyd sygnałowy w DPPIV [61].

Ponadto, konsensusowa sekwencja GX SXG, zawierająca katalityczną resztę serynową (S624), kodowana jest przez dwa eksony, fragment Gly-Trp zlokalizowany jest na końcu eksonu 21, a Ser-Tyr-Gly na początku eksonu 22. Rozmieszczenie to odróżnia FAP α od typowych proteaz serynowych, w których konsensusowa sekwencja zawierająca katalityczną serynę kodowana jest przez jeden ekson [60].

Wysoko konserwatywna reszta aminokwasowa ASP599 w DPPIV warunkuje prawidłową obróbkę potranslacyjną DPPIV, umożliwiając prawidłowe fałdowanie, dimeryzację i transport białka. Mutacje tego aminokwasu mogą przyczyniać się do znacznego spadku ekspresji tego białka na powierzchni komórek. FAP α również posiada konserwatywną resztę asparaginy (ASP 599), pełniącą ważną rolę w obróbce potranslacyjnej tego enzymu [61].

RODZINA OLIGOPEPTYDAZ PROLILOWYCH

Rodzina oligopeptydaz proliłowych POP (EC 3.4.21.26) (ang. *prolyl oligopeptidase*) jest grupą aminopeptydaz i endopeptydaz zdolnych do hydrolizy wiązań post-proliłowych, w skład której wchodzi także rodzina genów DPPIV. Rodzina DPPIV obejmuje cztery geny kodujące białka enzymatyczne: białko aktywujące fibroblasty α (FAP α), najlepiej poznaną dipeptylopeptydazę IV (DPPIV), dipeptylopeptydazę 8, dipeptylopeptydazę 9 oraz dwie glikoproteiny nie posiadające aktywności peptydazy DPL1 i DPL2.

DPPIV (CD26) (EC3.4.14.5) nazywana jest także białkiem wiążącym deaminazę adenozyiny (ang. *ADA-binding protein*) jest N-końcową egzo-peptydazą, tnącą dipeptydy zawierające prolinę (X-Pro) lub alaninę (X-Ala) [34].

FAP α jest białkiem enzymatycznym (EC 3.4.21.B28) należącym do integralnych błonowych peptydaz serynowych (SIMP), wykazującym aktywność post-proliłowej peptydazy dipeptylowej i żelatynazy (aktywność żelatynolityczną). FAP α jest jedną z nielicznych peptydaz, które są zdolne do hydrolizy wiązań peptydowych utworzonych przez prolinę [27, 70, 28].

Porównanie struktury miejsc aktywnych FAP α i DPPIV wykazało podobieństwa S2-S2' specyficznych kieszeni (ang. *pockets*). Miejsce S1' w cząsteczce FAP α jest płaskie i może wiązać większość aminokwasów. Kieszeń w miejscu aktywnym S2' posiada Trp623 i Tyr745, które uczestniczą w oddziaływaniach z dużymi bocznymi łańcuchami alifatycznymi cząsteczek. Specyficzna kieszeń S1' w FAP α ma charakter hydrofobowy i zawiera sekwencję specyficznych reszt aminokwasowych: Tyr625, Val650, Trp653, Tyr656, Tyr660 i Val705, co umożliwia optymalne przystosowanie reszt proliłowych. Duże cząsteczki hydrofobowe i aminokwasy aromatyczne mogą być modelowane przez kieszeń S2' zawierającą specyficzne reszty aminokwasowe: Arg123, Phe350, Phe351, Tyr541, Pro544, Tyr625 i Tyr660 [3].

N-końcowy fragment peptydów, stanowiących potencjalne substraty FAP α , jest rozpoznawany przez dwie reszty glutaminowe (motyw Glu). Porównanie struktury krystalicznej FAP α i DPPIV wykazało znaczące różnice aminokwasów zlokalizowanych w sąsiedztwie motywu glutaminowego FAP α i DPPIV (Glu203-Glu204 w FAP α , Glu 205-Glu206 w DPPIV) położonego w miejscu aktywnym enzymów. Znaczenie motywu glutaminowego w reakcjach katalitycznych z udziałem DPPIV zostało potwierdzone przez badania mutagenyzy jednego nukleotydu (ang. *single-point mutations*), likwidujące aktywność DPPIV, jako aminopeptydazy [1].

