



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Φερενίκη-Λήδα Κωσταδήμα
Ιατρός, Παθολόγος-Ογκολόγος

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

Ι Ω Α Ν Ν Ι Ν Α 2 0 2 2

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης της κ. Κωσταδήμα Φερενίκης-Λήδας: 30-05-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 506α/10-06-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Μέλη:

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Γεωργίου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-06-2003

«Μοριακή Μελέτη Έκφρασης Γονιδίων και Πρωτεϊνών του Εμβρύου και του Πλακούντα σε Επιθηλιακούς Γυναικολογικούς Καρκίνους»

Τροποποίηση θέματος: Δ.Σ. 207α/08-06-2004

«Μοριακή μελέτη γονιδίων και πρωτεϊνών του εμβρύου και του πλακούντα σε καρκίνο του μαστού»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 798α/06-06-2017

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Παυλίδης Νικόλαος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Γούσια Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Πενθερουδάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Χαρίσης Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 970^α/29-06-2021

Επιβλέπων:

Παυλίδης Νικόλαος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Μέλη:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής - Γυναικολογίας

Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

ΑΝΑΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 996α/08-02-2022

1. Παυλίδης Νικόλαος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής & Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Χαρίσης Χαράλαμπος, Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τσέκερης Περικλής, Καθηγητής Ακτινοθεραπείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μάουρι Ντάβιντε, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-04-2022

Ιωάννινα 27-05-2022

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ευχαριστίες

Ο δρόμος ως εδώ ήταν πολύ δύσκολος και υπήρξαν πολλές αφορμές που με ώθησαν να εγκαταλείψω αυτή μου την προσπάθεια. Βρέθηκα κοντά σε αυτό το δίλημμα αλλά ευτυχώς για εμένα υπήρξαν δάσκαλοι, σύμβουλοι και φίλοι που δε με άφησαν να ενδώσω, τους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την υποστήριξη και τη βοήθειά τους.

Ακολουθως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής,

Νικόλαο Παυλίδη, Ομότιμο Καθηγητή Ογκολογίας, για την στήριξη του, τη συμβολή του και την επιστημονική του καθοδήγηση.

Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής Γυναικολογίας, για την συμβολή του, στην κατανόηση των μοριακών τεχνικών, αλλά και στο σχεδιασμό και υλοποίηση αυτών.

Άννα Γούσια, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, για την στήριξη και τις συμβουλές.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κο Γεώργιο Βαρθολομάτο Υπεύθυνο Μονάδας Μοριακής Βιολογίας για την ουσιαστική του βοήθεια και καθοδήγηση στην πραγματοποίηση των μοριακών τεχνικών καθώς και την Κα Δωροθέα Ντόβα.

Μέρος του ερευνητικού έργου πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Bayer Health Care Diagnostics στην Κολωνία της Γερμανίας και οφείλω να ευχαριστήσω για τη φιλοξενία, τη συνεργασία και τη συμβολή τους στη μελέτη, τους Ralph Wirtz και Udo Stropp.

Ευχαριστώ την Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα για την οικονομική (HeCOG research grant) και επιστημονική υποστήριξη όπως και την Εταιρεία Παθολόγων Ογκολόγων Ελλάδας.

Ευχαριστώ τους Γεώργιο Πενθερουδάκη και Βασιλική Μαλάμου–Μήτση για την προσφορά τους και τη βοήθεια τους που αν και ήταν μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, ο καθένας τους, για διαφορετικό λόγο, απέχουν από την τελική συμβουλευτική επιτροπή.

Τα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: Άννα Μπατιστάτου, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Περικλή Τσέκερη, Καθηγητή Ακτινοθεραπείας, Χαράλαμπο Χαρίση, Καθηγητή Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων και Ντάβιντε Μάουρι, Επίκουρο Καθηγητή Ογκολογίας.

Το προσωπικό της Ογκολογικής Κλινικής και τους ασθενείς για τη συμβολή τους και συνεργασία τους.

Μέσα από την καρδιά μου ένα τεράστιο ευχαριστώ στους Βαγγέλη Κωλέττα και την οικογένεια μου που με στήριξαν, με βοήθησαν και με άντεξαν.

Αφιερωμένη στους : Βύρωνα

Ράνια

Βαγγέλη

Ίνα

Πρόλογος

Παρά τις εξελίξεις των τελευταίων χρόνων τόσο στον τομέα της τεχνολογίας όσο και στον τομέα της ιατρικής ο καρκίνος συνεχίζει να υπάρχει, να ταλαιπωρεί και τελικά να σκοτώνει τον άνθρωπο.

Οι προσπάθειες όλων μας συνεχίζονται, ώστε να μειώσουμε την πιθανότητα εμφάνισής του, να γίνει εγκαίρως η διάγνωσή του και φυσικά να αντιμετωπιστεί και να θεραπευθεί με τον πιο επαρκή και δραστικό τρόπο.

Η ογκολογία ως ειδικότητα με κέρδισε διότι έχοντας ως βάση της τη «παλαιά κλασική παθολογία» συνεχώς εξελίσσεται και ανοίγει νέους ορίζοντες προς άλλες επιστήμες μέχρι να πετύχει το απόλυτο. Προσπαθούμε δηλαδή να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς της καρκινογένεσης, να τους ελέγξουμε και τελικά να τους απενεργοποιήσουμε μέχρι και να εξαλείψουμε εντελώς τον καρκίνο ή να τον καταστήσουμε χρόνιο νόσημα. Αυτό σημαίνει ότι η γνώση δεν είναι ποτέ αρκετή και πως ένας ατελείωτος αγώνας δρόμου για περισσότερη απόκτηση γνώσης μόλις άρχισε.

Ο συχνότερος καρκίνος που απαντάται στις γυναίκες είναι ο καρκίνος του μαστού. Ευτυχώς, τις περισσότερες φορές η διάγνωση γίνεται στα πρώιμα στάδια της νόσου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι περισσότερες γυναίκες, αφού λάβουν την κατάλληλη θεραπεία να συνεχίζουν τη ζωή τους, να υπαβάλλονται σε περιοδικούς ελέγχους και να παραμένουν υγιείς. Υπάρχουν δυστυχώς και εκείνες οι ασθενείς, που ενώ έλαβαν την πρέπουσα αντιμετώπιση θα υποτροπιάσουν, θα εμφανίσουν μεταστάσεις και τελικά θα καταλήξουν από τη νόσο τους.

Προσπαθώντας να αναγνωρίσουμε αυτές τις ασθενείς και να βελτιώσουμε τη θεραπευτική μας προσέγγιση, μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών εμβρυικής προέλευσης που δρουν ως κατασταλτικά γονίδια της μετάστασης. Πρόκειται δηλαδή, για γονίδια που παρεμποδίζουν τη μετάσταση του πρωτοπαθούς όγκου, δρώντας σε ένα από τα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας.

Σκοπός μας είναι η μελέτη της έκφρασης των μορίων αυτών στον καρκίνο του μαστού, η συσχέτισή τους με τη μεταστατική διαδικασία και η ενδεχόμενη αξία τους ως καρκινικοί δείκτες ή ως προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
Καρκίνος μαστού	2
Διάγνωση	3
Σταδιοποίηση	3
Προβλεπτικοί παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού	7
Προγνωστικοί παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού	7
Γονίδια καταστολής της μετάστασης	10
Μεταστίνη / Metastin	10
Γλυκοδελίνη / Glycodelin	13
Επιβιωτίνη / Survivin	13
Περιγραφή Σημασίας και Αναμενόμενη Συμβολή του Ερευνητικού Έργου	15
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
Υλικά και μέθοδοι	18
Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών	18
Ανακαλλιέργεια κυττάρων	19
Διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο	19
Δείγματα καρκίνου μαστού	20
Μεθοδολογία	22
Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός	22
Μοριακές τεχνικές	23
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές	23
Αντιδράσεις PCR	24
Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου KiSS-1 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές	25
Μοριακή ανάλυση για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου KiSS-1 σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού	26
Διεύρυνση της ομάδας των ασθενών: μοριακή ανάλυση της μεταγραφής της μεταστίνης, της επιβιωτίνης και της γλυκοδελίνης	27

Ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού	27
Απομόνωση mRNA από μονιμοποιημένους ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού	31
Βιοπληροφορική ανάλυση	33
Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και αποτελεσμάτων	33
Αποτελέσματα	35
Ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου KiSS-1 σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές	35
Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου KiSS-1 και συσχετίσεις σε 50 καρκινώματα μαστού	35
Μεταγραφή του γονιδίου KiSS-1 και συσχετισμοί	41
Ανοσοϊστοχημική έκφραση και συσχετισμοί KiSS-1	42
Συσχέτιση μοριακών δεδομένων KiSS-1 με την έκβαση	44
Μεταγραφική δραστηριότητα του KiSS-1 στην ομάδα επικύρωσης	44
Έκφραση της γλυκοδελίνης σε αδενοκαρκινώματα μαστού	52
Έκφραση της επιβιωτίνης σε αδενοκαρκινώματα μαστού	56
Συζήτηση	67
Καρκίνος του μαστού και ογκοκατασταλτικά γονίδια	68
Έκφραση και ρόλος του γονιδίου της μεταστίνης KiSS-1	70
Έκφραση και ρόλος του γονιδίου της γλυκοδελίνης	77
Έκφραση και ρόλος του γονιδίου της επιβιωτίνης	79
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	87
Περίληψη	88
Summary in English	93
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΕΙΚΟΝΕΣ

1: Διάγραμμα κλινικής μελέτης	28
2: Ζωνες εξονίου IVa του γονιδίου KiSS-1/ ανίχνευση με SSCP	36
3: Αλληλούχηση του γονιδίου KiSS-1	38
4: Παρουσία λεμφαδένων σε σύγκριση με τη μετάλλαξη του γονιδίου <i>KiSS-1</i>	39
5: Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου <i>KiSS-1</i> στον καρκίνο του μαστού	40
6: Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης <i>KiSS-1</i> σε ιστό	43
7: Επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) 272 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού σε σχέση με τη μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου <i>KiSS-1</i>	49
8: Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν <i>KiSS-1</i> .	50
9: Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζονται υποδοχέα της μεταστατίνης	51
10: Επίδραση της έκφρασης της γλυκοδελίνης στην ολική επιβίωση των ασθενών	55
11: Επίδραση της έκφρασης της επιβιωτίνης στην ολική επιβίωση των ασθενών	58
12: Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν την επιβιωτίνη	59
13: Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης	60
14: Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης	61
15: Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης	62
16: Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης	63
17: Γονιδιακές αλλαγές υπεύθυνες για τη μεταβολή της έκφρασης του	64

