

Received: 2015.03.11  
Accepted: 2016.04.01  
Published: 2016.07.07

# Receptory aktywowane przez proteazy – biologia i rola w nowotworach złośliwych

## Protease-activated receptors – biology and role in cancer

Dominika Hempel<sup>1,2</sup>, Ewa Sierko<sup>1,2</sup>, Marek Z. Wojtukiewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

<sup>2</sup> Białostockie Centrum Onkologii

### Streszczenie

Zaburzenia krzepnięcia krwi nie tylko towarzyszą chorobie nowotworowej, ale wpływają również na jej rozwój. Komórki nowotworowe są zdolne do wytwarzania zarówno wielu czynników prozakrzepowych, jak i mechanizmów umożliwiających odbiór sygnalizacji wzbudzonej przez te związki. Jednym z elementów swoistego układu wzajemnych powiązań jaki tworzy nowotwór z układem hemostazy są receptory aktywowane przez proteazy (receptory proteaz; protease-activated receptors, PARs). PARs to sprzężone z białkiem G (G-protein-coupled receptors, GPCRs) śródbłonowe receptory o wyjątkowym – proteolitycznym mechanizmie aktywacji. Receptory proteaz odgrywają ważną rolę w regulacji hemostazy oraz procesów zapalnych. Aktywacja PARs może doprowadzić nie tylko do zaburzeń krzepnięcia krwi, ale także do rozwoju lub progresji choroby nowotworowej. Białkami aktywującymi PARs w komórkach nowotworowych są m.in. trombina, czynnik tkankowy (tissue factor, TF) oraz metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases, MMPs). Znany jest także mechanizm stałej aktywacji tych receptorów w nowotworach złośliwych. W pracy omówiono mechanizmy aktywacji PARs w warunkach fizjologii i patologii, z uwzględnieniem ich roli w nowotworach złośliwych. Ponadto przedyskutowano ewentualne opcje terapeutyczne polegające na wykorzystaniu antagonistów PARs u chorych na nowotwory.

Słowa kluczowe:

Receptory aktywowane przez proteazy (PARs) • nowotwory złośliwe

### Summary

The fact that blood coagulation disorders may accompany malignant disease is well established. However, many studies have shown that components of the haemostatic system may also elicit signaling leading to cancer development and progression. The potential mechanism by which coagulation factors play a role in cancer invasion is not completely understood, but one hypothesis is that protease-activated receptors (PARs) play a prominent role. PARs are transmembrane G-protein-coupled receptors (GPCRs) that are activated by a unique proteolytic mechanism. They have important functions in haemostasis and inflammation but may also be implicated in cancer cell progression. Thrombin, tissue factor (TF) and matrix metalloproteinases (MMPs) are the main activators of these receptors. The mechanism of persistent activation of PARs was also described in cancer cells. Here, we discuss the physiological and pathological role of PARs with a particular focus on PARs' contribution to cancer biology. We also present therapeutic options tailored specifically to inhibition of PAR-induced signalling in cancer patients.

Keywords:

protease-activated receptors (PARs) • malignant tumours

<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1209209">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1209209</a>
<b>Word count:</b>	3591
<b>Tables:</b>	2
<b>Figures:</b>	2
<b>References:</b>	101

**Adres autora:** prof. dr hab. Marek Z. Wojtukiewicz, Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny, Białostockie Centrum Onkologii, ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok; tel./fax (85) 6646734; e-mail [mzwojtukiewicz@gmail.com](mailto:mzwojtukiewicz@gmail.com)

## WSTĘP

Już w XIX w. sygnalizowano istnienie zależności między procesem krzepnięcia krwi a rozwojem nowotworu. Wówczas bowiem zaobserwowano zwiększoną tendencję do występowania zakrzepów u chorych na nowotwory, czego przykładem jest zespół Trousseau – wędrujące zapalenie żył powierzchownych [66]. Prozakrzepowy wpływ nowotworu może wynikać z interakcji komórek guza z elementami morfotycznymi krwi i komórkami śródbłonna naczyń i/lub ze zdolności samych komórek nowotworowych do wytwarzania substancji pobudzających krzepnięcie krwi [82]. Niektórzy badacze porównują chorobę nowotworową do rany, której nie można wygoić, gdzie guz jest obszarem nieustannie aktywowanego procesu krzepnięcia krwi, co sprzyja jego wzrostowi i inwazji [19].

Proteazy o działaniu prozakrzepowym to jedne z wielu czynników regulujących hemostazę. Od lat 60 XX w. znane były działania hormonopodobne tych białek, np. insulinopodobne działanie pepsyny, chymotrypsyny, jak również mitogenne działanie trombiny i trypsyny na poziomie błony komórkowej [14,53]. W latach 90 ub.w. odkryto unikatowy proteolityczny mechanizm oddziaływania trombiny z receptorem błonowym, która niejako „uwalnia” związany z częścią zewnątrzkomórkową receptora ligand (TLTR, tethered ligand trombin receptor) [72]. W tym czasie ukazały się również pierwsze pionierskie doniesienia [78,79,80,84,85,86] dokumentujące istnienie receptora trombiny na powierzchni komórek nowotworowych guzów litych.

Ostatecznie receptory aktywowane przez trombinę nazwano receptorami aktywowanymi przez proteazy (protease-activated receptors, PARs). PARs to receptory śródbłonowe, sprzężone z białkiem G (G-protein-coupled receptors, GPCRs) [15,51]. Jak dotąd zidentyfikowano cztery receptory proteaz: PAR-1, PAR-2, PAR-3 oraz PAR-4 [48]. Aktywacja PARs jest nieodwracalna, dlatego też prawidłowe mechanizmy jej regulacji są ważne dla homeostazy kontrolowanych przez te receptory procesów (m.in. hemostazy, stanu zapalnego czy angiogenezy) [przegląd piśm. 4]. Desensytyzacja receptorów lub ich przemieszczenie w obrębie błony komórkowej (receptor trafficking) to znane mechanizmy regulacji aktywności PARs [4]. Coraz więcej danych wskazuje, iż właśnie nadmierna aktywacja PARs może mieć

znaczenie w pobudzeniu proliferacji komórek nowotworowych, wzroście guza i hamowaniu apoptozy komórek nowotworowych w wyniku zmian w układzie krzepnięcia krwi [4,48]. Białkami aktywującymi PARs w komórkach nowotworowych są m.in. trombina, czynnik tkankowy (tissue factor, TF) oraz metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases, MMPs) – MMP-1, -9, -14 [1,9, 69].

W pracy podjęto próbę przedstawienia mechanizmów prawidłowej, jak i zaburzonej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej wzbudzonej przez PARs oraz wyjaśnienia ich wpływu na rozwój i progresję choroby nowotworowej. Przedstawiono także możliwości blokowania PARs lub czynników aktywujących te receptory u chorych na nowotwory.

## RECEPTORY AKTYWOWANE PRZEZ PROTEAZY

### Budowa i mechanizm aktywacji

Receptory aktywowane przez proteazy (protease-activated receptors, PARs) należą do rodziny śródbłonowych receptorów związanych z białkiem G. Każdy z czterech rodzajów PAR jest kodowany przez oddzielny gen. Pierwszy, zidentyfikowany w 1991 r. receptor proteaz – PAR-1 został odkryty dzięki poszukiwaniom receptora aktywowanego trombiną w płytkach krwi (jego pierwotna nazwa to receptor trombiny) [52]. Kolejne receptory oddziaływające z trombiną – PAR-3 i PAR-4 zostały odkryte w wyniku badań z użyciem swoistych gatunkowo płytek krwi [4,35]. Natomiast receptor PAR-2, w przeciwieństwie do tych receptorów niereagujący z trombiną, lecz z trypsyną, został zidentyfikowany za pomocą screeningu genomu mysiego z użyciem sond homologicznych do przezbłonowych regionów receptora substancji K [46].