Szczegółowe porównanie FAP α i DPPIV wykazało także obecność reszty alaminowej w pozycji 657 (Ala657) w FAP α , zamiast reszty asparaginianowej w pozycji 663 (Asp663) obecnej w DPPIV, co znacząco redukuje charakter kwasowy kieszeni i może wyjaśniać mniejsze powinowactwo FAP α do reszt N-końcowych peptydów [3].

WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE FAP α

Większa część formy błonowej FAP α , wraz z domeną katalityczną, jest ekspozowana na środowisko pozakomórkowe. W skład domeny katalitycznej FAP α wchodzi katalityczna seryna (Ser624) oflankowana glicynami w klasycznej sekwencji dla miejsca aktywnego seryny (GX SXG). Ten konserwatywny motyw charakterystyczny dla proteaz serynowych występuje w sekwencji GWSYG. Katalityczna seryna w połączeniu z Asp702 i His734 tworzy katalityczną triadę. Orientacja reszt aminokwasowych jest podobna do orientacji reszt aminokwasowych rodziny oligopeptydaz proliłowych, a organizacja strukturalna podobna do DPPIV (domena transbłonna, domena DPPIV, domena peptydaz S9). FAP α zostało sklasyfikowane jako nieklasyczna proteaza serynowa [61].

Substytucja którejkolwiek z dwóch reszty glicyny w DPPIV skutkuje zatrzymaniem nowosyntezowanego enzymu w retikulum endoplazmatycznym i szybką jego degradacją. Sugeruje to, iż obie reszty glicynowe są niezbędne do prawidłowej obróbki potranslacyjnej (fałdowania) enzymu i transportu na błonę komórkową. Histydyna działa jako ogólny kwasowo-zasadowy katalizator aktywujący grupy nukleofilowe, grupa hydroksylowa seryny działa jako nukleofil podczas ataku na wiązania peptydowe, natomiast kwas asparaginowy stabilizuje naładowane czwartorzędowe intermedanty formowane podczas reakcji [61].

SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA FAP α

Większość peptydaz nie jest zdolna do hydrolizy wiązań peptydowych utworzonych przez prolinę ze względu na specyficzną strukturę tego aminokwasu i ograniczeń, jakie wywiera na strukturę peptydu. FAP α jest jedną z nielicznych peptydaz, które są zdolne do hydrolizy wiązań peptydowych proliny [28].

FAP α wykazuje dwa rodzaje aktywności proteolitycznej. Pierwsza to aktywność żelatynazy [5, 55, 67], a druga aktywność N-końcowej post-proliłowej aminopeptydazy [16]. Zarówno aktywność żelatnazy, jak i dipeptylopeptydazy wykazywanej przez FAP α uwarunkowana jest obecnością aktywnej katalitycznej reszty serynowej 624.

Badania specyficzności substratowej z zastosowaniem zymografii wykazały, iż FAP α degradowe żelatynę czyli termicznie zdenaturowny kolagen typu I i IV. Nie wykazuje natomiast zdolności do degradacji lamininy, fibronektyny, fibryny i kazeiny. Aktywność żelatynolityczna odróżnia FAP α od DPPIV, która nie posiada aktywności żelatynazy. Wykazano, że FAP α w synchronizacji z innymi proteinazami bierze udział w degradacji częściowo zdegradowanego lub zdenaturowanego kolagenu typu I i III i innych składowych macierzy pozakomórkowej, a produkty powstające w procesie ich degradacji mogą regulować wzrost komórek nowotworowych i ich ruchliwość [17].

BIOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI FAP α

Potranslacyjną modyfikacją FAP α jest N-glikozylacja, zatem możliwe jest blokowanie regionu N-końcowego [67].

Badania struktury krystalicznej FAP α wykazały, iż występuje pięć potencjalnych miejsc glikozylacji na resztach asparaginy: 49, 92, 227, 314 i 679. Cztery występują w regionie domeny β -śmigła, a jedno miejsce glikozylacji w domenie wykazującej aktywność hydrolazy [3]. Glikozylowana forma FAP α wykazuje zarówno aktywność post-prolilowej peptydazy dipeptylowej, jak i aktywność żelatynazy, podczas gdy forma nieglikozylowana nie posiada żadnej aktywności [74].