γονιδίου της επιβιωτίνης στον καρκίνο του μαστού	
18: Σχέση της έκφρασης της επιβιωτίνης με την απόκριση τους στη χημειοθεραπεία.	65

ΠΙΝΑΚΕΣ

1: TNM σταδιοποίηση AJCC UICC 2010	4
2: Σταδιοπίηση καρκίνου του μαστού	6
3: Χαρακτηριστικά ασθενών	21
4: Βασικά χαρακτηριστικά ασθενών	29
5: Συγκριτικά τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών των 2 ομάδων	30
6: Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και συσχέτιση με τη μεταγραφική κατάσταση του <i>KiSS-1</i>	46
7: Μεταγραφή βασικών μοριακών δεικτών και συσχέτιση με τη μεταγραφική κατάσταση-έκφραση του γονιδίου <i>KiSS-1</i>	47
8: Συσχέτιση επιβίωσης με τη μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου <i>KiSS-1</i>	48
9: Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων με βάση την έκφραση της γλυκοδελίνης	53
10: Μοριακά χαρακτηριστικά με βάση της έκφραση της γλυκοδελίνης	54
11: Συσχέτιση της έκφρασης του mRNA της επιβιωτίνης με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και τα μοριακά χαρακτηριστικά των ογκων	57

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καρκίνος μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί παγκοσμίως τον δεύτερο συχνότερο καρκίνο μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα. Φέρεται ως ο πλέον θανατηφόρος καρκίνος στις γυναίκες με περισσότερες από 2 εκατομμύρια περιπτώσεις κάθε έτος [1].

Η συχνότητα εμφάνισης του διαφέρει ανάλογα με την κοινωνική και οικονομική κατάσταση που επικρατεί σε κάθε περιοχή και αυτό σχετίζεται με τον τρόπο ζωής των γυναικών (αύξηση σωματικού βάρους, ηλικία εμμηναρχής, ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης, θηλασμός) [2]

Στις ΗΠΑ υπάρχουν περισσότερα από 260.000 περιστατικά καρκίνου του μαστού κάθε χρόνο, ενώ καταγράφονται πλέον των 40,000 θανάτων ετησίως [3].

Με τη διάδοση των προληπτικών εξετάσεων όλο και περισσότερες γυναίκες τον ανακαλύπτουν σε πρώιμα στάδια.

Η έγκαιρη διάγνωση καθώς και οι σύγχρονες και επικουρικές θεραπείες έχουν άμεση επίδραση στην επιβίωση των γυναικών αυτών [4,5,6]. Οι κατάλληλες επικουρικές θεραπείες (ακτινοθεραπεία ή συστηματική) χορηγούνται μετά την ιστολογική διάγνωση και την σταδιοποίηση της νόσου.

Ο θεραπευτικός στόχος είναι ότι αφού οι γυναίκες αυτές διαγνωσθούν εγκαίρως θα πρέπει να αντιμετωπιστούν με χειρουργείο, χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και ακτινοθεραπεία προκειμένου να μην υποτροπιάσουν και να μην καταλήξουν από τη νόσο.

Στην Ευρώπη η 10-ετης επιβίωση των ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού ξεπερνά το 70% [7], ενώ το 30-50% των γυναικών αυτών ενδέχεται να υποτροπιάσει και να καταλήξει από τη νόσο. [8]

Η μεταστατική εξάπλωση των κακοηθών κυττάρων είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που απαιτεί αποκόλληση από τον πρωτοπαθή όγκο, επιβίωση στην κυκλοφορία και συστηματική διασπορά τους, με επακόλουθο τη διήθηση, τον πολλαπλασιασμό και την αποίκηση των απομακρυσμένων ιστών [9]. Η ταυτοποίηση των μοριακών μεταβολών που συμβάλλουν στον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό, στη διείσδυση και τη μετάσταση είναι ιδιαίτερα αναγκαία καθώς μπορεί να επιτρέψει την εντατικοποίηση των επικουρικών τοπικών και συστηματικών θεραπειών σε επιλεγμένες υποομάδες ασθενών, παρέχοντας συγκεκριμένους στόχους ικανούς να ανασταλούν από στοχεύουσες θεραπείες.

Διάγνωση

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού επιτυγχάνεται με:

- την κλινική εξέταση : ψηλάφηση μαστού και λεμφαδένων μασχάλης
- τον απεικονιστικό έλεγχο: μαστογραφία, υπέρηχο μαστών, μαγνητική τομογραφία μαστών
- τη βιοψία και την παθολογοανατομική εξέταση του δείγματος.

Σταδιοποίηση

Το TNM σύστημα σταδιοποίησης είναι ένα παγκοσμίως αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης όπου:

- Το **T** περιγράφει το μέγεθος του όγκου
- Το **N** περιγράφει αν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους τοπικούς λεμφαδένες
- Το **M** περιγράφει αν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί ή όχι σε άλλα μέρη του σώματος

Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιείται ώστε να αναγνωριστεί το στάδιο της νόσου προκειμένου να καθοριστεί η θεραπευτική αντιμετώπιση, να προσδιοριστεί η πρόγνωση και το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών [10] (Πίνακες 1- 2).

Πίνακας 1

TNM σταδιοποίηση AJCC UICC 2010

T	
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δε δύναται να αξιολογηθεί
T0	Δεν αποδεικνύεται ο πρωτοπαθής όγκος
Tis (DCIS /LCIS)	Καρκίνος μη διηθητικός, «in situ» (πορογενής/λοβιακός)
T1 (mi,a,b,c)	Όγκος ≤20 χιλ στη μεγαλύτερη διάστασή του
T2	Όγκος >20 χιλ αλλά ≤50 χιλ στη μεγαλύτερη διάστασή του
T3	Όγκος >50 χιλ στη μεγαλύτερη διάστασή του
T4 (a,b,c,d)	Όγκος οποιοδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα και / ή το δέρμα

N	
Nx	Οι τοπικοί λεμφαδένες δε δύναται να αξιολογηθούν.
N0	Χωρίς μετάσταση στους τοπικούς λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε ευκίνητους μασχαλιαίους λεμφαδένα/ες, επιπέδου I-II, ομόπλευρα
N2 (a,b)	Μετάσταση σε μασχαλιαίους λεμφαδένα/ες, επιπέδου I,II, ομόπλευρα, οι οποίοι είναι κλινικά καθηλωμένοι, ή μετάσταση σε ομόπλευρους ενδομαστικούς λεμφαδένες με απουσία μετάστασης σε μασχαλιαίους λεμφαδένες
N3 (a,b,c)	Μετάσταση σε υποκλείδιους ομόπλευρους λεμφαδένες, μασχαλιαίους λεμφαδένες επιπέδου III με ή χωρίς συμμετοχή μασχαλιαίων λεμφαδένων επιπέδου I-II, και/ή κλινικά ανιχνεύσιμοι ενδομαστικοί ομόπλευροι λεμφαδένες με κλινικά ανιχνεύσιμη μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες I-II επιπέδου, ή μετάσταση σε ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες με η χωρίς συμμετοχή των μασχαλιαίων λεμφαδένων.

M	
M0	Χωρίς κλινική ή απεικονιστική απόδειξη απομακρυσμένης μετάστασης.
M0 (i+)	Χωρίς κλινική ή απεικονιστική απόδειξη απομακρυσμένης μετάστασης, αλλά ανιχνεύσιμες εναποθέσεις κυττάρων στο περιφερικό αίμα, τον μυελό των οστών ή σε άλλο μη τοπικό λεμφαδένα, οι οποίες δεν είναι μεγαλύτερου μεγέθους από 0.2 χιλ, σε ασθενή χωρίς συμπτώματα ή σημεία ενδεικτικά μεταστατικής νόσου.
M1	Απομακρυσμένες ανιχνεύσιμες μεταστάσεις, όπως αυτές ορίζονται από τα κλασσικά κλινικά και απεικονιστικά κριτήρια και /ή αποδεικνύονται από την ιστολογική εξέταση με μέγεθος μεγαλύτερο από 0.2 χιλ

Πίνακας 2

Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού

STAGE	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Προβλεπτικοί παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού

Η αναφορά σε προβλεπτικούς παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού συνδέεται με τη χορήγηση της κατάλληλης εξειδικευμένης επικουρικής θεραπείας με το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα και τη λιγότερη τοξικότητα.

Οι καλύτεροι προβλεπτικοί δείκτες στον καρκίνο του μαστού είναι η έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων, η υπερέκφραση του HER2 καθώς και τα γονιδιακά προφίλ του όγκου.

Σχετικά με τους υποδοχείς οιστρογόνων, η έκφρασή τους προβλέπει ασθενείς που θα έχουν θεραπευτικό όφελος από τη χορήγηση ορμονοθεραπείας.

Η υπερέκφραση του HER2 προβλέπει ασθενείς που θα ωφεληθούν από την αντι-HER αγωγή

Τα γονιδιακά προφίλ έκφρασης του όγκου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο που προβλέπει το όφελος των ασθενών από τη λήψη επικουρικής χημειοθεραπείας, όπως τα PAM50, Mamma Print, Oncotype DX. Επιπλέον το Oncotype DX είναι το μοναδικό τεστ που μπορεί επίσης να προβλέψει τη μείωση κινδύνου υποτροπής με τη χορήγηση της επικουρικής χημειοθεραπείας [11].

Προγνωστικοί παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού

Σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν πρώιμο καρκίνο του μαστού τα χαρακτηριστικά των ασθενών, τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και τα χαρακτηριστικά του όγκου χρησιμεύουν για να καθοριστεί η πρόγνωση της νόσου.