Receptory PAR-1, -3 i -4 występują głównie na komórkach naczyń krwionośnych; są przede wszystkim efektorami trombiny w warunkach *in vivo*, lecz mogą być aktywowane także przez inne proteazy [15,48,69]. Ekspresja poszczególnych typów receptorów jest swoista gatunkowo i różna w poszczególnych komórkach, np. PAR-1 i PAR-4 występują w ludzkich płytkach krwi, a PAR-3 i -4 – w mysich. Niedawne badania przeprowadzone na hodowlach mysich wykazały, iż mPAR-3 praw-

dopodobnie nie działa jako samodzielny receptor, lecz bardziej jako kofaktor pozostałych receptorów proteaz lub tworzy z nimi heterodimery, np. z mPAR-4 [35,39,41]. Dane wymagają potwierdzenia u ludzi, u których ten receptor również występuje. Ekspresję PAR-2, którego aktywacja odbywa się w wyniku oddziaływań z trypsynopodobnymi proteazami serynowymi stwierdzono u ludzi na komórkach śródbłonna naczyń oraz jelit i dróg oddechowych. Receptor ten bierze udział w odpowiedzi proliferacyjnej uszkodzonych tkanek [4]. Oprócz proteaz, także białka zsyntetyzowane na podstawie sekwencji aktywującej części zewnątrzkomórkowej PAR mogą być ich agonistami. Są to tzw. PAR-activating peptides, swoiste dla poszczególnych receptorów proteaz. Białka imitujące powstające po proteolizie koniec N (tethered ligand, „związany” ligand) mogą aktywować receptor bez jego wcześniejszej proteolizy, przez przyłączenie się bezpośrednio do znajdującego się wewnątrz receptora miejsca aktywacji [15]. Proteazy aktywujące i inaktywujące poszczególne receptory PAR przedstawia tabela 1.

Każdy z receptorów PAR jest zbudowany z domeny transbłonowej składającej się z siedmiu  $\alpha$ -helis, części cytoplazmatycznej wiążącej białko G oraz N-końcowej sekwencji zewnątrzkomórkowej zawierającej miejsce wiązania swoistej proteazy (ryc. 1) [25,35]. Główne różnice w budowie między poszczególnymi PAR dotyczą przede wszystkim właśnie sekwencji N - końcowej.

Spośród wszystkich receptorów proteaz najlepiej poznano mechanizm aktywacji PAR-1. Głównymi aktywatorami tego białka są: trombina i czynnik krzepnięcia

krwi Xa, proteazy odpowiedzialne za krzepnięcie krwi w razie uszkodzenia naczyń. Swoistość trombiny do PAR-1 jest na tyle duża, iż do wzbudzenia sygnalizacji wewnątrzkomórkowej nie wymaga obecności kofaktorów. Pozostałe proteazy oddziałują z powierzchniowymi cząsteczkami, które ułatwiają ich związanie z PAR-1 i odłączenie fragmentu N-końcowego od jego części zewnątrzkomórkowej (np. śródbłonkowy receptor białka C, endothelial protein C receptor – EPCR jest kofaktorem proteazy APC, activated protein C, aktywne białko C) [29,54].

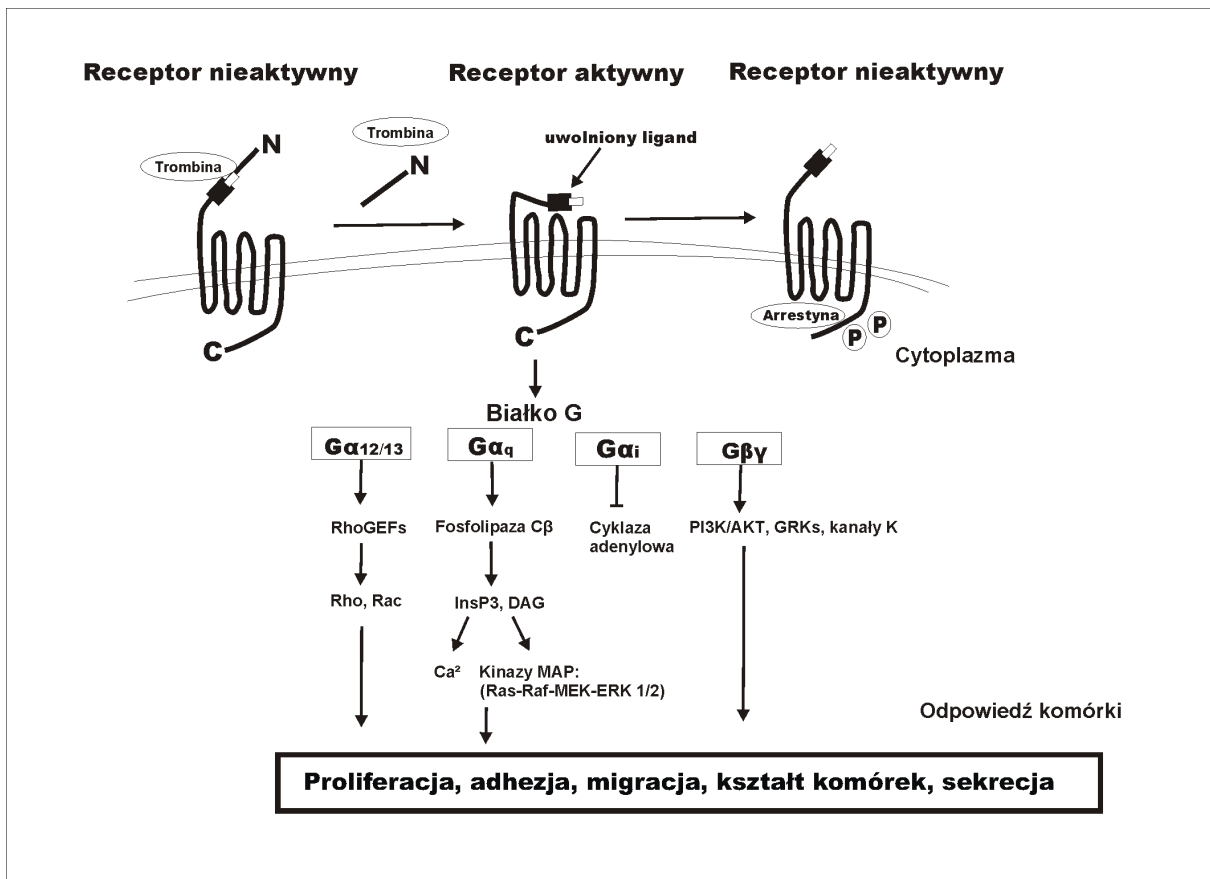
Sekwencja LDPR<sup>41-542</sup> fragmentu N-końcowego PAR-1 jest podstawowa dla prawidłowego związania trombiny z tym receptorem [73]. W wyniku proteolitycznego działania trombiny dochodzi do hydrolizy wiązania peptydowego w miejscu R<sup>41-542</sup> (między resztami argininy i seryny) i odsłonięcia położonego poniżej fragmentu pełniącego funkcję wewnątrzcząsteczkowego liganda aktywującego PAR – jest to tzw. „związany” (tethered) ligand o charakterystycznej dla danego receptora sekwencji (tab. 2).

Wzbudzenie sygnału odbywa się w konserwatywnym regionie pętli 2 za pośrednictwem sekwencji reszt <sup>42</sup>SFLLRN<sup>47</sup> [41]. Reszty hirudynopodobne, obecne w cząsteczce PAR-1 i PAR-3 zwiększają powinowactwo trombiny do tych receptorów, dlatego też mniejsze jej stężenia są potrzebne do ich aktywacji w porównaniu z PAR-4, który nie zawiera takich reszt, stąd jego aktywacja wymaga większych stężeń trombiny [54]. W przypadku oddziaływań trombiny z PAR-4 proteoliza

**Tabela 1.** Proteazy aktywujące i inaktywujące poszczególne receptory proteaz

	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Proteazy aktywujące	Trombina Czynnik Xa APC Granzym A Gingipaina R Trypsyna MMP	Trypsyna Tryptaza Czynnik VIIa Czynnik Xa MT-SP1 Proteinaza-3 Gingipaina R Kalikreina 14	Trombina	Trombina Katepsyna G Trypsyna Gingipaina R Kalikreina 14
Proteazy inaktywujące	Katepsyna G Plazmina Elastaza Proteinaza-3 Trypsyna	Katepsyna G Elastaza	Katepsyna G	
Lokalizacja	Płytki krwi ludzkie Śródbłonek Nabłonek Fibroblasty Miocyty Neurony Astrocyty	Śródbłonek Nabłonek Fibroblasty Miocyty Neurony Astrocyty	Płytki krwi mysie Śródbłonek Miocyty Astrocyty	Płytki krwi ludzkie Śródbłonek Miocyty Astrocyty

PAR – receptory aktywowane przez proteazy (protease-activated receptors); APC – aktywne białko C (activated protein C); MT-SP1 – proteaza serynowa typu błonowego 1 (membrane-type serine protease 1); MMP – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases)