UDZIAŁ FAP α W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH I PATOLOGICZNYCH

Funkcja FAP α nie jest jeszcze w pełni poznana. Fizjologicznie przejściowa ekspresja FAP α występuje w prawidłowych płodowych tkankach mezenchymatycznych oraz podczas procesów gojenia tkanek. Prawidłowe komórki tkanek dorosłych osobników nie wykazują ekspresji FAP α [61].

Wstępne badania sugerowały, iż FAP α jest powierzchniowym markerem proliferacji komórek mezenchymalnych, którego ekspresja może być indukowana czynnikami wzrostu lub w toku kancerogenezy.

FAP α , jako indukowany antygen powierzchniowy może ulegać ekspresji w aktywowanych komórkach zrębu otaczającego komórki nowotworowe raków nabłonkowych i niektórych mięsaków, działając zarówno jako promotor, jak i supresor nowotworzenia. FAP α spełnia funkcje biologiczne w sposób zależny od warunków, przez połączenie aktywności proteazy i zdolności tworzenia kompleksów z innymi cząsteczkami na powierzchni komórek. Czynnikiem decydującym o jego aktywności mogą być cząsteczki sygnalizacyjne, mające wpływ na interakcję FAP α z komórkami [61].

Ekspresja FAP α charakteryzuje reaktywne fibroblasty zrębu. Fibroblasty są najliczniejszym typem komórek tkanki łącznej, biorącym udział w formowaniu jej architektury, poprzez syntezę i wydzielanie składowych ECM. Jak już wcześniej wspomniano, aktywacja fibroblastów i transformacja w miofibroblasty charakteryzuje zarówno proces gojenia, jak i włóknienie tkanek i narządów. Miofibroblasty posiadają włókna stresowe, *de novo* syntezowaną α -SMA oraz wariant splicingowy fibronektyny (ED-A) i formują połączenia komunikacyjne (ang. *gap junction*) między sobą [77].

Podczas prawidłowego procesu gojenia, miofibroblasty podlegają szczególnemu typowi programowanej śmierci komórek, nazywanej *nemosis* i są usuwane z remodelowanej ziarniny [20, 68].

CAFs podobnie jak miofibroblasty wykazują ekspresję α -SMA oraz wariantu splicingowego fibronektyny (ED-A), jednakże różnią się zasadniczo od miofibroblastów czasem trwania i nieodwracalnością aktywacji. CAFs, nie podlegają także programowanej śmierci [23, 44, 66].

Markerami aktywowanych fibroblastów, oprócz α -SMA i FAP α są także PDGF i specyficzne białko fibroblastów FSP α (ang. *fibroblast-specific protein*) [44, 53].

Poza fibroblastami, fenotypu miofibroblastów nabywają także komórki gwiaździste wątroby HSCs (ang. *hepatic stellate cells*). HSCs są głównym źródłem zarówno enzymów proteolitycznych, jak i ich inhibitorów, odgrywających kluczową rolę w procesie remodelowania macierzy pozakomórkowej wątroby [4]. Podobnie jak w przypadku fibroblastów, HSCs wykazują nadekspresję FAP α w fazie przebudowy macierzy pozakomórkowej mięszu wątroby podczas postępu marskości wątroby [47]. Ponadto ekspresję FAP α wykazano także w mięszu wątroby w przewlekłym zapaleniu wątroby wywołanym wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), korelującą ze stopniem włóknienia w przebiegu przewlekłego WZW typu C [48].

Indukcja ekspresji FAP α podczas przebudowy macierzy pozakomórkowej wydaje się mieć kluczowe znaczenie nie tylko u ludzi. Nadekspresję homologu tego białka wykazano podczas hormonalnie wywołanej resorpcji ogona u *Xenopus laevis* [12] oraz podczas rozwoju zarodka myszy. Nie wykazano jednak wad rozwojowych u myszy z niedoborem tego białka, pomimo jego zwiększonej aktywności w prawidłowo przebudowywanych tkankach w toku embriogenezy [59].