- Χαρακτηριστικά ασθενών:
 - η ηλικία <35 ετών σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση και περίοδο ελεύθερη υποτροπής σε σχέση με τις μεγαλύτερες γυναίκες [12]. Επίσης παρατηρείται αυξημένη θνητότητα στις ηλικιωμένες ασθενείς >65 ετών σε σχέση με τις νεότερες [13]

- στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η επικουρική χημειοθεραπεία προκαλεί αμηνόρροια και η απουσία εμμήνου ρύσεως φαίνεται ότι ευνοεί την επιβίωση κυρίως σε ασθενείς με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, συγκριτικά με ασθενείς ιδίου σταδίου αλλά με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς [14]
- καλύτερη πρόγνωση έχουν οι ασθενείς που ανακαλύπτουν τον όγκο κατά την προληπτική μαστογραφία σε σύγκριση με τις ασθενείς που αυτοψηλαφούν τη βλάβη και αυτό σχετίζεται με τη διάγνωση σε πιο πρώιμο στάδιο [15]
- *Χαρακτηριστικά του όγκου [16]*
 - η μέγιστη διάμετρος του όγκου (T)
 - η διήθηση ή όχι των λεμφαδένων της μασχάλης. Ακόμα και ασθενείς με όγκους <2 εκ και διηθημένους λεμφαδένες έχουν χειρότερη πρόγνωση από ασθενείς με αντίστοιχους όγκους χωρίς διηθημένους λεμφαδένες.
 - Η παρουσία ή η απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- *Ιστολογικοί υπότυποι του όγκου*
 - τα πορογενή καρκινώματα του μαστού έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να υποτροπιάσουν εντός των πρώτων 6 ετών παρακολούθησης έναντι των λοβιακών, αντιθέτως τα λοβιακά παρουσιάζουν 56% μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τα πορογενή μετά τα πρώτα 6 έτη παρακολούθησης [17].
 - Άλλοι υπότυποι όπως το βλενωδές, το μυελοειδές, το θηλώδες, το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα και το σωληνώδες έχουν συσχετιστεί με καλή πρόγνωση, ενώ το μικροθηλώδες και το μεταπλαστικό καρκίνωμα έχουν συσχετιστεί χειρότερη πρόγνωση
- *Βαθμός διαφοροποίησης του όγκου [18]*
 - Βαθμός 1(Grade I) = Καλά διαφοροποιημένος (τα κύτταρα φαίνονται πιο όμοια με τα φυσιολογικά και ο όγκος δεν αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς)

- Βαθμού 2 (Grade II) = Μέτρια διαφοροποιημένος (τα κύτταρα μοιάζουν κάπως διαφορετικά από τα φυσιολογικά)
- Βαθμός 3 (Grade III) = Ελάχιστα διαφοροποιημένος (κύτταρα ακανόνιστα, παθολογικά που μπορούν να μεγαλώνουν και να εξαπλώνονται πιο επιθετικά συγκριτικά με άλλους βαθμούς διαφοροποίησης.)

- *Λεμφαγγειακή διήθηση*
 - η παρουσία της σχετίζεται με μεγαλύτερα ποσοστά τοπικής υποτροπής ακόμα και υψηλότερα ποσοστά θανάτου [19]

- *ki67*
 - υψηλές τιμές ki67 συσχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής και χειρότερη επιβίωση [20,21]

- *Ορμονικοί υποδοχείς*
 - η έκφρασή τους σχετίζεται θετικά με ολική επιβίωση (OS: overall survival) και την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS: Disease Free Survival)
 - το ετήσιο ποσοστό υποτροπής των καρκίνων που εκφράζουν υποδοχείς είναι μικρότερο τα πρώτα 5 έτη σε σχέση με τους καρκίνους που δεν εκφράζουν υποδοχείς [22,23].

- *Υπερέκφραση HER2 [24,25,26]*
 - Η υπερέκφραση του HER2 συσχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι διηθημένων λεμφαδένων και ανεξάρτητα του μεγέθους του όγκου (ισχύει ακόμα και για όγκους ≤ 1 εκ).

ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ

Μεταστίνη (Metastin, KiSS-1)

Τις τελευταίες δεκαετίες ταυτοποιήθηκε μια σειρά γονιδίων καταστολής της μετάστασης. Πρόκειται για γονίδια που παρεμποδίζουν τη μετάσταση των πρωτογενών καρκινικών κυττάρων δρώντας σε ένα από τα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας, χωρίς να σχετίζονται με την καρκινογένεση ή την ανάπτυξη του πρωτογενούς όγκου [27].

Ένα από τα γονίδια που κλωνοποιήθηκαν είναι το *KiSS-1/ Μεταστίνη*, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q32-q41. Το γονίδιο αποτελείται από τέσσερα εξόνια (I-IV) εκ των οποίων τα πρώτα δύο πρώτα δε μεταφράζονται ενώ τα άλλα δύο μεταφράζονται μερικώς και κωδικοποιεί μια υδρόφοβη πρωτεΐνη 145-αμινοξέων με ισχυρή αντιμεταστατική δράση [28].

Η απώλεια έκφρασης του γονιδίου *KiSS-1/ Μεταστίνης* συσχετίζεται με συστηματική διασπορά του καρκίνου και κακή πρόγνωση [29]

Η «μεταστίνη» είναι μία ορμόνη της συγκυτιοτροφοβλάστης και ο βασικός της ρόλος είναι η διήθηση και η εμφύτευση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο. Αυξάνεται βαθμιαία στον ορό των εγκύων γυναικών με μέγιστη συγκέντρωση κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης ενώ επιστρέφει στις φυσιολογικές τιμές μετά τον τοκετό και η οποία φαίνεται να ελέγχει τις διηθητικές και μεταναστευτικές (μεταστατικές) δυνατότητες των τροφοβλαστικών κυττάρων. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *KiSS-1* ενώ ο μεμβρανικός υποδοχέας της είναι ο *hOT7T175 (KiSS-1R)*.

Αναφέρεται ότι ο υποδοχέας της μεταστίνης (*KiSS-1R*) εκφράζεται έντονα στον πλακούντα, την υπόφυση, τους όρχεις, το πάγκρεας και στην νωτιαία χορδή και ότι η ενδοφλέβια χορήγηση «μεταστίνης» διεγείρει την απελευθέρωση ωκυτοκίνης στους αρουραίους, γεγονός που δείχνει ότι η «μεταστίνη» παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκρινική λειτουργία [30,31,32].

Τόσο το γονίδιο όσο και ο υποδοχέας εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα γεγονός που αποδεικνύει ότι η «μεταστίνη» κατέχει φυσιολογικό ρόλο στην ανθρώπινη κύηση. Επίσης ενδέχεται να έχει διάφορες άλλες

βιολογικές δραστηριότητες πέραν της αντι-μεταστατικής της ιδιότητας όπως της διέγερσης απελευθέρωσης ωκυτοκίνης

Τα επίπεδα της «μεταστίνης» στο πλάσμα μετά τον τοκετό παραμένουν 6 φορές υψηλότερα από εκείνα των μη-εγκυμονουσών γυναικών. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην βραδεία κάθαρση της «μεταστίνης». Χαμηλά επίπεδα μεταστίνης κυκλοφορούν και στο πλάσμα των μη-εγκυμονουσών γυναικών και αποδίδεται στη παραγωγή της από τα όργανα που προαναφέρθηκαν.

Η μεταστίνη όμως φαίνεται ότι συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές στον ρόλο της μεταστίνης στην καρκινογένεση τόσο *in-vitro* όσο και *in-vivo* καθώς και στις αντιμεταστατικές της ικανότητες.

Έχει περιγραφεί ότι η «μεταστίνη» αναστέλλει *in vitro* την χημειοταξία, τη διήθηση, την κινητικότητα και τον πολλαπλασιασμό των hOT7T175-επιμολυσμένων ωοθηκικών κυττάρων CHO [33] ενώ φαίνεται ότι μειώνει τις πνευμονικές μεταστάσεις από hOT7T175-επιμολυσμένων B16-BL6 μελανώματος *in vivo* [34,35,36].

Δημοσιεύσεις αναφέρουν την αντιμεταστατική ιδιότητα της μεταστίνης αποδεικνύοντας την υπερέκφραση του υποδοχέα της σε θηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδή αδένου και ενεργοποίηση της MAP κινάσης σε ARO θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα [37].

Με τις μεθόδους του υβριδισμού *in situ* και των μικροσυστοιχείων (microarrays) βρέθηκε απώλεια των γονιδίου KiSS1 σε διηθητικούς καρκίνους ουροδόχου κύστης εύρημα που συσχετίστηκε με το ιστοπαθολογικό στάδιο και την μείωση της επιβίωσης των ασθενών [38].

Η έκφραση του γονιδίου KiSS-1 έχει μελετηθεί και έχει συσχετιστεί με τη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων σε ποικίλη είδη καρκίνου πέρα των προαναφερθέντων, όπως στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο [39], στο γαστρικό καρκίνο [40], στον καρκίνο του ενδομητρίου [41], στον καρκίνο του παγκρέατος [42] αλλά και στον καρκίνο του μαστού όπου θα μελετηθεί ιδιαίτερα στο παρόν ερευνητικό έργο.

Παρατηρήθηκε η καταστολή της καρκινικής σειράς MDA-435 από ανθρώπινο καρκίνωμα μαστού μετά από επιμόλυνση των κυττάρων με το γονίδιο KiSS-1 χωρίς καταστολή της καρκινογένεσης [43].

Επίσης έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν τα επίπεδα έκφρασης του *KiSS-1* με την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Βρέθηκε υπερέκφραση του *KiSS-1* σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του μαστού με επιθετική συμπεριφορά, χαμηλή διαφοροποίηση και αυξημένη θνησιμότητα. Αντιθέτως παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του *KiSS-1* σε ασθενείς με καλή έκβαση της νόσου τους [44].

Μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του γονιδίου *KiSS-1* στον καρκίνο του μαστού. Ενώ είναι γνωστό για τις αντιμεταστατικές του ιδιότητες σε άλλες μορφές καρκίνου, η έκφραση του είναι υψηλότερη στον καρκίνο του μαστού σε σχέση με την έκφρασή του στον φυσιολογικό μαζικό ιστό [45].