**Ryc. 1.** Mechanizm aktywacji PAR-1 (protease-activated receptor 1, 1 receptor aktywowany proteazą) i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej; G – białko G. Wtórne przekaźniki: kinaza MAP – MAPK (mitogen activated protein kinase), kinaza białkowa aktywowana miogienem; ERK 1/2 – (extracellular signal-regulated kinase-1 i -2); białko RhoGEFs, Rho, Rac; DAG – diacylglicerol; InsP $_3$  – trójfosforan inozytolu; GRKs – (G protein-coupled receptor kinases), kinazy receptora sprzężonego z białkiem G; PI3K – kinaza trójfosforanu inozytolu; P – reszty fosforowe

**Tabela 2.** Sekwencje aminokwasowe „związanych” ligandów poszczególnych PARs

Typ receptora PAR	Sekwencja aminokwasów „związanego” liganda
PAR1	Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn
PAR2	Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val
PAR3	Thr-Phe-Arg-Gly-Ala-Pro
PAR4	Gly-Tyr-Pro-Gly-Gln-Val

Arg – arginina, Asn – asparagina, Gly – glicyna, Gln – glutamina, Leu – leucyna, Phe – fenyloalanina, Ser – seryna

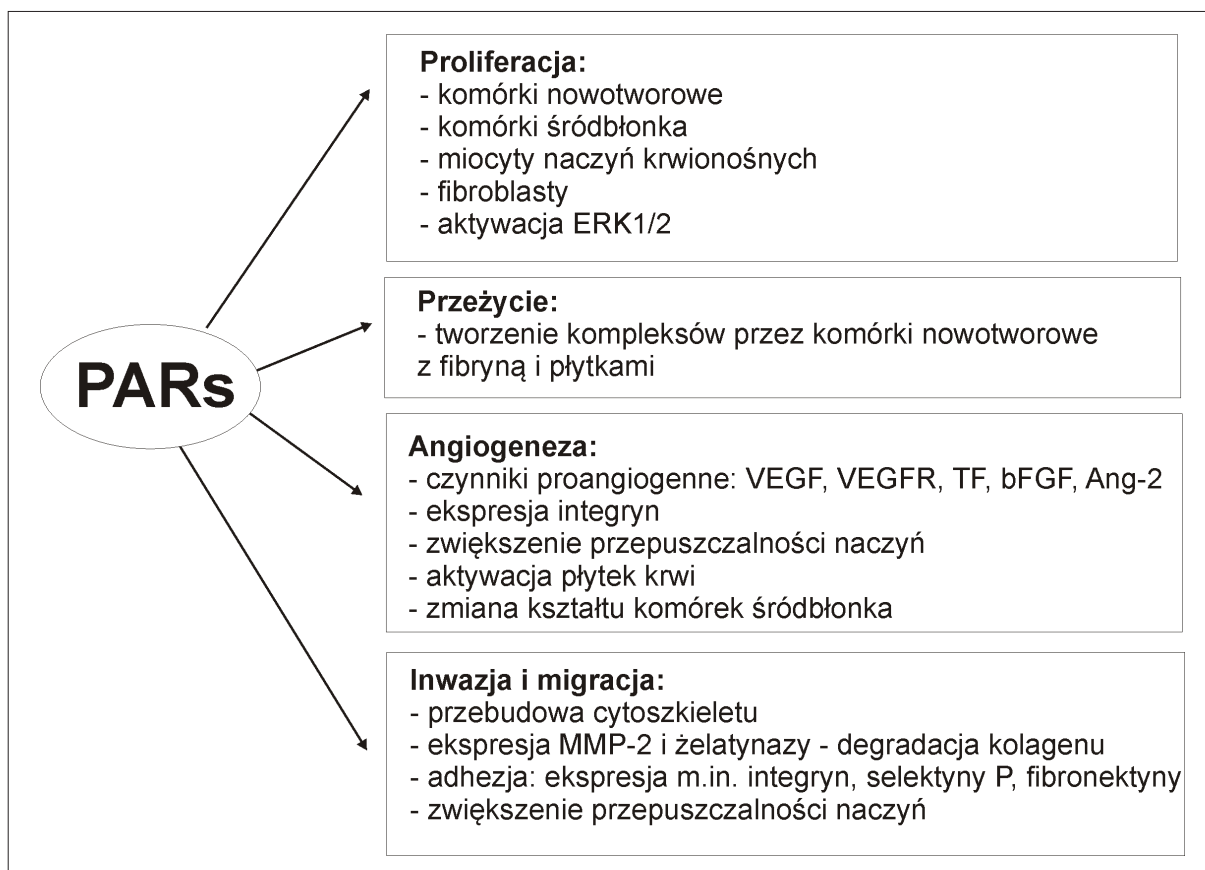
receptora następuje między miejscem R $^{47}$  a G $^{48}$  skutkiem czego jest powstanie odpowiedniego liganda (tab. 2) [48].

Receptor PAR-2 jako jedyny receptor proteazowy jest aktywowany nie przez trombinę, lecz przez trypsynopodobne proteazy serynowe, m.in. trypsynę w stężeniach fizjologicznych czy też czynniki krzepnięcia krwi – VIIa, Xa lub kompleks tych białek z czynnikiem tkankowym – TF-VIIa-Xa [54]. W przypadku PAR-2 hydroliza wiązania peptydowego zewnątrzkomórkowego fragmentu N-końcowego odbywa się w miejscu R $^{34}$ -S $^{35}$  [46].

### Wzbudzenie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

Aktywacja procesów wewnątrzkomórkowych przez PAR odbywa się przede wszystkim w wyniku oddziaływań z białkiem G, lecz także przez przyłączenie białka związanego  $\beta$ -arrestyną.

Po aktywacji receptora dochodzi do zmian konformacyjnych w jego strukturze ułatwiających przyłączenie białka G do domeny wewnątrzkomórkowej PAR i wytworzenie heterotrimerów aktywujących kolejne przekaźniki. PAR-1 łączy się z podtypami białka  $G\alpha$ , ( $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$  oraz  $G\alpha_{12/13}$ ),



**Ryc. 2.** Rola PARs (protease-activated receptors), receptorów aktywowanych przez proteazy w rozwoju i progresji choroby nowotworowej; ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinase-1 i -2; VEGF – vascular endothelial growth factor, czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, VEGFR – receptor dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń; TF – tissue factor, czynnik tkankowy; bFGF – basic fibroblasts growth factor, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; Ang-2 – angiopoetyna 2; MMP-2 – matrix metalloproteinase 2, metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2

co doprowadza do aktywacji kinaz MAP (MAPKs, mitogen activated protein kinases, kinazy białkowe aktywowane mitogenem), wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  oraz zależnej od białka RhoGEF aktywacji przekazników Rho i Rac (ryc. 1) [15,38]. Aktywacja PAR pobudza także kaskady sygnałów zależnych od kinazy białkowej C, kinazy tyrozynowej oraz kinazy PI3 (PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase, kinaza trójfosforanu inozytolu) oraz zahamowania sygnalizacji zależnej od cykazy adenylowej. PAR-4 i PAR-2 również oddziałują z białkiem G, w przeciwieństwie do PAR-3, który się z nim nie łączy [7]. Aktywacja PAR zwiększa transkrypcję genów białek regulujących m.in. proliferację, adhezję, migrację, wzrost i apoptozę komórki (ryc. 1, 2).

### Regulacja aktywności PAR

Aktywacja PAR jest nieodwracalna, dlatego też mechanizmy regulujące wzbudzenie sygnałów przez receptory proteaz muszą być bardzo sprawne. Regulacja aktywności PAR (zarówno w spoczynku, jak i po jego aktywacji) odbywa się przez przemieszczanie go z błony komórkowej do wnętrza komórki [27,59]. W spoczynku stałe - konstytutywne (constitutive) krążenie receptora między błoną komórkową a przedziałem wewnątrzkomórkowym

zapewnia nieustanny dopływ PAR do błony komórkowej. W przypadku PAR-1 wnikanie do przestrzeni wewnątrzkomórkowej w stanie spoczynku jest zależne od jego wcześniejszej ubikwitynacji oraz przyłączenia kompleksu klatryna/AP2 (clathrin adapter protein complex 2) i dynaminy, natomiast nie wymaga związania receptora z arrestyną. Podjednostka  $\mu 2$  AP2 wiąże się z resztą tyrozynową ogona cytoplazmatycznego PAR-1. Skierowanie PAR-1 do lizosomów odbywa się dzięki rozpoznaniu tego receptora przez tzw. białko sortujące SNX1 (sorting nexin-1) [28].