Badania immunohistochemiczne wykazały także indukowaną ekspresję FAP α u pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc. Ekspresja FAP α ograniczona była do fibroblastów w obrębie obszarów uszkodzonych tkanek [2].

FAP α ulega indukowanej ekspresji na błonach chondrocytów podczas resorpcji tkanki chrzęstnej oraz podczas choroby zwyrodnieniowej stawów [54]. W badaniu na mysim modelu potwierdzono 7-krotny wzrost ekspresji FAP α podczas procesu zapalnego charakterystycznego dla choroby zwyrodnieniowej stawów w porównaniu do ekspresji FAP α w tkankach prawidłowych niezapalnych [41].

Rola CAFs w transformacji i progresji nowotworów jest wieloaspektowa. Podobnie jak komórki układu immunologicznego, które początkowo hamują transformację nowotworową, tak i CAFs hamują wczesne stadia progresji nowotworów, głównie przez formowanie połączeń komunikacyjnych pomiędzy aktywowanymi fibroblastami [39, 51].

Czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe aktywują CAFs, które mogą promować zarówno wzrost, jak i progresję nowotworu. Wzajemna komunikacja pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami zrębu może przebiegać dwoma różnymi szlakami. W szlaku zwanym „eferentnym” komórki nowotworowe zapoczątkowują (niejako włączają) reaktywną odpowiedź zrębu, natomiast w szlaku „aferentnym” zmodyfikowane przez otaczające środowisko, komórki zrębu stymulują odpowiedź komórek nowotworowych [65].

FAP α może mieć kluczowe znaczenie w procesach zachodzących w mikrośrodku nowotworu, gdzie dzięki swej aktywności enzymatycznej nie tylko promuje wzrost guza, ale także odgrywa ważną rolę w nabywaniu fenotypu migracyjnego.

go przez komórki nowotworowe, promując tym samym przerzuty do innych tkanek czy narządów [29, 31]. Nadekspresja FAP α w pobliżu komórek śródbłonna i w bezpośrednim otoczeniu proliferujących komórek nowotworowych wskazuje na istotne znaczenie tego białka w patogenezie nowotworów.

Nabywanie fenotypu inwazyjnego przez komórki nowotworowe jest złożonym procesem, w którego przebiegu istotne są wzajemne oddziaływania zarówno pomiędzy komórkami prawidłowymi, jak i nowotworowymi, jak również pomiędzy komórkami i otaczającym je mikrośrodowiskiem [61].

UDZIAŁ KOMPLEKSÓW FAP α Z INNYMI CZĄSTECZKAMI W INWAZJI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

FAP α związane jest z integryną $\alpha 3 \beta 1$, MMP-2, MT-MMP-1, DPPIV i uPA przez lokalizację na inwadopodiach ludzkich komórek nowotworowych i może wchodzić w interakcje z tymi cząsteczkami i ich receptorami [6, 14, 15, 22, 30, 32].

Heteromeryczny kompleks enzymatyczny FAP α i DPPIV wykazuje aktywność zarówno post- prolilopeptydazy jak i żelatynazy, co zapewnia skuteczność degradacji kolagenu, a w związku z tym może efektywnie promować migrację komórek. Pomimo podobieństwa obu enzymów, różnią się one dystrybucją i ekspresją w tkankach [32].

Wykazano, iż FAP α może także tworzyć kompleks z receptorem aktywatora plazminogenu typu urokinazowego uPAR (ang. *urokinase plasminogen activator receptor*) zlokalizowanego na inwadopodiach komórek nowotworowych [6], blokując wiązanie aktywatora plazminogenu typu urokinazy uPA (ang. *urokinase type plasminogen activator*), wchodzącego w skład proteaz serynowych i wykazującego zdolność degradacji składników ECM, takich jak: kolagen typu IV, laminina i fibronektyna. Inhibicja aktywności uPA przez blokowanie wiązania uPA z uPAR może ograniczać tworzenie przerzutów [42]. W tym przypadku FAP α wykazuje właściwości supresora transformacji nowotworowej. Jednakże powstanie kompleksów błonowych FAP α – uPAR jest skomplikowane i zależy zarówno od cytoszkieletu, jak i integryn, zwłaszcza integryny $\beta 1$ [6].