Αντιστοίχως η απουσία έκφρασης του *KISS-1* στον καρκίνο του μαστού φαίνεται να σχετίζεται με την άμεση επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων *AP-2 α* και *Sp1* στα καρκινικά κύτταρα του μαστού που το εκφράζουν. Έτσι με την απώλεια έκφρασης του γονιδίου το *AP-2 α* και *Sp1* μεταγραφικό σύμπλοκο επιτυγχάνει την καρκινογένεση και την εξάπλωση του καρκίνου [46].

Σε ασθενείς που εμφανίζουν εγκεφαλικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού αν και το *KISS-1* εκφράζεται αρκετά στον πρωτοπαθή τους όγκο, εκφράζεται πολύ λιγότερο στις εγκεφαλικές τους μεταστάσεις. Αυτό θα μπορούσε αποδείξει ότι η απώλεια έκφρασης του *KiSS-1* συσχετίζεται με τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων και τη δημιουργία μεταστατικών εστιών, όπως οι εγκεφαλικές μεταστάσεις [47,48].

Ο ρόλος του γονιδίου της μεταστίνης στον καρκίνο του μαστού ακόμα φαίνεται να μην έχει πλήρως διαλευκανθεί αφού από τις διάφορες μελέτες φαίνεται ότι συμμετέχει στους μηχανισμούς της αγγειογένεσης, στην αυτοφαγία, στην απόπτωση άλλοτε εμποδίζοντας και άλλοτε προωθώντας τη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων [49].

Η έκφραση της διαφέρει στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του καρκίνου και για αυτό θα μπορούσε να αποτελεί βιοδείκτη για την ταυτοποίηση όγκων με υψηλή μεταστατική δυναμική [50,51].

Γλυκοδελίνη (Glycodelin, PAEP)

Η γλυκοδελίνη (PAEP) είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη 28 kDa, η οποία αποτελείται από επτά εξόνια και έχει αντισυλληπτικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Αποδείχθηκε ότι βοηθά την οργάνωση του αδενικού επιθηλίου, ενώ καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του όγκου [52, 53, 54].

Παράγεται κατά την ωοθηλακιογένεση και αυξάνει τη συγκέντρωση της στον ορό των γυναικών στο παράθυρο της εμφύτευσης και στο 1^ο 3μηνο της κύησης. Συντίθεται στο ενδομήτριο και στο φθαρτό κατά την κύηση και ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ομφάλιου λώρου. Είναι μία ορμονοεξαρτώμενη πρωτεΐνη που εμποδίζει την ένωση ωαρίου-σπέρματος στο 1^ο μισό του κύκλου και έχει ανοσοτροποποιητικό ρόλο. Ομοίως όπως συμβαίνει και με τη β-HCG, καταστέλλει την ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω του υποδοχέα της τυροσινικής φωσφατάσης CD 45 [55].

Ανευρίσκεται σε όγκους των αναπαραγωγικών οργάνων και στον ορό γυναικών με γυναικολογικό καρκίνο, καθώς και σε καρκίνους που δε σχετίζονται με το αναπαραγωγικό σύστημα όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και τα διφασικά συνοβιακά σαρκώματα [56, 57, 58].

Από μελέτες *in vivo* η γλυκοδελίνη φαίνεται ότι ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στον καρκίνο ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, αυξάνοντας την έκφραση άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και μειώνοντας την έκφραση ογκογονιδίων, συνεισφέροντας στην καλύτερη διαφοροποίηση των όγκων και στην ευνοϊκότερη πρόγνωση αυτών [59].

Ανιχνεύεται στα αιμοφόρα αγγεία των όγκων και όπως φαίνεται ασκεί την αγγειογενετική της δράση μέσω του VEGF και VEGF Receptor [60].

Η γλυκοδελίνη εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα του μαστού ενώ στον καρκίνο του μαστού ανιχνεύεται σε μεγάλη ποσότητα [61, 62].

Επιβιωτίνη (Survivin, BIRC5)

Η επιβιωτίνη (survivin, BIRC5) είναι μια πρωτεΐνη η οποία συντελεί στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και εμπλέκεται αναστέλλοντας την απόπτωση και

ρυθμίζοντας την κυτταρική διαίρεση. Εμπλέκεται σε μηχανισμούς υπεύθυνους για την ιστική βλάβη και την επούλωση.

Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q25 και αποτελείται από τέσσερα εξόνια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 142-αμινοξέων [63].

Κατά την εμβρυογένεση, εκφράζεται στους πνεύμονες, στην καρδιά, στους νεφρούς και τον γαστρεντερικό σωλήνα καθώς επίσης και σε εμβρυϊκούς ιστούς, όπου παρατηρείται απόπτωση (επιθήλιο, ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος, μυελός και θύμος αδένας). Δεν έχει βρεθεί σε φυσιολογικούς ιστούς του ενήλικα παρά μόνο σε συνεχώς αναπαραγόμενους ιστούς όπως ο εντερικός βλεννογόνος, ο μυελός των οστών και το δέρμα [64, 65, 66]. Αντιθέτως αυξάνει την έκφραση της κατά τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης. Η υψηλή έκφραση της επιβιωτίνης στους όγκους συσχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά, μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και μικρότερη επιβίωση [67, 68, 69].

Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε πληθώρα καρκίνων όπως σε καρκίνους του γαστρεντερικού, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στα σαρκώματα μαλακών μορίων, στον καρκίνο του πνεύμονα, στα λεμφώματα, στον καρκίνο του ενδομητρίου αλλά και στον καρκίνο του μαστού [70, 71, 72, 73, 74].

Η έκφραση της επιβιωτίνης αυξάνεται συχνά στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα η παραπάνω έκφραση αυξάνεται σταδιακά κατά τη μετάβαση από το φυσιολογικό μαζικό αδένια προς τον καρκινικό ιστό και τους διηθημένους λεμφαδένες.

Επίσης, όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες, η υπερέκφραση της επιβιωτίνης σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και μάλιστα σε φάρμακα ιδιαίτεως δραστικά και χρήσιμα για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, όπως και στην ακτινοθεραπεία. Τα παραπάνω αναφέρονται στη βιβλιογραφία κυρίως για περιπτώσεις καρκίνου μαστού με υπερέκφραση του HER-2 [75, 76, 77.78].

Περιγραφή Σημασίας και Αναμενόμενη Συμβολή του Ερευνητικού Έργου

- Μελέτη του ποσοτικού και ποιοτικού βαθμού έκφρασης των μορίων αυτών
- Συσχέτιση του ρόλου των ρυθμιστικών αυτών εμβρυϊκών μορίων με την μεταστατική διαδικασία
- Εκτίμηση της ενδεχόμενης αξίας τους ως καρκινικοί δείκτες
- Διερεύνηση του ρόλου των μορίων αυτών ως προγνωστικοί ή και προβλεπτικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού

Αναλυτικότερα ο σκοπός του παρόντος ερευνητικού έργου ήταν:

A) Η μοριακή μελέτη του πεπτιδίου της «μεταστίνης» (metastin ή KiSS-1), καθώς και του υποδοχέα της hOT7T1T75 (GPR 54 ή KiSS1R) και του γονιδίου της KiSS-1 στον καρκίνο του μαστού, στοχεύοντας στην αναζήτηση της παρουσίας μεταλλάξεων καθώς και στην πιθανή βιολογική δράση του εμβρυϊκού αυτού γονιδίου στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ειδικότερα, μελετάται ο βαθμός έκφρασης του εμβρυϊκού μορίου της μεταστίνης στον καρκίνο του μαστού, καθώς επίσης και η ύπαρξη πιθανών μεταλλάξεων του γονιδίου KiSS-1, εκτιμώντας την ενδεχόμενη αξία αυτού ως καρκινικού δείκτη.

Επίσης αποσκοπεί στη διερεύνηση του ρόλου του ως προγνωστικού ή και προβλεπτικού παράγοντα στον καρκίνο του μαστού και στη συσχέτιση της έκφρασής του με κλινοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά, μελετώντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του σε μια ομάδα 272 γυναικών με πρώιμο αδενοκαρκίνωμα μαστού οι οποίες είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του όγκου και είχαν λάβει επικουρική χημειοθεραπεία στο πλαίσιο κλινικής δοκιμής.

B) Για την επιβιωτική και τη γλυκοδελίνη υπάρχουν αντιφατικές αναφορές σχετικά με την έκφραση αυτών των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου σε κακοήθεις ιστούς καθώς και την προγνωστική χρησιμότητά τους στην έκβαση του ασθενούς.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσουμε τη μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων αυτών σε μια ομάδα 272 γυναικών με πρώιμο

αδενοκαρκίνωμα μαστού οι οποίες είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του όγκου και είχαν λάβει επικουρική χημειοθεραπεία στο πλαίσιο κλινικής δοκιμής.

Αναλύσαμε την προγνωστική τους σημασία και συσχετίσαμε την έκφρασή τους με κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του καρκίνου του μαστού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: HeLa, MCF-7, A549 και Jurkat, οι οποίες προέρχονται από την Αμερικανική Συλλογή Κυττάρων (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) και τα κύτταρα WI-38T τα οποία προέρχονται από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυττάρων (European Collection of Cell Cultures). Όλοι οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο.

Η κυτταρική σειρά HeLa είναι μια ανθρώπινη αθανατοποιημένη επιθηλιακή κυτταρική σειρά. Προέρχεται από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας που ελήφθησαν από την Αφροαμερικανή Henrietta Lacks, μια 31χρονη μητέρα πέντε τέκνων που πέθανε από καρκίνο το 1951. Τα κύτταρα HeLa είναι θετικά για HPV.

Η κυτταρική σειρά MCF-7, είναι μια ανθρώπινη κυτταρική επιθηλιακή σειρά αδενοκαρκινώματος του μαστού λευκής καυκάσιας γυναίκας 69 ετών.

Η κυτταρική σειρά A549 είναι μια ανθρώπινη κυτταρική επιθηλιακή σειρά αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα λευκού καυκάσιου ανδρός 58 ετών.

Η κυτταρική σειρά WI-38T είναι σειρά από ινοβλάστες ανθρώπου που προέρχονται από τους εμβρυϊκούς ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονα WI-38, οι οποίες αθανατοποιήθηκαν με το μεγάλο T-αντιγόνο του DNA ιού SV40 (SV40 T antigen).