Natomiast aktywny PAR zostaje przemieszczony do wnętrza komórki i rozłożony w lizosomach po wcześniejszym przyłączeniu arrestyny lub niezależnie od związania się z tym białkiem – ale wówczas dochodzi do jego szybkiej degradacji, co uniemożliwia jego powrót do błony komórkowej i ponowną jego aktywację [10,15]. Szybka degradacja PAR odbywa się w wyniku tzw. szybkiej fosforylacji końca C receptora proteaz przez różne kinazy białka G (GPCR kinases - GRKs), w tym GRK3 i GRK5. Dochodzi do odłączenia białek G i przzerwania wzbudzenia sygnałów wewnątrzkomórkowych [51]. Wolniejsza, w porównaniu z innymi receptorami PAR, internalizacja PAR-4 oraz brak jego fosforylacji powodują, iż skutki aktywacji tego



receptora trwają dłużej, np. agregacja płytek krwi zależna od trombiny [59]. Prawdopodobnie fosforylacja odgrywa rolę w dezaktywacji PAR-3. Natomiast regulacja aktywności PAR-2 odbywa się również w wyniku przyłączenia arrestyny oraz internalizacji receptora (rola fosforylacji w tym przypadku jest niejasna). W hamowaniu aktywności PAR-1 i PAR-2 umiejscowionych w fibroblastach dodatkowo jest wymagane przyłączenie dynaminy (GTP-azy). Arrestyna przyczynia się do przedłużonej aktywacji białek ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase-1 i -2) wzbudzonej przez aktywny PAR-2 [17,36].

Opisano również mechanizm regulacji aktywności PAR polegający na proteolitycznym odszczepieniu części receptora poniżej miejsca aktywacji i pozabawieniu go „związanego” liganda [4].

Istnieją dane z badań *in vitro* wskazujące na występowanie w komórkach śródbłonna i fibroblastach efektu zależnego od dawki. Pod wpływem wzrastających stężeń trombiny dochodzi do przemieszczenia się PARs z magazynów wewnątrzkomórkowych na powierzchnię błony komórkowej [15].

#### **ROLA UKŁADU KRZEPNIĘCIA KRWI I PAR W CHOROBIE NOWOTWOROWEJ**

##### **Czynnik tkankowy (TF) a PAR**

Istotną rolę w krzepnięciu krwi po przerwaniu ciągłości naczyń krwionośnych odgrywają zależne od witaminy K osocze czynniki krzepnięcia krwi: VII, X i trombina. Aktywacja czynnika VII następuje po przyłączeniu do czynnika tkankowego, powierzchniowego receptora komórkowego [55].

Czynnik tkankowy, niezbędny do aktywacji czynników krzepnięcia krwi, powodujących powstanie trombiny, jest uważany za najważniejszy prokoagulant komórek nowotworowych. Badania wykazały, iż TF jest obecny na powierzchni komórek nowotworowych różnych nowotworów złośliwych [56,81,83,87]. W warunkach eksperymentalnych i klinicznych komórki nowotworowe charakteryzujące się obecnością TF wykazywały większą zdolność do tworzenia przerzutów odległych w stosunku do komórek nowotworowych niewykazujących ekspresji tego białka. Czynnik tkankowy w kompleksie z czynnikiem VIIa prowadzi do powstania czynnika Xa, odpowiedzialnego za proteolityczną konwersję protrombiny do trombiny, głównego aktywatora PAR-1. Ponadto, kompleks TF/Xa może aktywować PAR-2, podczas gdy czynnik Xa oddziałuje z PAR-1 lub PAR-2. To, iż komórki nowotworowe mogą ektopowo wydzielać czynnik VII wskazuje, iż mają zdolność syntezy prokoagulantów poza wątrobą [31].

##### **Trombina a PAR**

Obecność trombiny wykazano w wielu usuniętych operacyjnie guzach nowotworowych [63,59,83,87,96].

Pierwsze doniesienia o nowej dla trombiny roli w powstawaniu przerzutów nowotworowych pochodzą z początku lat 90 ub.w. [78,79,80,84,85,-86]. Inkubacja trombiny z komórkami rakowymi W256 skutkowała ich kilkakrotnym wzrostem adhezji do śródbłonna aorty szczurów [78,79,80,86,94?]. Inne badania wykazały, iż trombina podawana myszom z wszczepionymi komórkami rakowymi stymuluje wzrost guza nowotworowego i przyspiesza zgon myszy [95], a zastosowanie wysoce selektywnych inhibitorów trombiny może hamować powstawanie przerzutów odległych [20,85,86].

Trombina powoduje przekształcenie fibrynogenu w fibrynę, która może tworzyć podłoże do powstania nowych naczyń krwionośnych oraz kolonii przerzutowych komórek nowotworowych [13,50]. Płytki krwi poddane działaniu trombiny wykazują wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych (glikoproteiny GPIIb/IIIa, czynnika von Willebranda, selektyny P, fibronektyny), umożliwiając komórkom nowotworowym tworzenie kompleksów ze skrzepami fibryny i płytkami krwi w przestrzeniach naczyniowych. Tworzenie tych kompleksów sprzyja przeżyciu komórek nowotworowych i tworzeniu przerzutów odległych [16,42,85,86]. Progresa nowotworu, w tym tworzenie przerzutów, trombina aktywuje również przez bezpośrednie oddziaływanie z PARs obecnymi na komórkach nowotworowych [42,44,85,86]. Ekspresję PAR-1 stwierdzono m.in. w komórkach czerniaka, raka piersi, płuca, przełyku, okrężnicy, żołądka, gruczołu krokowego, trzustki, wątroby, jajnika, trzonu macicy, a także nowotworów okolicy głowy i szyi oraz nowotworów hematologicznych [2,8,32,34,35,37,40,58,70,71,84,101].

W badaniach przeprowadzonych na myszach stwierdzono, iż nadmierna ekspresja PAR-1 w gruczołach piersiowych jest związana z aktywacją białek Wnt i  $\beta$ -kateniny, istotnych w progresji nowotworów złośliwych [10]. Ponadto, aktywacja PAR-1 w guzach łagodnych w modelach mysich powodowała wzrost guza i inwazji [22]. Co ważne, w badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych raka piersi i żołądka stwierdzono zależność między zwiększoną ekspresją PAR-1 w komórkach raka, a jego większą inwazyjnością i zdolnością do tworzenia przerzutów odległych [9,10,22,49,58]. Natomiast zmniejszenie ekspresji PAR-1 obniżało inwazyjność komórek nowotworowych tych raków. Interesujące jest, że stwierdzano ekspresję MMP-1 i PAR-1 w komórkach raka pęcherzyka żółciowego i wątroby u chorych, u których nowotwór naciekał głębiej, był bardziej zaawansowany, częściej występowały przerzuty do węzłów chłonnych oraz rokowanie u nich było gorsze [18,34]. U chorych na raka płuca, żołądka i pęcherzyka żółciowego wykazano, że ekspresja PAR-1 jest niezależnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym przeżyć całkowitych, a u chorych na raka gruczołu krokowego – wznowy miejscowej [11,18].

Obecność PAR-1 stwierdzono także w fibroblastach obecnych w macierzy nowotworów złośliwych, w odróżnieniu od zmian łagodnych, gdzie tej ekspresji nie wyka-

zono [4]. Przewlekła aktywacja PAR-1 w fibroblastach NIH 3T3 przyczynia się do ich transformacji i hiperplazji [38]. W obrębie guzów nowotworowych ekspresję PAR-1 stwierdzano także w komórkach śródbłonna, mięśni gładkich naczyń, tucznych oraz makrofagach [4].

Istnieją doniesienia o roli aktywacji PAR-1 lub PAR-2 przez trombinę w patogenezie ostrego odczynu popromiennego, np. zapalenia śluzówki napromienianego jelita. Wykazano wysoką ekspresję PAR-1 i PAR-2 w komórkach jelita cienkiego szczurów oraz aktywację procesów zapalnych, mitogennych i proliferacyjnych pod wpływem radioterapii w tych komórkach. Podawanie inhibitorów PAR-1 zmniejszało nasilenie ostrego odczynu w jelitach, natomiast nie zmniejszało nasilenia późnego odczynu popromiennego [75,76,77]. Wskazuje to na udział w powstawaniu reakcji późnych innych mechanizmów, niezależnych od oddziaływań z PARs.