Badania immunohistochemiczne wykazały ekspresję FAP α zarówno w pierwotnym, jak i przerzutowym raku jelita grubego, piersi, jajnika, pęcherza moczowego i płuc [29].

W badaniach immunohistochemicznych wykazano również ekspresję FAP α w raku szyjki macicy zarówno w postaciach mikroinwazyjnych, jak i inwazyjnych. Wykazano ponadto korelację między aktywnością żelatynolityczną FAP α a stopniem złośliwości raka. Zróżnicowanie ekspresji FAP α w zależności od inwazyjności nowotworów, może sugerować, iż FAP α może być potencjalnym wczesnym markerem progresji nowotworów [43].

W gruczolowym typie raka jelita grubego ekspresja FAP α w zrębie istotnie koreluje z przerzutami tego nowotworu do wątroby i węzłów chłonnych. Natomiast w rozproszonym typie raka nie wykazano korelacji między ekspresją tego białka a przerzutami do węzłów. W badaniach immunohistochemicznych wykazano również różnice w ekspresji FAP α w raku żołądka i w raku jelita grubego pod względem głębokości naciekania nowotworu na otaczające tkanki [62].

Nowe strategie terapeutyczne chorób fibroproliferacyjnych (włóknienia) oraz chorób nowotworowych obejmują próby hamowania syntezy i aktywacji MMPs, m.in. poprzez zastosowanie różnych związków. Związkami takimi są: antybiotyki (pochodne tetracyklin i antybiotyków antracyklinowych), związki karboksyalkilowe, hydroksamatowe (batimastat, marimastat), tiole i fosfonamidy. Jednakże MMPs są enzymami zaangażowanymi nie tylko w procesy patologiczne, przede wszystkim są niezbędne dla prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych w organizmie.

Funkcja białka FAP α nie jest jeszcze w pełni poznana, jednakże istnieją dowody na jego udział w gojeniu tkanek i transformacji nowotworowej. Nie wykazano ekspresji FAP α w prawidłowych tkankach dorosłych osobników. Zatem FAP α może okazać się idealnym celem terapeutycznym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABBOTT CA, MCCAUGHAN GW, GORRELL MD. Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted [beta] propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Lett* 1999; **458**: 278–284.
- [2] ACHARYA PS, ZUKAS A, CHANDAN V, KATZENSTEIN AL, PURE E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling. *Hum Pathol* 2006; **37**(3): 352–360.
- [3] AERTGEERTS K, LEVIN I, SHI L, SNELL GP, JENNINGS A, PRASAD GS, ZHANG Y, KRAUS ML, SALAKIAN S, SRIDHAR V, WIJNANDS R, TENNANT MG. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J Biol Chem* 2005; **280**: 19441–19444.
- [4] ALCOLADO R, ARTHUR MJ, IREDALE JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond.)* 1997; **92**: 103–112.
- [5] AOYAMA A, CHEN WT. A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8296–8300.
- [6] ARTYM VV, KINDZELSKII AL, CHEN WT, PETTY HR. Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 1593–1601.
- [7] BAUM CL, ARPEY CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; **31**(6):674–686.
- [8] BHOWMICK NA, NEILSON EG, MOSES HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004; **432**: 332–337.
- [9] BIENIASZ M, BARTKOWIAK J, SZEMRAJ J. Ekspresja genów kodujących białka morfogenetyczne kości, metaloproteinazy i inhibitory metaloproteinaz w nowotworach płuc i ich znaczenie rokownicze. *Post Biochem* 2008; **54**(1): 82–90.
- [10] BISSELL MJ, RADISKY D. Putting tumours in context. *Nat Rev* 2001; **1**(1): 46–54.
- [11] BJELKE JR, CHRISTENSEN J, NIELSEN PF, BRANNER S, KANSTRUP AB, WAGTMANN N, RA-SMUSSEN HB. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* 2006 **396**: 391.
- [12] BROWN DD, WANG Z, FURLOW JD, KANAMORIA, SCHWARTZMAN RA, REMO BF, PINDER A. The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 1924–1929.