Η κυτταρική σειρά Jurkat είναι μια ανθρώπινη T-λεμφοκυτταρική (λεμφοβλαστοειδής) σειρά που προέρχεται από ένα νεαρό άνδρα, ηλικίας 14 ετών.

Ενώ τα κύτταρα HeLa, MCF-7, A549, και WI-38T προσκολλώνται σε τρυβλία καλλιέργειας και ανακαλλιεργούνται, τα κύτταρα Jurkat καλλιεργούνται ως εναιωρήματα.

Οι κυτταρικές σειρές HeLa, MCF-7, A549, και WI-38T καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium) με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (4500mg/L) (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Sigma) και η κυτταρική σειρά Jurkat καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI-

1640 (Sigma). Τα θρεπτικά υλικά εμπλουτίστηκαν με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum; FCS) (Gibco), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη (Biowest) και 1.4mM-γλουταμίνη (Biowest). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO₂.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα καλλιεργούμενα κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (confluent) εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Gibco).

Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂ για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο.

Μετά την επώαση, προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε νέα τρυβλία, σε επιθυμητές αραιώσεις, σε αναλογίες 1:2, 1:4 ή 1:8 και συμπληρώθηκε θρεπτικό υλικό μέχρι τα 10 ml.

Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO₂, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων ως εναιωρήματα είναι απλούστερη και διεξάγεται σε αραιώση 1:10 σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό.

Διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε ημι-πλήρες ταπήτιο (semi-confluent) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη-EDTA. Στη συνέχεια προστέθηκε σε διάλυμα PBS και τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml.

Για τα κύτταρα που καλλιεργούνται ως εναιωρήματα, το θρεπτικό υλικό (10 ml) που περιέχει τα κύτταρα τοποθετείται σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml.

Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1500 στροφές και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα FCS που περιείχε 10% διμέθυλο-

σουλφοξειδίο (DMSO) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml. Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -80°C ώστε να παγώσουν σταδιακά ($1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$). Την επόμενη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο (-196°C) για μακροπρόθεσμη διατήρηση.

Για την ανασύστασή τους, οι αμπούλες από το υγρό άζωτο τοποθετήθηκαν για περίπου 1-2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα και το περιεχόμενο μεταβιβάστηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 100 mm όπου προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , 5% CO_2 .

Δείγματα καρκίνου μαστού

Συλλέχτηκε ιστός από βιοπτικά δείγματα όγκων μαστού, μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin embedded; FFPE).

Τα παραπάνω δείγματα προέρχονται από 50 ασθενείς με πρώιμο αδενοκαρκίνωμα μαστού, σταδίου I-IIIΑ που διαγνώστηκαν και έλαβαν αγωγή στο Ογκολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από τον Ιανουάριο του 2002 έως τον Νοέμβριο του 2004.

Από την παραπάνω ομάδα ασθενών ελήφθη βιοπτικό υλικό για εξαγωγή DNA και ανοσοϊστοχημική μελέτη σε τομές παραφίνης

Υπάρχει επίσης η ομάδα ελέγχου, η οποία αποτελείται από 50 υγιείς γυναίκες, από τις οποίες εξήχθη γονιδιωματικό DNA από δείγμα περιφερικού αίματος με την παρακάτω μεθοδολογία.

Συνεργάζονται για το σκοπό αυτό η *Ογκολογική κλινική* του ΠΓΝ Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ), η *Μονάδα Μοριακής Βιολογίας* του ΠΓΝΙ, το *Εργαστήριο Αιματολογίας* του ΠΓΝΙ καθώς και το *Εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομίας* του ΠΓΝΙ.

Η μελέτη έχει λάβει έγκριση από την επιτροπή ηθικής δεοντολογίας του ΠΓΝ Ιωαννίνων .

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3

	N=50 (%)
Ηλικία (μέσος όρος)	55 έτη
Στάδιο	
I	4 (8%)
II	18 (36%)
III	28 (56%)
Αριθμός Λεμφαδένων	
Αρνητικό	18 (36%)
1-3	11 (22%)
≥4	21 (42%)
Βαθμός διαφοροποίησης	
1-2	33 (67%)
3-4	17 (33%)
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων	
Αρνητική	15 (31%)
Θετική	35 (69%)

Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει:

1. Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα για την έκφραση του KiSS-1 .
2. Εξαγωγή DNA από τομές παραφίνης
3. Ανάλυση του γενωμικού DNA με τη μέθοδο SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism) για ανίχνευση και ανάλυση της αλληλουχίας (sequencing) για ταυτοποίηση των μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στα γονίδια KiSS-1 και KiSS-1Receptor.

Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός

Παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές πάχους 5 μικρομέτρων (μm) από τα μπλοκ παραφίνης και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Αυτές οι τομές χρησιμοποιήθηκαν για ιστοπαθολογική διάγνωση με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και για την αξιολόγηση της έκφρασης πρωτεΐνης άγριου τύπου KiSS-1 με έμμεση ανοσοϊστοχημική χρώση με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για τη μεταστίνη (polyclonal rabbit anti-KiSS1 IgG antibody) συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη-βιοτίνη (FL-145, Santa Cruz Biotechnologies, US) σε αραιώση 1:300 και χρήση του συμπλόκου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (Labvision Corp, Fremont, CA) και του χρωμογόνου διαμινοβενζιδίνη (diaminobenzidine). Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για τη μεταστίνη (polyclonal rabbit anti-KiSS-1 IgG antibody) είχε παρασκευασθεί με τη χρήση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης μεταστίνης πλήρους μεγέθους 1-145 αμινοξέων.

Η χρώση αναλύθηκε με ένα kit ανίχνευσης σχεδιασμένο για το αυτοματοποιημένο σύστημα ανοσοϊστοχημικής (immunohistochemical; IHC) χρώσης (Envision Detection Kit, Peroxidase/DAB, Dako K5007). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της μεταστίνης/KiSS-1 εκτιμήθηκε ημι-ποσοτικά με βάση την ένταση της χρώσης (0, +1, +2, +3) και το ποσοστό (%) των θετικών

καρκινικών κυττάρων (0-100%). Η ένταση της χρώσης χαρακτηρίζεται ως αρνητική, ασθενής (+1), μεσαία (+2) με βάση την παρουσία διακριτής καφέ χρώσης της μεμβράνης/κυτταροπλάσματος, ή ισχυρής (+3) όταν ανιχνεύεται έντονη διακριτή καφέ χρώση της μεμβράνης/κυτταροπλάσματος. Ο συνολικός βαθμός, 0 έως 300, υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το βαθμό της έντασης με το ποσοστό των θετικών καρκινικών κυττάρων. Ο συνολικός βαθμός IHC στη συνέχεια κατατάσσεται ως αρνητικός (0-10), ασθενής θετικός (11-50), μέτρια θετικός (51-150) ή ισχυρά θετικός (151-300).

Μοριακές Τεχνικές

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές

Προκειμένου να εξεταστεί η γενετική ακεραιότητα του γονιδίου *KiSS-1* στις 5 διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR (polymerase chain reaction) και αλληλούχιση ολόκληρης της αλληλουχίας των εξονίων III-IV, η οποία αντιστοιχεί στη μεταφραζόμενη περιοχή και κωδικοποιείται από 438 bp.

Το εξόνιο IV το οποίο αποτελείται από 335 βάσεις οι οποίες μεταφράζονται και 121 μη-μεταφραζόμενες βάσεις, χωρίστηκε για ανάλυση σε δύο θραύσματα (IVa και IVb), προκειμένου να επιτευχθεί με υψηλή ακρίβεια η ανίχνευση και η αλληλούχιση.

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τις κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συνόλου αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης DNA από κύτταρα και ιστούς το QIAGEN DNEasy TM (Westburg, Leusden, Ολλανδία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αντιδράσεις PCR

Οι αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης (polymerase chain reaction; PCR) πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μ l οι οποίες περιείχαν 50ng γονιδιωματικού DNA, 10X ρυθμιστικού διαλύματος PCR, 1,5-2,5 mM $MgCl_2$, όλα τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, *dNTP*) το καθένα σε συγκέντρωση 0,2 μ M, τους δύο εκκινητές (συνθετικά λογονουκλεοτίδια 20 βάσεων) (βλέπε παρακάτω) σε συγκέντρωση 0,2 μ M και 1 μονάδα (unit) της TaqDNA πολυμεράσης (Taq DNA Polymerase) (Taq Core Kit 10, Q-BIOgene). Οι συνθήκες των θερμικών κύκλων της PCR ήταν ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA (DNA denaturation step) στους 94°C για 5 λεπτά, και στη συνέχεια από 35 κύκλους αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 5 λεπτά, επαναδιάταξης (annealing) στους 55°C με 61°C για 1 λεπτό, επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα, και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 λεπτά, σε μια συσκευή PCR (PTC 200 Peltier thermal Cycler, MJ Research USA).

Οι ακόλουθοι εκκινητές (συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια για PCR), (Invitrogen-Life Technologies Merelbeke, Βέλγιο), χρησιμοποιήθηκαν για την επαύξηση (αναπαραγωγή) των προϊόντων PCR:

- Εξόνιο 3 του KiSS-1

Εμπρόσθιος εκκινητής (Forward primer): 5'-CTC AGC CTC AAG GCA
CTT CT-3'

Αντίστροφος εκκινητής (Reverse primer): 5'-CAC TCC TTT CCC CAG
AGG AT-3'

- Εξόνιο 4a του KiSS-1

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-TCC TAG GCC AGC AGC TAG AA-3'

Αντίστροφος εκκινητής: 5'-CCA GTT GTA GTT CGG CAG GT-3'

- Εξόνιο 4b του KiSS-1

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'-ACC TGC CGA ACT ACA ACT GG-3'

Αντίστροφος εκκινητής: 5'-TCT TTT ATT GCC TCG GGT TG-3'

Οι συνθετικοί εκκινητές για PCR είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία-στόχο που πρόκειται να αναπαραχθεί και να πολλαπλασιαστεί αλλά δεν είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους για να αποφευχθεί ο αυτό-υβριδισμός τους.

Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *KiSS-1* σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές

Μια ποσότητα 10 μl των προϊόντων της PCR αναμίχθηκε με 10 μl αποδιατακτικού ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (denaturin gloading buffer) που περιείχε 98% φορμαμίδιο, 0.005% κυανού της ξυλόλης και μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα δείγματα/προϊόντα DNA της PCR αποδιατάχθηκαν με θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά, διατηρήθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε μια μη-αποδιατακτικό πήκτωμα (ή πηκτική) 10% πολυακρυλαμιδίου που περιείχε 10% γλυκερόλη, και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση στους 4°C σε 12 W για 16-20 ώρες.

Τα προϊόντα της PCR που εμφάνισαν ένα ανώμαλο πρότυπο διάταξης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Stranded Conformational Polymorphism; SSCP) πολλαπλασιάστηκαν με PCR.

Πριν την αλληλούχιση τους, αυτά τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 2% (β/ο), αγαρόζης και απομονώθηκαν με τη χρήση ενός συνόλου αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης DNA από πηκτές (QIAquick gel extraction kit; QIAGEN). Στη συνέχεια τα απομονωμένα προϊόντα DNA της PCR αλληλουχήθηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις είτε με τη χρήση του BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Forester City, CA, USA) ή ανεξάρτητα (MWG The Genomic Company, Ebersberg Germany).

Μοριακή ανάλυση για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *KiSS-1* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού

Για όλα τα δείγματα των όγκων που περιλαμβάνονται στην ανάλυση, ο αριθμός των κακοηθών κυττάρων αντιπροσώπευε τουλάχιστον το 75% όλων των εμπύρηνων κυττάρων όπως αξιολογήθηκε με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Τομές 10-μm από αυτά τα δείγματα ιστών αποξέστηκαν από την αντικειμενοφόρο πλάκα για την απομόνωση DNA προκειμένου να αναλυθούν για μεταλλάξεις στα εξόνια III, IVa και IVb.

Γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από 50 δείγματα καρκίνου του μαστού μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη (FPPE), καθώς επίσης από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος 50 υγιών γυναικών μη συσχετιζόμενων με τις ασθενείς αλλά και 10 ασθενών από την αρχική ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συνόλου αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης DNA από κύτταρα και ιστούς QIAGEN DNEasy TM (Westburg, Leusden, Ολλανδία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η γενετική ανάλυση του γονιδίου *KiSS-1* πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) των εξονίων III και IV, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των μεταλλάξεων με την τεχνική του πολυμορφισμού διάταξης μονήρους (μονόκλωνης) αλυσίδας (Single Stranded Conformational Polymorphism; SSCP) και στη συνέχεια με η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR που απομονώθηκαν από τους 50 όγκους του μαστού, τα 50 δείγματα υγιών γυναικών και από τις 10 ασθενείς που ανήκαν στην αρχική ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Οι εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια της PCR) και οι διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική του SSCP και της αλληλούχισης περιγράφηκαν παραπάνω στα πειράματα με τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Η αλληλούχιση των εξονίων III / IV του γονιδίου *KiSS-1* πραγματοποιήθηκε επίσης και από την Macrogen Inc, Σεούλ, Κορέα, για ανεξάρτητη εξωτερική επικύρωση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης του Εργαστηρίου γονιδιωματικής ανάλυσης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι εκκινητές για τις αντιδράσεις PCR που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφηκαν παραπάνω.

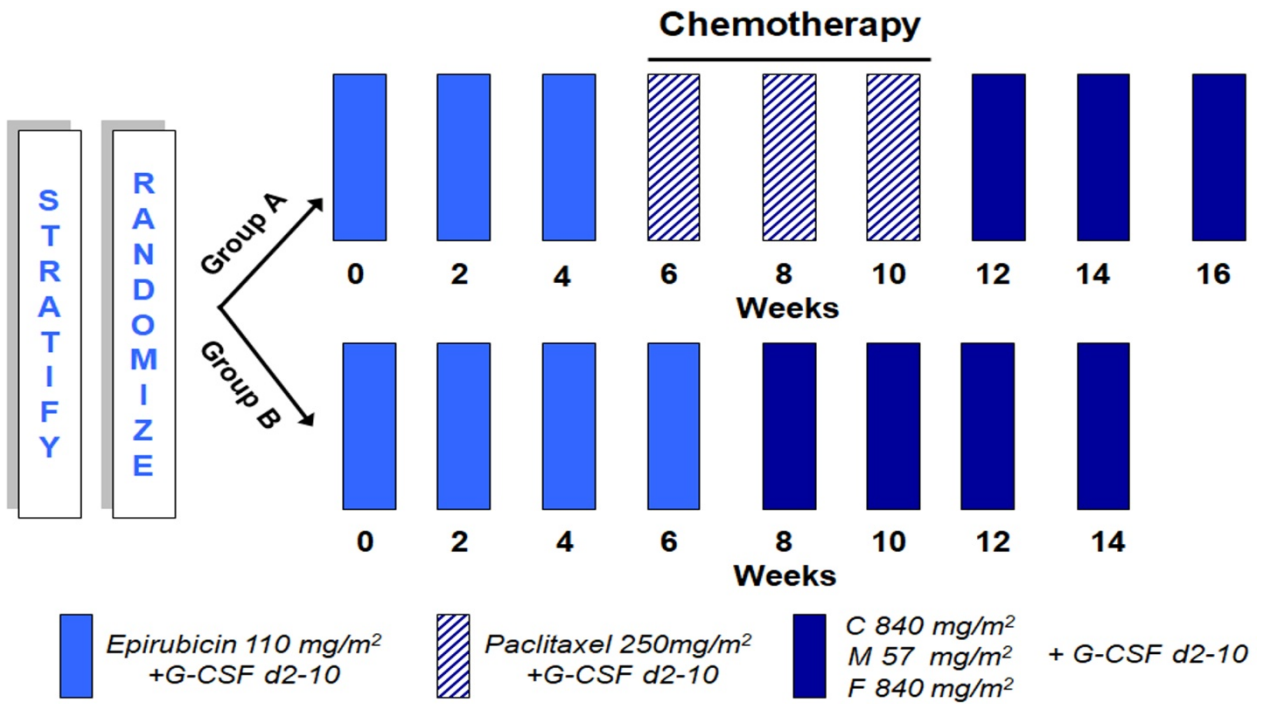
Διεύρυνση της ομάδας των ασθενών: Μοριακή ανάλυση της μεταγραφής των γονιδίων της μεταστίνης, της επιβιωτίνης και της γλυκοδελίνης

Ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού

Για τη μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου μεταστίνης, της γλυκοδελίνης και της επιβιωτίνης απομονώθηκε mRNA από μονιμοποιημένα δείγματα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη FFPE (formalin-fixed paraffin embedded) βιοψίας όγκων μαστού από 272 ασθενείς. Πρόκειται για ασθενείς που διαγνώστηκαν με πρώιμο στάδιο καρκίνο του μαστού (στάδια II-III).

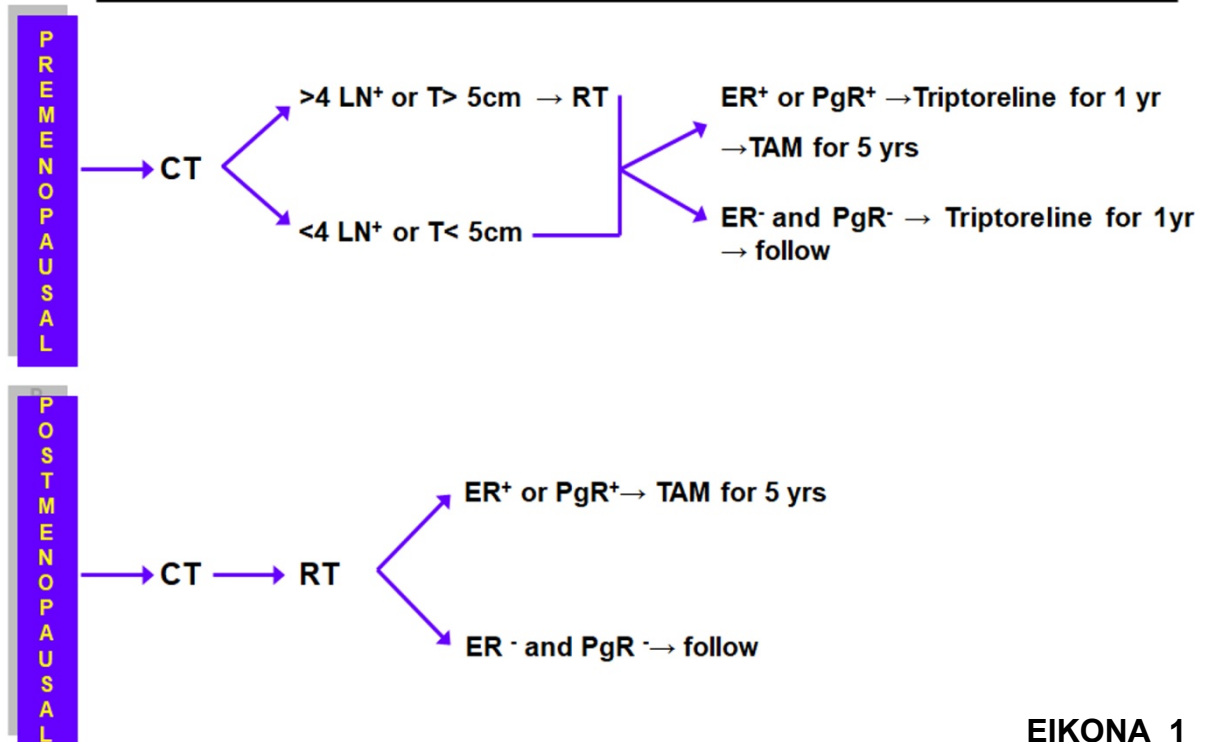
Οι παραπάνω ασθενείς είχαν συμμετάσχει σε μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης III που έλαβε χώρα στα συμμετάσχοντα κέντρα της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας (HeCOG) από τον Ιούνιο του 1997 έως τον Νοέμβριο του 2000. Η δοκιμή αξιολόγησε τη διαδοχική εντατικοποιημένη (dose-dense) χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας με επιρουμπικίνη, κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη, 5-φθοροουρακίλη (E-CMF) με ή χωρίς την προσθήκη πακλιταξέλης (ET-CMF) (**Εικόνα 1**), [79].