### Inne proteazy a PAR

Różne proteazy wydzielane przez nowotwór mogą aktywować PAR, np. uPA (urokinase-plasminogen activator), MMPs oraz trypsyna. UPA w wyniku oddziaływań z u-PAR (urokinase-plasminogen activator receptor) przekształca plasminogen w plazminę, która może uaktywniać PAR. Plazmina degraduje białka przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz aktywuje MMPs, m.in. MMP-1, -9 i -14, które także należą do aktywatorów PAR-1 [5,33]. Coraz więcej dowodów istnieje na udział PAR-2 w progresji nowotworu [30,47,60]. Stężenie trypsyny, aktywatora PAR-2 jest podwyższone u chorych na raka żołądka, okrężnicy, jajnika i płuca [11].

## ODPOWIEDŹ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA AKTYWACJĘ PAR

### Aktywność mitogenna

Aktywacja PAR-1 przez trombinę, kompleks TF/VIIa lub TF/VIIa/Xa prowadzi do wzmocnienia zdolności proliferacyjnej komórek złośliwych m.in. przez przedłużoną aktywację przekaźników ERK1/2 [12,65]. Aktywacja szlaków zależnych od PARs wiedzie także do transformacji nowotworowej, progresji nowotworu, migracji oraz przeżycia komórek nowotworowych. Wykazano silne działanie mitogenne PAR aktywowanego trombiną na komórki k śródbłonna oraz mięśniowych naczyń krwionośnych krwi [67,68]. Ponadto, komórki śródbłonna, jak i płytki krwi opłaszczone trombiną wykazują wydłużone przeżycie, co sprzyja przyleganiu do nich komórek nowotworowych i ich dalszą inwazję [62,68].

W badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych raka trzustki, wątroby, szyjki macicy, okrężnicy, jamy ustnej stwierdzono aktywność mitogenną także PAR-2 [2,88,100,89,45,57]. Podawanie trypsyny lub peptydu aktywującego PAR-2 (SLIGKV) doprowadzało do proliferacji komórek rakowych oraz zwiększonej ekspresji i aktywności MMP-2 oraz szlaku ERK/AP-1 [88,99].

### Hamowanie i aktywacja apoptozy

Badania nad rolą PAR w procesie apoptozy wykazały, iż odpowiedź komórki wynikająca z aktywacji tych receptorów zależy od stężenia ich agonistów. W niskich stężeniach trombiny (poniżej 3 nM) dochodzi do pobudzenia proliferacji komórek nowotworowych i wzrostu guza nowotworowego, natomiast przy wysokich stężeniach trombiny i innych agonistów PAR – pobudzany jest proces apoptozy [97,98]. Aktywacja PAR-1 w komórkach nowotworowych przez czynnik Xa może także prowadzić do ich apoptozy, niezależnie od jego stężenia [11].

### Zwiększenie ekspresji integryn

Integryny należą do rodziny białek przezbłonowych, które pośredniczą w interakcjach między komórkami śródbłonna a składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej ważnymi np. do prawidłowego przebiegu procesu angiogenezy [68]. Jest wiele dowodów na to, iż zwiększenie ekspresji cząstek adhezyjnych wskutek działania PAR aktywowanego trombiną zwiększa potencjał przerzutowy komórek nowotworowych [78,79,80,85,86,100]. Udowodniono, iż aktywacja PAR-1 nasila adhezję komórek nowotworowych do składników macierzy zewnątrzkomórkowej przez oddziaływanie z integryną  $\alpha v \beta 5$  i przebudowę cytoszkieletu, co sprzyja migracji komórek, inwazji i tworzeniu przerzutów, m.in. w raku płuca i czerniaku [21,100]. Wykazano również, iż PAR przez zwiększenie ekspresji integryny  $\alpha 1 \text{Ib} \beta 3$  może prowadzić do przyłączania komórek czerniaka do komórek śródbłonna (w zależności od płytek krwi) i w ten sposób również zwiększać potencjał przerzutowy komórek nowotworowych [68,85,86]. Integryna  $\alpha v \beta 3$  występuje głównie na komórkach naczyń krwionośnych i pełni istotną rolę w przebiegu angiogenezy. Jej ekspresja również jest regulowana przez aktywność PAR i to z jej pomocą trombina łączy się z komórkami śródbłonna. Ponadto PAR aktywowany trombiną zwiększa ekspresję żelatynazy – enzymu degradującego kolagen IV i MMP-2, co zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, umożliwia migrację komórek śródbłonna oraz komórek nowotworowych i ich inwazję [68].

Aktywacja PAR-1 zwiększa ekspresję białka adhezyjnego selektyny P, która ułatwia tworzenie kompleksów płytek krwi z komórkami nowotworowymi i potencjalnie może odgrywać rolę w progresji nowotworu [62].

### Angiogeneza

Tworzenie sieci nowych naczyń krwionośnych, czyli angiogeneza (*angio* – naczynie, *genesis* – narodziny) jest procesem niezbędnym do wzrostu i rozwoju guza nowotworowego [23]. Drobne naczynia krwionośne dostarczają tlen i składniki odżywcze komórkom nowotworowym usuwając jednocześnie substancje pochodzące z przemiany materii. Badania przeprowadzone na modelach mysich wykazały udział PAR-1 w angiogenezie. Około 50% zwierzęcych embrionów pozbawionych PAR-1 umiera z powodu zatrzymania rozwoju naczyń krwionośnych,

a przywrócenie przekąźnictwa wzbudzanego przez ten receptor zapobiega śmierci komórki [26]. W komórkach czerniaka i raka piersi nasilenie ekspresji PAR-1 koreluje ze zwiększonym stężeniem czynnika wzrostu śródbłonna naczyń, VEGF (vascular endothelial growth factor), pobudzeniem angiogenezy oraz wzrostem guza [93,94]. Aktywacja PAR-2 przez kompleks TF/VIIa prowadzi do fosforylacji TF i aktywacji zależnych od niego mechanizmów angiogenezy, migracji komórek nowotworowych i progresji nowotworu [37,61]. Ponadto aktywacja zależnej od TF drogi krzepnięcia krwi umożliwia generację trombinę – przy obecności jonów wapnia na powierzchni błon fosfolipidowych płytek krwi czy komórek nowotworowych tworzy się kompleks protrombinazy – Xa/Va – przekształcający protrombinę w trombinę [24].

Aktywność proteolityczna trombinę wobec PAR doprowadza do aktywacji transkrypcji genów kodujących białka biorące udział w angiogenezie, m.in. VEGF, jego receptora (VEGFR), TF, MMP-2, angiopoetyny-2 (Ang-2), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (basic fibroblasts growth factor, bFGF), kinaz MAP oraz PI3 [23,67,82,90]. Źródłem czynników proangiogennych, m.in. VEGF, są aktywowane przez trombinę płytki krwi oraz komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, wobec których trombinę wykazuje silne działanie mitogenne, a także komórki nowotworowe (oddziaływania również zależne od PAR) [68]. W badaniach laboratoryjnych wykazano, że uwalnianie VEGF z płytek krwi i niektórych komórek nowotworowych pod wpływem trombinę może się odbywać w ciągu kilku minut [67]. Płytki krwi stymulowane trombinę, pochodzące od chorych na raka piersi uwalniają większe ilości VEGF w porównaniu z płytkami krwi osób zdrowych [62]. Wywołuje to trombinę przez aktywację PAR-1, natomiast stymulacja PAR-4 skutkuje sekrecją czynnika antyangiogenego – endostatyny [62]. Szczególnie istotne wyniki badań zaobserwowano w hodowlach komórkowych glejaków. Stwierdzono korelację między ekspresją trombinę i VEGF, co wskazuje na możliwy autokryny mechanizm regulacji angiogenezy w glejakach [91]. Ponadto PAR aktywowany trombinę indukuje wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, powodujących wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego indukowanego przez hipoksję, HIF-1, który łącząc się z genem VEGF aktywuje jego transkrypcję. Skutkiem jest zmiana kształtu komórek śródbłonna, wzrost przepuszczalności naczyń, nasilenie proliferacji komórek śródbłonna oraz zwiększona proteoliza, co przekłada się na pobudzenie angiogenezy. Zaokrąglenie się komórek śródbłonna i zwiększona przepuszczalność, wiodące do dysfunkcji bariery śródbłonnej powodują powstanie przejściowej macierzy o właściwościach proangiogennych i w konsekwencji – aktywację kaskady trombinę/PAR – IP3 – Ca<sup>2+</sup> – MAPK oraz odpowiedź komórki [82].