- [13] CARANTINO I, FLORESCU IP, CARANTINO A. Overview about the keloid scars and the elaboration of a non-invasive, unconventional treatment. *J Med Life* 2010; **3**(2): 122–127.
- [14] CHEN WT. DPPIV and seprase in cancer invasion and angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2003; **524**: 197–203.
- [15] CHEN WT, KELLY T. Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev* 2003; **22**: 259–269.
- [16] CHENG JD, VALIANOU M, CANUTESCU AA, JAFFE EK, LEE HO, WANG H, LAI JH, BACHOVCHIN WW, WEINER LM. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 351–360.
- [17] CHRISTIANSEN VJ, JACKSON KW, LEE KN, MCKEE PA. Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. *Arch Biochem Biophys* 2007; **457**: 177–186.
- [18] COLLINS PJ, MCMAHON G, O'BRIEN P, O'CONNOR B. Purification, identification and characterisation of seprase from bovine serum. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2320–2333.
- [19] CZARKOWSKA-PĄCZEK B, PRZYBYLSKI J. Mechanizmy gojenia uszkodzonych tkanek. *Przegl Lek* 2004; **61**(1): 3–42.
- [20] DESMOULIERE A, REDARD M, DARBY I, AND GABBIANI G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; **146** (1): 56–66.
- [21] DIEGELMANN RF, EVANS MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* **9**, 2004; 283–289.
- [22] DIENUS K, BAYAT A, GILMORE BF, SEIFERT O. Increased expression of fibroblast activation protein-alpha in keloid fibroblasts: implications for development of a novel treatment option. *Arch Dermatol Res* 2010; **302**(10): 725–731.
- [23] DVORAK HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; **315** (26): 1650–1659.
- [24] DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK B, WASZCZYKOWSKA E, ŻEBROWSKA A. Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry. *Alergia Astma Immunologia* 2004; **9** (2): 71–79.
- [25] FERREIRA LM, GRAGNANIA, FURTADO F, HOCHMAN B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc* 2009; **81**(3): 623–629.
- [26] FRANCO OE, SHAW AK, STRAND DW, HAYWARD SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**(1): 33–39.
- [27] FULOP V, BOCSKEI Z, POLGAR L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta propeller domain regulates proteolysis. *Cell* 1998; **94**: 161–170.
- [28] GARCIA-HORSMAN JA, MANNISTO PT, VENALAINEN JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007; **41**: 1–24.
- [29] GARIN-CHESA P, OLD LJ, RETTIG WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87**: 7235–7239.
- [30] GHERSI G, DONG H, GOLDSTEIN LA, YEH Y, HAKKINEN L, LARJAVA HS, CHEN WT. Seprase-dPPIV association and prolyl peptidase and gelatinase activities of the protease complex. *Adv Exp Med Biol* 2003; **524**: 87–94.
- [31] GHERSI G, DONG H, GOLDSTEIN LA, YEH Y, HAKKINEN L, LARJAVA HS, CHEN WT. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem* 2002; **277**: 29231–29241.
- [32] GHERSI G, ZHAO Q, SALAMONE M, YEH Y, ZUCKER S, CHEN WT. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res* 2006; **66**: 4652–4661.
- [33] GOLDSTEIN LA, CHEN WT. Identification of an alternatively spliced seprase mRNA that encodes a novel intracellular isoform. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2554–2559.
- [34] GORRELL MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci* 2005; **108**: 277–292.
- [35] GRZYBOWSKI J. Biologia rany oparzeniowej. Bielsko-Biała: Ośrodek Wydawniczy „Augustana”, 2001.
- [36] HAVIV I, POLYAK K, QIU W, HU M, CAMPBELL I. Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle* 2009 Feb 15; **8**(4): 589–595.
- [37] HAYAKAWA T, YAMASHITA K, OHUCHI E, SHINAGAWA A. Cell-growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP- 2). *J Cell Sci* 1994; **107**: 2373–2379.
- [38] HINZ B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; **127**(3): 526–537.
- [39] HINZ B, PHAN SH, THANNICKAL VJ, GALLI A, BOCHATON-PIALLAT ML, GABBIANI G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007; **170**(6): 1807–1816.
- [40] HRABEC E, NADUK J, STREK M, HRABEC Z. Kolagenazy typu IV (MMP- 2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomorkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory. *Post Biochem* 2007; **53**: 37–45.