Όλοι οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε φυσική εξέταση, πλήρες αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, ακτινογραφία θώρακος, υπερηχογράφημα κοιλίας και ακολούθως σε τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή ή χειρουργική επέμβαση συντήρησης μαστού με λεμφαδενικό καθαρισμό μασχάλης επιπέδου I / II. Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν ανά διαστήματα 4 μηνών και τα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά των όγκων τους, καθώς και τα δεδομένα υποτροπής / επιβίωσης καταγράφηκαν σε ηλεκτρονική μορφή. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στον **Πίνακα 4** ενώ στον **Πίνακα 5** συγκρίνονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών των δύο ομάδων του ερευνητικού έργου



- STRATIFICATION:**
- Menopausal status
 - ER or PR status
 - Number of positive nodes

Post-chemotherapy Treatment



Πίνακας 4. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών

N=272	Αριθμός ασθενών (%)
Ηλικία	
Μέσος όρος	51 έτη
Εύρος	22-76
Εμμηνόπαυση	
Προ-εμμηνόπαυσιακές	139 (51%)
Μετά-εμμηνόπαυσιακές	133 (49%)
Μέγεθος όγκου	
≤2 cm	83 (30%)
2-5 cm	136 (50%)
>5 cm	53 (20%)
Αριθμός λεμφαδένων	
Αρνητικοί	4 (1%)
1-3	59 (22%)
≥4	209 (77%)
Βαθμός διαφοροποίησης	
1-2	133 (49%)
3-4	138 (51%)
Άγνωστο	1
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων	
Αρνητική	58 (21%)
Θετική	210 (77%)
Άγνωστη	4 (2%)

Πίνακας 5. Συγκριτικά τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών των 2 ομάδων

Χαρακτηριστικά	Αρχική ομάδα (N=50) (%)	Ομάδα επικύρωσης (N=272) (%)
Ηλικία (μέσος όρος)	55 έτη	50 έτη
Στάδιο (Παθολογοανατομικό)		
I	8%	0%
II	36%	24%
III	56%	76%
Αριθμός λεμφαδένων		
Αρνητικοί	36%	1%
1-3	22%	23%
≥4	42%	76%
Βαθμός		
1-2	67%	49%
3-4	33%	51%
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων		
Αρνητική	31%	21%
Θετική	69%	79%

Απομόνωση mRNA από μονιμοποιημένους ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού

Η απομόνωση mRNA του *KiSS-1*, της επιβιωτίνης και της γλυκοδελίνης από τους ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμαλίνη και ενσωματωμένους σε παραφίνη (FFPE) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (πειραματική μέθοδος από Bayer Health Care Diagnostics).

Συνοπτικά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με ιστούς FFPE αποπαραφιντοποιήθηκαν σε ξυλόλη και αιθανόλη. Το ίζημα επλένεται με αιθανόλη και ξηραίνεται στους 55°C για 10 λεπτά, στη συνέχεια λύεται και πρωτεϊνοποιείται όλη τη νύκτα στους 55°C με ανακίνηση. Μετά την προσθήκη ενός δεσμευτικού ρυθμιστικού διαλύματος και των μαγνητικών σωματιδίων (Bayer Health Care Diagnostics Research, Leverkusen, Germany), τα νουκλεϊκά οξέα δεσμεύονται στα σωματίδια εντός 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

Το υπερκείμενο αφαιρείται σε μια μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια μπορούν να εκπλυθούν αρκετές φορές με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Μετά την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης και επώασης για 10 λεπτά στους 70°C, το υπερκείμενο απομακρύνεται σε μαγνητική βάση χωρίς να αγγιχθούν τα σφαιρίδια. Μετά από φυσιολογική επεξεργασία με DNάση I για 30 λεπτά στους 37°C και απενεργοποίηση του ενζύμου, το διάλυμα χρησιμοποιείται για αντίστροφη μεταγραφή PCR (RT-PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εντοπίζονται σε αμετάφραστες περιοχές (Un Translated Region; UTR) των εξονίων I και II του γονιδίου *KiSS1*:

Εμπρόσθιος εκκινητής *KiSS-1* S6R 5' UTR εξονίου I:

5'-AGGTGGTCTCGTCACCTCAGA-3', και

Αντίστροφος εκκινητής *KiSS-1* S6R 5' UTR εξονίου II:

5'-TGAGAAGAGGCAGGTCCTAGAAGT-3'

ενώ ο ειδικός ανιχνευτής RNA που εκτείνεται στο όριο εξονίου I / II ήταν:

KiSS-1 S6R 5' UTR CCAGGCCAGGACTGAGGCAAGCCTCAA.

Για την ανίχνευση της έκφρασης της επιβιωτίνης (BIRC5) και της γλυκοδελίνης (PAEP) χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω σημασμένοι FAM-TAMRA εκκινητές :

BIRC5AGC: CAGATGACGACCCCATAGAGGAACA

PAEPCAA: CTATACGGTGGCGAACGAGGCC

Εμπρόσθιος εκκινητής (BIRC5-F): CCCAGTGTTTCTTCTGCTTCAAG,

Αντίστροφος εκκινητής (BIRC5-R): CAACCGGACGAATGCTTTTT

Εμπρόσθιος εκκινητής (PAEP-F): TGGGAATCCAAAGAAGTTCAAGA

Αντίστροφος εκκινητής (PAEP-R): CAGGAAATTGTCGTAGTCAGTATCGA

Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA ελέγχθηκε μετρώντας την απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm. Το καθαρό RNA έχει αναλογία A260 / A280 1,8-2,0. Η μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου αξιολογήθηκε με ποσοτική πραγματικού χρόνου Taqman™ RT-PCR. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 40 κύκλους για τον πολλαπλασιασμό του DNA και χρησιμοποιήθηκαν τα διαχειριστικά γονίδια (housekeeping genes) GAPDH και RPL37A ως γονίδια καθορισμού του ορίου των 28 κύκλων (cycle threshold; CT) της PCR. Υπολογίστηκε και κανονικοποιήθηκε η έκφραση του μεταστατίνης (KiSS1), επιβιωτίνης (BIRC5) και γλυκοδελίνης (PAEP) μετά από 40-CT με βάση την έκφραση των διαχειριστικών γονιδίων, προκειμένου να αναλυθούν τα επίπεδα μεταγραφής.

Τα αποτελέσματα κατηγοριοποιήθηκαν ως μη έκφραση mRNA όταν η κανονικοποιημένη βαθμολογία ήταν αρνητική ή μηδέν και ως παρουσία έκφρασης mRNA όταν η βαθμολογία ήταν υψηλότερη από το μηδέν για τα γονίδια του KiSS-1 και της γλυκοδελίνης. Ενώ όσο αφορά στην επιβιωτίνη απουσία έκφρασης mRNA θεωρήθηκε όταν η κανονικοποιημένη βαθμολογία ήταν <0.1.

Βιοπληροφορική ανάλυση

Η ανάλυση της έκφρασης της μεταστατίνης *KiSS-1*, του μεμβρανικού υποδοχέα της *hOT7T175* (*Kiss-1R*) και της επιβιωτίνης (*survivin*, *BIRC5*) διερευνήθηκε και επιβεβαιώθηκε στις βάσεις δεδομένων Genotype-Tissue Expression (GTEx) [80], Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) [81] και COSMIC. Όπου με τη βοήθεια της επιστήμης της στατιστικής είναι εφικτό να μελετηθεί η ιστοειδική έκφραση και η ρύθμιση γονιδίων σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς.

Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και αποτελεσμάτων

Για τη συσχέτιση της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *KiSS-1* με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων χρησιμοποιήθηκαν η στατιστικές αναλύσεις χ^2 (chi-square) και τη δοκιμή Rho του Spearman. Η επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (RFS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση ως την υποτροπή της νόσου, το θάνατο ή την τελευταία παρακολούθηση. Οι καμπύλες επιβίωσης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο του ορίου προϊόντος Kaplan-Meier και τη δοκιμή Logrank. Όλες οι τιμές p είναι διπλής όψης και οι παρατηρούμενες διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές όταν $p < 0,05$.

Για τη συσχέτιση των επιπέδων mRNA της γλυκοδελίνης με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση Fisher. Επειδή η επιβιωτίνη ερευνήθηκε ως συνεχιζόμενη μεταβλητή η Student's *T*-δοκιμή, Mann-Whitney *U*-δοκιμή και η ανάλυση μεταβλητών (ANOVA) χρησιμοποιήθηκαν για συσχετίσουν την έκφρασή της ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων.

Η ολική επιβίωση (Overall Survival; OS) και η επιβίωση ελεύθερης νόσου (Disease-Free Survival; DFS) υπολογίστηκαν από τη στιγμή της διάγνωσης έως το θάνατο ή την τελευταία παρακολούθηση και έως την υποτροπή, το θάνατο χωρίς υποτροπή ή την τελευταία παρακολούθηση, αντίστοιχα. Οι καμπύλες επιβίωσης και η σύγκριση με την κατάσταση μεταγραφής της γλυκοδελίνης και επιβιωτίνης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο του ορίου προϊόντος Kaplan-Meier και τη δοκιμή Log-rank. Το μοντέλο αναλογικού κινδύνου του

COX και η ανάλυση Wald X^2 χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η προγνωστική τους αξία στην ολική επιβίωση και στην επιβίωση ελεύθερης νόσου. Όλες οι τιμές p είναι διπλής όψης και οι παρατηρούμενες διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές όταν $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου *KiSS-1* σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές

Ελέγχθηκαν τρεις τύποι ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων: επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (HeLa), επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος του μαστού (MCF-7) και επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα (A549). Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν επίσης λεμφοβλάστες από ανθρώπινη T-κυτταρικής αρχής οξεία λευχαιμία και WI-38T SV40-μετασχηματισμένοι ανθρώπινοι ινοβλάστες του πνεύμονα.