Aktywacja składowych hemostazy oraz angiogenezy zmieniające przepuszczalność naczyń krwionośnych są niezbędne do wzrostu i progresji choroby nowotworowej [82]. Część z opisanych oddziaływań jest aktywowanych po przerwaniu ciągłości naczyń krwionośnych, takich

jak np. proliferacja i migracja komórek śródbłonna, co ma spowodować wygojenie rany i wyłączenie aktywacji krzepnięcia krwi – w przypadku nowotworu ciągła obecność TF i PAR na powierzchni komórek nowotworowych oraz przekształcanie protrombinę w trombinę powodują, że te mechanizmy prowadzą do rozwoju nowej sieci naczyń krwionośnych i wzrostu guza. Tak więc, w przypadku nowotworu „rana” nie tylko nie zostaje wygojona, lecz jest wręcz przewlekłe stymulowana („jątrzona”) bo to daje szansę na przetrwanie i umożliwia inwazję.

## ZABURZENIA REGULACJI EKSPRESJI PAR W NOWOTWORACH

W przeciwieństwie do stanu fizjologii, w komórkach nowotworowych, np. raka piersi istnieją zaburzenia w regulacji aktywności PAR i dochodzi do stałej aktywacji przekąźników zależnych od tych receptorów, np. ERK1/2 czy też białek z rodziny Rho [10,38]. Wolniejsza internalizacja PAR i brak jego degradacji w lizosomach wiodą do stałej aktywacji PAR. Ponadto, zwiększenie transkrypcji mRNA PAR, regulowanej przez białko AP2, również może spowodować ich ciągłą aktywność. Nie można wykluczyć występowania mutacji aktywującej w genie kodującym PAR, jednak jak dotąd brak jest wiarygodnych danych dotyczących tego zagadnienia.

## AKTYWACJA PAR A INNE RECEPTORY

Aktywacja PAR-1 przez trombinę prowadzi do transaktywacji EGFR i ErbB2/HER2, a następnie wzbudzenia sygnalizacji zależnej od białek ERK-1 i -2 w komórkach inwazyjnego raka piersi [3]. Białka ERK-1 i -2 promują proliferację oraz przeżycie komórek nowotworowych i przyczyniają się do progresji choroby nowotworowej. Aktywacja białek ErbB odbywa się również w wyniku oddziaływań PAR z MMP przez uwalnianie z błony komórkowej EGF wiążącego heparynę (heparin-binding EGF).

## HAMOWANIE AKTYWNOŚCI PAR JAKO POTENCJALNA TERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA

Wiadomo, że heparyny drobnocząsteczkowe, stosowane w leczeniu oraz w profilaktyce choroby zakrzepowozatorowej u chorych na nowotwory, wykazują również działanie przeciwnowotworowe [64]. Inhibitor trombinę - hirudyna także ma takie właściwości, a ponadto zmniejsza nasilenie ostrego odczynu popromiennego [74,77]. Rola PAR w biologii nowotworów jest coraz lepiej udokumentowana, dlatego też inhibitory PAR stanowią również obiecujący obszar interwencji terapeutycznych. Teoretyczne miejsca uchwytu, które mogłyby uniemożliwić aktywację PAR to:

- blokada miejsca, z którym łączy się „splątany ligand” po zadziałaniu agonisty PAR (np. worapaksar);
- zasłonięcie miejsca przyłączenia agonisty i uniemożliwienie proteolizy PAR, a tym samym odsłonięcia „związane” ligandu (np. ATAP2);



- interakcje z wtórnymi przekazywaczami PAR (białkiem G, arrestyną, ERK);

- blokowanie syntezy PAR RNA.

W badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* (hodowle komórkowe) i *in vivo* (ksenografty) różnych nowotworów (m.in. raka piersi, jajnika, gruczołu krokowego) stosowanie związków blokujących PAR hamowało angiogenezę, apoptozę komórek nowotworowych, zmniejszało zdolność do tworzenia przerzutów, hamowało wzrost guza, a także wzmocnienia przeciwbólowego działania morfiny [1,6,11,92,98]. Jak dotąd, związki wchodzące w interakcje z PAR oceniano w badaniach klinicznych głównie u chorych na niedokrwioną chorobę serca [51]. Jednak, ze względu na hamowanie wzrostu guza w badaniach przedklinicznych, inhibitory reakcji

wzbudzanych przez PAR stanowią ciekawy obszar farmakologicznej interwencji także u chorych na nowotwory.

## PODSUMOWANIE

Przedstawione dane dostarczają dowodów na ścisły związek między funkcjonowaniem układu krzepnięcia krwi, a rozwojem i progresją choroby nowotworowej. To, iż guz nowotworowy jest zarówno źródłem substancji prozakrzepowych, jak i zawiera receptory, które z nimi reagują uzasadnia traktowanie choroby nowotworowej jak ranę, której wyleczenie/wygojenie utrudniają wzajemnie „nakręcające się” mechanizmy. Działanie PARs, trombiny i innych składowych układu hemostazy jest wielopoziomowe, dlatego też inhibitory PARs albo aktywujących je proteaz stanowią obecnie obiecujący obszar interwencji terapeutycznych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Agarwal A., Covic L., Seigny L.M., Kaneider N.C., Lazarides K., Azabdaftari G., Sharifi S., Kuliopulos A.: Targeting a metalloprotease-PAR-1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2008; 7: 2746-2757
- [2] Al-Eryani K., Cheng J., Abé T., Maruyama S., Yamazaki M., Babkair H., Essa A., Saku T.: Protease-activated receptor 2 modulates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Hum. Pathol.*, 2015; 46: 991-999
- [3] Arora P., Cuevas B.D., Russo A., Johnson G.L., Trejo J.: Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene*, 2008; 27: 4434-4445
- [4] Arora P., Ricks T.K., Trejo J.: Protease-activated receptor signaling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J. Cell. Sci.*, 2007; 120: 921-928
- [5] Austin K.M., Covic L., Kuliopulos A.: Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*, 2013; 121: 431-439
- [6] Bao Y., Hou W., Yang L., Kong X., Du M., Zheng H., Gao Y., Hua B.: Protease-activated receptor 2 antagonist potentiates analgesic effects of systemic morphine in a rat model of bone cancer pain. *Reg. Anesth. Pain. Med.*, 2015; 40: 158-165
- [7] Bar-Shavit R., Turm H., Salah Y., Maoz M., Cohen I., Weiss E., Uziely B., Grisaru-Granovsky S.: PAR-1 plays a role in epithelial malignancies: transcriptional regulation and novel signaling pathway. *IUBMB Life.*, 2011; 63: 397-402
- [8] Bäumer N., Krause A., Köhler G., Lettermann S., Evers G., Hascher A., Bäumer S., Berdel W.E., Müller-Tidow C., Tickenbrock L.: Proteinase-activated receptor 1 (PAR1) regulates leukemic stem cell functions. *PLoS One*, 2014; 9: e94993
- [9] Boire A., Covic L., Agarwal A., Jacques S., Sherifi S., Kuliopulos A.: PAR-1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 2005; 120: 303-313
- [10] Booden M.A., Eckert L.B., Der C.J., Trejo J.: Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 1990-1999
- [11] Borensztajn K.S., Bijlsma M.F., Groot A.P., Brüggemann L.W., Versteeg H.H., Reitsma P.H., Peppelenbosch M.P., Spek C.A.: Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation. *Exp. Cell. Res.*, 2007; 313: 2622-2633
- [12] Camerer E., Huang W., Coughlin S.R.: Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 5255-5260
- [13] Camerer E., Qazi A.A., Duong D.N., Cornelissen I., Advincula R., Coughlin S.R.: Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*, 2004; 104: 397-401
- [14] Carney D.H., Cunningham D.D.: Initiation of chick cell division by trypsin action at the cell surface. *Nature*, 1977; 268: 602-606
- [15] Coughlin S.R.: Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.*, 2005; 3: 1800-1814
- [16] Dardik R., Savion N., Kaufmann Y., Varon D.: Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *Br. J. Cancer*, 1998; 77: 2069-2075
- [17] DeFea K.A., Zalevsky J., Thoma M.S., Déry O., Mullins R.D., Bunnett N.W.:  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell. Biol.*, 2000; 148: 1267-1281
- [18] Du X., Wang S., Lu J., Cao Y., Song N., Yang T., Dong R., Zang L., Yang Y., Wu T., Li J.: Correlation between MMP1-PAR1 axis and clinical outcome of primary gallbladder carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2011; 41: 1086-1093
- [19] Dvorak H.F.: Tumors: wounds that do not heal. *N. Engl. J. Med.*, 1986; 315: 1650-1659
- [20] Esumi N., Fan D., Fidler I.J.: Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res.*, 1991; 51: 4549-4556
- [21] Even-Ram S.C., Maoz M., Pokroy E., Reich R., Katz B.Z., Gutwein P., Altevogt P., Bar-Shavit R.: Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the  $\alpha_v\beta_5$  integrin. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 10952-10962
- [22] Even-Ram S., Uziely B., Cohen P., Grisaru-Granovsky S., Maoz M., Ginzburg Y., Reich R., Vlodavsky I., Bar-Shavit R.: Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.*, 1998; 4: 909-994
- [23] Folkman J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1995; 1: 27-31
- [24] Furie B., Furie B.C.: The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 1988; 53: 505-518