- [41] IBRAHIM SM, KOCZAN D, THIESEN HJ. Gene-expression profile of collagen-induced arthritis, *J Autoimmun* 2002; **18**: 159–167.
- [42] IWASA S, OKADA K, CHEN WT, JIN X, YAMANE T, OOI A, MITSUMATA M. Increased expression of seprase, a membrane-type serine protease, is associated with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Lett* 2005; **227**(2): 229–236.
- [43] JIN X, IWASA S, OKADA K, MITSUMATA M, OOI A. Expression patterns of seprase, a membrane serine protease, in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasm. *Anticancer Res* 2003; **23**: 3195–3198.
- [44] KALLURI R, ZEISBERG M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**(5): 392–401.
- [45] KUCHARZEWSKI M. Metaloproteinazy macierzy a zylne owrzodzenie podudzi. *Przegl Fleb* 2005; **13** (6): 269–274.
- [46] LEE KN, JACKSON KW, CHRISTIANSEN VJ, LEE CS, CHUN JG, MCKEE PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 2006; **107**: 1397–1404.
- [47] LEVY MT, MCCAUGHAN GW, ABBOTT CA, PARK JE, CUNNINGHAMAM, MULLER E, RETTIG WJ, GORRELL MD. Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* 1999; **29**: 1768–1778.
- [48] LEVY MT, MCCAUGHAN GW, MARINOS G, GORRELL MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002; **22**: 93–101.
- [49] LIPKA D, BORATYŃSKI J. Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; **62**: 328–336.
- [50] MASKOS K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 2005; **87**: 249–263.
- [51] McANULTY RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**(4): 666–671.
- [52] MENDONÇA RJ, COUTINHO-NETTO J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol* 2009; **84**(3): 257–262.
- [53] MICKE P, OSTMAN A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; **45** Suppl 2: S163–S175.
- [54] MILNER JM, KEVORKIAN L, YOUNG DA, JONES D, WAIT R, DONELL ST, BARKSBY E, PATTERSON AM, MIDDLETON J, CRAVATT BF, CLARK IM, ROWAN AD, CAWSTON TE. Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; **8**: 23.
- [55] MONSKY WL, LIN CY, AOYAMA A, KELLY T, AKIYAMA SK, MUELLER SC, CHEN WT. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1994; **54**: 5702–5710.
- [56] MUELLER SC, GHERSI G, AKIYAMA SK, SANG QX, HOWARD L, PINEIRO-SANCHEZ M, NAKAHARA H, YEH Y, CHEN WT. A novel protease docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem* 1999; **274**: 24947–24952.
- [57] NADUK-KIK J, HRABEC E. Udział metaloproteinaz macierzy w patogenezie cukrzycy i rozwoju retinopatii cukrzycowej. *Post Hig Med Dośw* 2008; **62**: 442–450.
- [58] NIEDERMEYER J, ENENKEL B, PARK JE, LENTER M, RETTIG WJ, DAMM K, SCHNAPP A. Mouse fibroblast-activation protein—conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur J Biochem* 1998; **254**: 650–654.
- [59] NIEDERMEYER J, GARIN-CHESAP, KRIZ M, HILBERG F, MUELLER E, BAMBERGER U, RETTIG WJ, SCHNAPP A. Expression of the fibroblast activation protein during mouse embryo development. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 445–447.
- [60] NIEDERMEYER J, SCANLAN MJ, GARIN-CHESAP, DAIBER C, FIEBIG HH, OLD LJ, RETTIG WJ, SCHNAPP A. Mouse fibroblast activation protein: molecular cloning, alternative splicing and expression in the reactive stroma of epithelial cancers. *Int J Cancer* 1997; **71**: 383–389.
- [61] O'BRIEN P, O'CONNOR BF. Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1784**(9): 1130–1145.
- [62] OKADA K, CHEN WT, IWASA S, JIN X, YAMANE T, OOI A, MITSUMATA M. Seprase, a membrane-type serine protease, has different expression patterns in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Oncology* 2003; **65**: 363–370.
- [63] OLLIS D, CHEAH E, CYGLER M, DIJKSTRA B, FROLOW F, FRANKEN S, HAREL M, REMINGTON J, SILMAN I, SCHRAG J, SUSSMAN J, VERSCHUEREN K, GOLDMAN A. The alpha/beta hydrolase domain. *Protein Eng* 1992; **5**: 197–211.