- [25] Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg M.D., Kaufmann R.: Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell. Commun. Signal.*, 2013; 11: 86
- [26] Griffin C.T., Srinivasan Y., Zheng Y.W., Huang W., Coughlin S.R.: A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*, 2001; 293: 1666-1670
- [27] Grimsey N., Lin H., Trejo J.: Endosomal signaling by protease-activated receptors. *Methods Enzymol.*, 2014; 535: 389-401
- [28] Gullapalli A., Wolfe B.L., Griffin C.T., Magnuson T., Trejo J.: An essential role for SNX1 in lysosomal sorting protease-activated receptor-1: evidence for retromer, Hrs- and Tsg101-independent functions of sorting nexins. *Mol. Biol. Cell*, 2006; 17: 1228-1238
- [29] Guo H., Liu D., Gelbard H., Cheng T., Insalaco R., Fernández J.A., Griffin J.H., Zlokovic B.V.: Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*, 2004; 41: 563-572
- [30] Jaber M., Maoz M., Kancharla A., Agranovich D., Peretz T., Grisaru-Granovsky S., Uziely B., Bar-Shavit R.: Protease-activated-receptor-2 affects protease-activated-receptor-1-driven breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014; 71: 2517-2533
- [31] Koizume S., Jin M.S., Miyagi E., Hirahara F., Nakamura Y., Piao J.H., Asai A., Yoshida A., Tsuchiya E., Ruf W., Miyagi Y.: Activation of cancer cell migration and invasion by ectopic synthesis of coagulation factor VII. *Cancer Res.*, 2006; 66: 9453-9460
- [32] Li S.M., Jiang P., Xiang Y., Wang W.W., Zhu Y.C., Feng W.Y., Li S.D., Yu G.Y.: Protease-activated receptor (PAR)1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma. *Dongwuxue Yanjiu*, 2014; 35: 420-425
- [33] Li X., Tai H.H.: Thromboxane A2 receptor-mediated release of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) induces expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by activation of protease-activated receptor 2 (PAR2) in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Mol. Carcinog.*, 2014; 53: 659-666
- [34] Liao M., Tong P., Zhao J., Zhang Y., Li Z., Wang J., Feng X., Hu M., Pan Y.: Prognostic value of matrix metalloproteinase-1/proteinase-activated receptor-1 signaling axis in hepatocellular carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.*, 2012; 18: 397-403
- [35] Lin H., Liu A.P., Smith T.H., Trejo J.: Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.*, 2013; 65: 1198-1213
- [36] Lin H., Trejo J.: Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits  $\beta$ -arrestin-mediated endosomal signaling. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 11203-11215
- [37] Lin Z.M., Zhao J.X., Duan X.N., Zhang L.B., Ye J.M., Xu L., Liu Y.H.: Effects of tissue factor, PAR-2 and MMP-9 expression on human breast cancer cell line MCF-7 invasion. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014; 15: 643-646
- [38] Martin C.B., Mahon G.M., Klinger M.B., Kay R.J., Symons M., Der C.J., Whitehead I.P.: The thrombin receptor, PAR-1, causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene*, 2001; 20: 1953-1963
- [39] McLaughlin J.N., Patterson M.M., Malik A.B.: Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 5662-5667
- [40] Mußbach F., Henklein P., Westermann M., Settmacher U., Böhm F.D., Kaufmann R.: Proteinase-activated receptor 1- and 4-promoted migration of Hep3B hepatocellular carcinoma cells depends on ROS formation and RTK transactivation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2015; 141: 813-825
- [41] Nakanishi-Matsui M., Zheng Y.W., Sulciner D.J., Weiss E.J., Ludeman M.J., Coughlin S.R.: PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, 2000; 404: 609-613
- [42] Nierodzik M.L., Chen K., Takeshita K., Li J.J., Huang Y.Q., Feng X.S., D'Andrea M.R., Andrade-Gordon P., Karparkin S.: Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood*, 1998; 92: 3694-3700
- [43] Nierodzik M.L., Kajumo F., Karparkin S.: Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets *in vitro* and tumor metastasis *in vivo*. *Cancer Res.*, 1992; 52: 3267-3272
- [44] Nierodzik M.L., Karparkin S.: Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, 2006; 10: 355-362
- [45] Nishibori M., Mori S., Takahashi H.K.: Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2-mediated proliferation of colon cancer cell. *J. Pharmacol. Sci.*, 2005; 97: 25-30
- [46] Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J.: Molecular cloning of a potential novel proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 9208-9212
- [47] Olejar T., Vetvicka D., Zadinova M., Pouckova P., Kukul J., Jezek P., Matej R.: Dual role of host Par2 in a murine model of spontaneous metastatic B16 melanoma. *Anticancer Res.*, 2014; 34: 3511-3515
- [48] Ossovskaya V.S., Bunnett N.W.: Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.*, 2004; 84: 579-621
- [49] Otsuki T., Fujimoto D., Hirono Y., Goi T., Yamaguchi A.: Thrombin conducts epithelial mesenchymal transition via protease-activated receptor-1 in human gastric cancer. *Int. J. Oncol.*, 2014; 45: 2287-2294
- [50] Palumbo J.S., Kombrinck K.W., Drew A.F., Grimes T.S., Kiser J.H., Degen J.L., Bugge T.H.: Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood*, 2000; 96: 3302-3309
- [51] Ramachandran R., Noorbakhsh F., Defea K., Hollenberg M.D.: Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012; 11: 69-86
- [52] Rasmussen U.B., Vouret-Craviari V., Jallat S., Schlesinger Y., Pages G., Pavirani A., Lecocq J.P., Pouyssegur J., Van Obberghen-Schilling E.: cDNA cloning and expression of a hamster  $\alpha$ -thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett.*, 1991; 288: 123-128
- [53] Rieser P.: The insulin-like action of pepsin and pepsinogen. *Acta Endocrinol.*, 1967; 54: 375-379
- [54] Riewald M., Petrovan R.J., Donner A., Mueller B.M., Ruf W.: Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*, 2002; 296: 1880-1882
- [55] Riewald M., Ruf W.: Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 7742-7747
- [56] Rydén L., Grabau D., Schaffner F., Jönsson P.E., Ruf W., Belting M.: Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2010; 126: 2330-2340
- [57] Sánchez-Hernández P.E., Ramirez-Dueñas M.G., Albarran-Somoza B., García-Iglesias T., del Toro-Arreola A., Franco-Topete R., Daneri-Navarro A.: Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in cervical cancer proliferation. *Gynecol. Oncol.*, 2008; 108: 19-26
- [58] Sedda S., Marafini I., Caruso R., Pallone F., Monteleone G.: Proteinase activated-receptors-associated signaling in the control of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2014; 20: 11977-11984
- [59] Shapiro M.J., Weiss E.J., Faruqi T.R., Coughlin S.R.: Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 25216-25221
- [60] Shi K., Queiroz K.C., Roelofs J.J., van Noesel C.J., Richel D.J., Spek C.A.: Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. *J. Pathol.*, 2014; 234: 398-409