- [64] ORIMO A, WEINBERG RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*, 2006; **5**: 1597–1601.
- [65] OSTMAN A, AUGSTEN M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 2009; **19**(1): 67–73.
- [66] PIETRAS K, OSTMAN A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010; **316**(8): 1324–1331.
- [67] PIÑEIRO-SÁNCHEZ ML, GOLDSTEIN LA, DODT J, HOWARD L, YEH Y, TRAN H, ARGRAVES WS, CHEN WT. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J Biol Chem* 1997; **272** (12): 7595–601.
- [68] RASANEN K, VAHERI A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 2010; **316**(17): 2713–2722.
- [69] RETTIG WJ, SU SL, FORTUNATO SR, SCANLAN MJ, RAJ BK, GARIN-CHESAP, HEALEY JH, OLD LJ. Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int J Cancer* 1994; **58**: 385–392.
- [70] ROSENBLUM JS, KOZARICH JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2003; **7**: 496–504.
- [71] SHOJAEI F, ZHONG C, WU X, YU L, FERRARA N. Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth. *Trends Cell Biol*, 2008; **18**: 372–378.
- [72] SINGER AJ, CLARK RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; **341**(10): 738–746.
- [73] SIREK J. Podstawowe zasady gojenia się rany i jej leczenia. *Porad Lek Prakt* 2005; **6**(2): 6–7.
- [74] SUN S, ALBRIGHT CF, FISH BH, GEORGE HJ, SELLING BH, HOLLIS GF, WYNN R. Expression, purification, and kinetic characterization of fulllength human Fibroblast Activation Protein. *Protein Expr. Purif.* 2002; **24**: 274–281.
- [75] SZEWCZYK MT, CWAJDA J, CIERZNIAKOWSKA K, JAWIEŃ A. Wybrane aspekty leczenia ran przewlekłych. *Przew Lek* 2005; **5**: 54–60.
- [76] ŚLIWOWSKA I, KOPCZYŃSKI Z. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi. *Współcz Onkol* 2005; **8**: 327–335.
- [77] TOMASEK JJ, GABBIANI G, HINZ B, CHAPONNIER C, AND BROWN RA. Myofibroblasts and mechano- regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**(5): 349–363.
- [78] VASSILIADIS E, VEIDAL SS, BARASCUK N, MULLICK JB, CLAUSEN RE, LARSEN L, SIMONSEN H, LARSEN DV, BAY-JENSEN AC, SEGOVIA-SILVESTRE T, LEEMING DJ, KARSDAL MA. Measurement of matrix metalloproteinase 9-mediated collagen type III degradation fragment as a marker of skin fibrosis. *BMC Dermatol* 2011; **29**; 11: 6.
- [79] WAWRZYCKA-KAFLIK A, PEŁKA M, BRONIARCZYK-DYŁA G. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowe inhibitory – charakterystyka biochemiczna i znaczenie kliniczne. *Dermatologia Estet* 2007; **9** (4): 209–217.
- [80] WO DE, MAREEL M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003; **200**(4): 429–447.
- [81] WYSOCKI MS, SIEWIERA IP. Ku regeneracji tkanek – biologia bezbliznowego gojenia płodowych ran skóry. *Wiadomości Lekarskie* 2007; **60**: 11–12.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 29.07.2011 r.

Przyjęto: 17.11.2011 r.

Magdalena Jurzak

Zakład Kosmetologii,

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ul. Kasztanowa 3,

41-200 Sosnowiec,

e-mail: magda@sum.edu.pl