- [61] Shi X., Gangadharan B., Brass L.F., Ruf W., Mueller B.M.: Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol. Cancer Res.*, 2004; 2: 395-402
- [62] Sierko E., Wojtukiewicz M.Z.: Inhibition of platelet function: does it offer a chance of better cancer progression control? *Semin. Thromb. Hemost.*, 2007; 33: 712-721
- [63] Sierko E., Wojtukiewicz M.Z., Zimnoch L., Thorpe P.E., Brecken R.A., Kisiel W.: Co-localization of prothrombin fragment F1+2 and VEGF-R2-bound VEGF in human colon cancer. *Anticancer Res.*, 2011; 31: 843-847
- [64] Smorenburg S.M., Hettiarachchi R.J., Vink R., Büller H.R.: The effects of unfractionated heparin on survival in patients with malignancy – a systematic review. *Thromb. Haemost.*, 1999; 82: 1600-1604
- [65] Trejo J., Connolly A.J., Coughlin S.R.: The cloned thrombin receptor is necessary and sufficient for activation of mitogen-activated protein kinase and mitogenesis in mouse lung fibroblasts. Loss of responses in fibroblasts from receptor knockout mice. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 21536-21541
- [66] Trousseau A.: Phlegmasia dolens. *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris*, 1865; 3: 490-515
- [67] Tsopanoglou N.E., Maragoudakis M.E.: On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by upregulation of its receptors. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 23969-23976
- [68] Tsopanoglou N.E., Maragoudakis M.E.: Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004; 30: 63-69
- [69] Ünlü B., Versteeg H.H.: Effects of tumor-expressed coagulation factors on cancer progression and venous thrombosis: is there a key factor? *Thromb. Res.*, 2014; 133 (Suppl. 2): S76-S84
- [70] Uzunoglu F.G., Kolbe J., Wikman H., Güngör C., Bohn B.A., Nentwich M.F., Reeh M., König A.M., Bockhorn M., Kutup A., Mann O., Izbicki J.R., Vashist Y.K.: VEGFR-2, CXCR-2 and PAR-1 germline polymorphisms as predictors of survival in pancreatic carcinoma. *Ann Oncol.*, 2013; 24: 1282-1290
- [71] Uzunoglu F.G., Yavari N., Bohn B.A., Nentwich M.F., Reeh M., Pantel K., Perez D., Tsui T.Y., Bockhorn M., Mann O., Izbicki J.R., Wikman H., Vashist Y.K.: C-X-C motif receptor 2, endostatin and proteinase-activated receptor 1 polymorphisms as prognostic factors in NSCLC. *Lung Cancer*, 2013; 81: 123-129
- [72] Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R.: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991; 64: 1057-1068
- [73] Vu T.K., Wheaton V.I., Hung D.T., Coughlin S.R.: Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, 1991; 353: 674-677
- [74] Walz D.A., Fenton J.W.: The role of thrombin in tumor cell metastasis. *Invasion Metastasis*, 1994-1995; 14: 303-308
- [75] Wang J., Boerma M., Kulkarni A., Hollenberg M.D., Hauer-Jensen M.: Activation of protease activated receptor 2 by exogenous agonist exacerbates early radiation injury in rat intestine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010; 77: 1206-1212
- [76] Wang J., Kulkarni A., Chintala M., Fink L.M., Hauer-Jensen M.: Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates intestinal radiation mucositis in a preclinical rat model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2013; 85: 208-214
- [77] Wang J., Zheng H., Ou X., Albertson C.M., Fink L.M., Herbert J.M., Hauer-Jensen M.: Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J. Thromb. Haemost.*, 2004; 2: 2027-2035
- [78] Wojtukiewicz M.Z., Ciarelli J.J., Snyder D.A., Nelson K.K., Walz D.A., Honn K.V.: Increased tumor cell adhesiveness and experimental metastasis following exposure to alpha-thrombin, its precursor and analogues. American Cancer Society Michigan Division Inc., Cancer Research Conference, Ypsilanti, MI, USA, 1990, Abstract 22
- [79] Wojtukiewicz M.Z., Ciarelli J.J., Snyder D., Nelson K.K., Walz D.A., Honn K.V.: Thrombin increases tumor cell adhesiveness via a non-proteolytic pathway. First Regional Meeting of the American Society for Cell Biology, Chicago, IL, USA, 1990, Abstract 91
- [80] Wojtukiewicz M.Z., Ciarelli J.J., Walz D.A., Honn K.V.: Thrombin enhances cancer cell expression of an integrin receptor and increases adhesion. 81st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 1990, Proceedings of AACR, 31, Abstract 476
- [81] Wojtukiewicz M.Z., Rucinska M., Zacharski L.R., Kozlowski L., Zimnoch L., Piotrowski Z., Kudryk B.J., Kisiel W.: Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma. *Thromb. Haemost.*, 2001; 86: 1416-1420
- [82] Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Rak J.: Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004; 30: 5-20
- [83] Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Zacharski L.R., Zimnoch L., Kudryk B., Kisiel W.: Tissue factor-dependent coagulation activation and impaired fibrinolysis in situ in gastric cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2003; 29: 291-300
- [84] Wojtukiewicz M.Z., Tang D.G., Ben-Josef E., Renaud C., Walz D.A., Honn K.V.: Solid tumor cells express functional "tethered ligand" thrombin receptor. *Cancer Res.*, 1995; 55: 698-704
- [85] Wojtukiewicz M.Z., Tang D.G., Ciarelli J.J., Nelson K.K., Walz D.A., Diglio C.A., Mammen E.F., Honn K.V.: Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells. *Int. J. Cancer*, 1993; 54: 793-806
- [86] Wojtukiewicz M.Z., Tang D.G., Nelson K.K., Walz D.A., Diglio C.A., Honn K.V.: Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased  $\alpha_{IIb}\beta_3$  expression on the cell surface. *Thromb. Res.*, 1992; 68: 233-245
- [87] Wojtukiewicz M.Z., Zacharski L.R., Rucińska M., Zimnoch L., Jaromin J., Różańska-Kudelska M., Kisiel W., Kudryk B.J.: Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. *Thromb. Haemost.*, 1999; 82: 1659-1662
- [88] Xie L., Duan Z., Liu C., Zheng Y., Zhou J.: Protease-activated receptor 2 agonist increases cell proliferation and invasion of human pancreatic cancer cells. *Exp. Ther. Med.*, 2015; 9: 239-244
- [89] Xie L., Zheng Y., Li X., Zhao J., Chen X., Chen L., Zhou J., Hai O., Li F.: Enhanced proliferation of human hepatoma cells by PAR-2 agonists via the ERK/AP-1 pathway. *Oncol. Rep.*, 2012; 28: 1665-1672
- [90] Xie Q., Bao X., Chen Z.H., Xu Y., Keep R.F., Muraszko K.M., Xi G., Hua Y.: Role of protease-activated receptor-1 in glioma growth. *Acta Neurochir. Suppl.*, 2016; 121: 355-360
- [91] Yamahata H., Takeshima H., Kuratsu J., Sarker K.P., Tanioka K., Wakimaru N., Nakata M., Kitajima I., Maruyama I.: The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: an intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Int. J. Oncol.*, 2002; 20: 921-928
- [92] Yang E., Boire A., Agarwal A., Nguyen N., O'Callaghan K., Tu P., Kuliopulos A., Covic L.: Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating peptidic inhibitors Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis. *Cancer Res.*, 2009; 69: 6223-6231
- [93] Yin Y.J., Salah Z., Grisaru-Granovsky S., Cohen I., Even-Ram S.C., Maoz M., Uziely B., Peretz T., Bar-Shavit R.: Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23: 940-944
- [94] Yin Y.J., Salah Z., Maoz M., Even-Ram S.C., Ochayon S., Neufeld G., Katzav S., Bar-Shavit R.: Oncogenic transformation induces tumor angiogenesis: a role for PAR-1 activation. *FASEB J.*, 2003; 17: 163-174
- [95] Yuan L., Liu X.: Platelets are associated with xenograft tumor growth and the clinical malignancy of ovarian cancer through an angiogenesis-dependent mechanism. *Mol. Med. Rep.*, 2015; 11: 2449-2458

- [96] Zacharski L.R., Memoli V.A., Morain W.D., Schlaeppi J.M., Rousseau S.M.: Cellular localization of enzymatically active thrombin in intact human tissues by hirudin binding. *Thromb. Haemost.*, 1995; 73: 793-797
- [97] Zain J., Huang Y.Q., Feng X., Nierodzik M.L., Li J.J., Karpatkin S.: Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood*, 2000; 95: 3133-3138
- [98] Zania P., Kritikou S., Flordellis C.S., Maragoudakis M.E., Tsopanoglou N.E.: Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease-activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006; 318: 246-254
- [99] Zheng Y.M., Xie L.Q., Li X., Zhao J.Y., Chen X.Y., Chen L., Zhou J., Li F.: Effect of ERK/AP-1 signaling pathway on proliferation of hepatoma cells induced by PAR-2 agonists. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009; 89: 3116-3121
- [100] Zhu L., Wang X., Wu J., Mao D., Xu Z., He Z., Yu A.: Cooperation of protease-activated receptor 1 and integrin  $\alpha v \beta 5$  in thrombin-mediated lung cancer cell invasion. *Oncol. Rep.*, 2012; 28: 553-560
- [101] Zhu Q., Luo J., Wang T., Ren J., Hu K., Wu G.: The activation of protease-activated receptor 1 mediates proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol. Rep.*, 2012; 28: 255-261

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.