Η ανάλυση SSCP αποκάλυψε ότι το εξόνιο IVa του *KiSS-1* στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και A549 είχαν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε σύγκριση με το εξόνιο IVa του *KiSS-1* στις κυτταρικές σειρές HeLa, Jurkat και W138T.

Οι παρεκκλίνουσες ζώνες SSCP στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν και βρέθηκαν ότι φέρουν μια νέα υποκατάσταση C σε G στο εξόνιο IVa του *KiSS-1* που είναι μια υποκατάσταση κυτοσίνης από γουανίνη, 242 ζεύγη βάσεων από τη θέση έναρξης της μετάφρασης.

Αυτή η σημειακή μετάλλαξη αλλάζει ένα κωδικόνιο CCC σε CGC, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της υδρόφοβης προλίνης (P) από την υδρόφιλη αργινίνη (P81R) στην αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης *KiSS-1* άγριου-τύπου προκαλώντας αλλαγές στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *KiSS-1* και συσχετίσεις σε 50 καρκινώματα μαστού

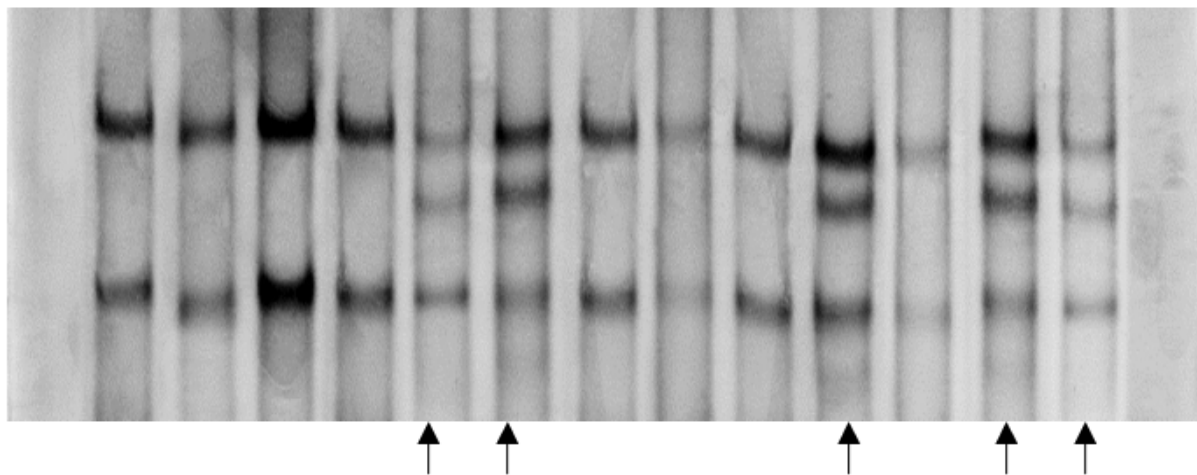
Οι πλήρεις αλληλουχίες των εξονίων III, IVa και IVb του γονιδίου *KiSS-1* στα δείγματα από τους 50 όγκους μαστού πολλαπλασιάστηκαν με PCR, και η ποιότητα αυτών των ενισχυμένων τμημάτων/προϊόντων της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα δείγματα στη συνέχεια αναλύθηκαν για πολυμορφισμούς λόγω μεταλλάξεων με SSCP και ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα.

Δεν κατέστη δυνατόν να ανιχνεύσουμε σημειακές μεταλλάξεις, ενθέσεις ή απαλοιφές (απαλείψεις) στα εξόνια III ή IVb, καθώς δεν εντοπίστηκαν μετατοπισμένες ζώνες (παρεκκλίνουσες μορφές) σε κανένα από τα 50 δείγματα του καρκίνου του μαστού, ούτε όμως και στα 50 δείγματα από το περιφερικό αίμα των υγιών ατόμων.

Ωστόσο, όταν το εξόνιο IVa αναλύθηκε με SSCP και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μια μετατοπισμένη ζώνη καταγράφηκε σε 5 από 50 (10%) δείγματα του καρκίνου του μαστού, ενώ δεν καταγράφηκε σε κανένα από τα 50 δείγματα από τα υγιή άτομα της μελέτης (**Εικόνα 2**).

Επίσης, η μετατόπιση ζώνης ανιχνεύθηκε στο δείγμα περιφερικού αίματος των 3 από τις 5 ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έφεραν όγκους με μετατόπιση ζώνης του εξονίου IVa. Το παραπάνω εύρημα υποδεικνύει την παρουσία ενός πολυμορφισμού στην αναπαραγωγική (γαμετική) σειρά αντί μιας συγκεκριμένης σωματικής μετάλλαξης στους όγκους του μαστού αυτών των τριών ασθενών.

Όπως προκύπτει από την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, η συχνότητα εμφάνισης μιας σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου *KiSS-1* στους όγκους των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού ήταν μόνον 4% (2/50).



Εικόνα 2. Παρεκκλίνουσες ή μετατοπισμένες ζώνες του εξονίου IVa του γονιδίου *KiSS1* σε πέντε δείγματα DNA όγκου που είχε πολλαπλασιαστεί με PCR, τα οποία ανιχνεύθηκαν με την τεχνική SSCP και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Η ανάλυση της αλληλουχίας τόσο στο εργαστήριο γονιδιωματικής ανάλυσης του ΠΓΝΙ όσο και σε εξωτερικά εργαστήρια επιβεβαίωσε την παρουσία αλληλουχιών άγριου τύπου των εξονίων III, IVb και στα 50 δείγματα καρκίνου του μαστού, καθώς και την αλληλουχία άγριου τύπου του εξονίου IVa στα 45 από τα 50 δείγματα καρκίνου του μαστού που μελετήθηκαν. Στα εναπομείναντα 5 δείγματα καρκίνου του μαστού ανιχνεύθηκε μία υποκατάσταση/αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) σε γουανίνη (G), η οποία εντοπίστηκε 242 ζεύγη βάσεων από τη θέση έναρξης της μετάφρασης (242 C>G). Η συγκεκριμένη υποκατάσταση/αντικατάσταση είχε προηγουμένως ανιχνευθεί στις ανθρώπινες επιθηλιακές καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF7 και A549.

Αυτός ο πολυμορφισμός ανιχνεύτηκε και στο DNA, που απομονώθηκε από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος στις τρεις από τις πέντε ασθενείς, που έφεραν τον πολυμορφισμό στα δείγματα του όγκου. Αντιθέτως, εντοπίστηκε αποκλειστικά στα δείγματα του όγκου του μαστού και όχι στο περιφερικό αίμα στις δύο από τις πέντε ασθενείς.

Αυτή η απλή νουκλεοτιδική υποκατάσταση, που είχε προηγουμένως αναφερθεί ως RS4889 391C>G στη βάση δεδομένων NCBI, αλλάζει ένα κωδικόνιο C \underline{C} C σε C \underline{G} C, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (Pro,P) σε αργινίνη (Arg,R) και τη μετάλλαξη (P81R) στην προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων άγριου τύπου που είχε προηγουμένως αναφερθεί ως HSU43527:

```
MNSLVSWQLLLFLCATHFGEPLEKVASVGNRPTGQQLESGLLAPGEQSLP
CTERKPAATARLSRRGTSLSPPPESSGSPQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQ
REKDLPNYNWNSFGLRFGKREAAPGNHGRSAGRGRWGAGAGQ
```

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παρεκκλίνουσας/μετατοπισμένης ζώνης του εξονίου IVa που ανιχνεύθηκε με SSCP και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, σε ενισχυμένο DNA όγκου από τα πέντε δείγματα, και τα αντίστοιχα δεδομένα αλληλουχίας και εκείνα του άγριου-τύπου του εξονίου IVa από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενούς απεικονίζονται στην **Εικόνα 2** και στις **Εικόνες 3A** και **3B**, αντίστοιχα.

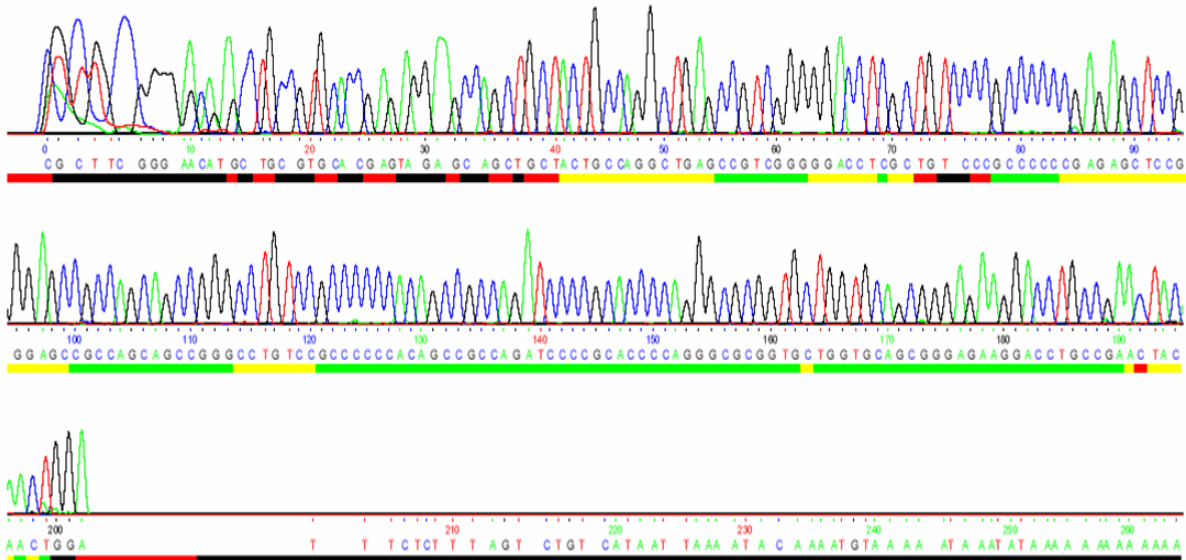
(A)



SCF file: X60_30b_KissbF.scf
 Samples: 14714 Bases: 1220
 Avg. spacing: 12.1
 Avg. qual. >= 10: 21, 20: 52, 30: 100

Clip left: -1
 Clip right: -1

Page: 1/3



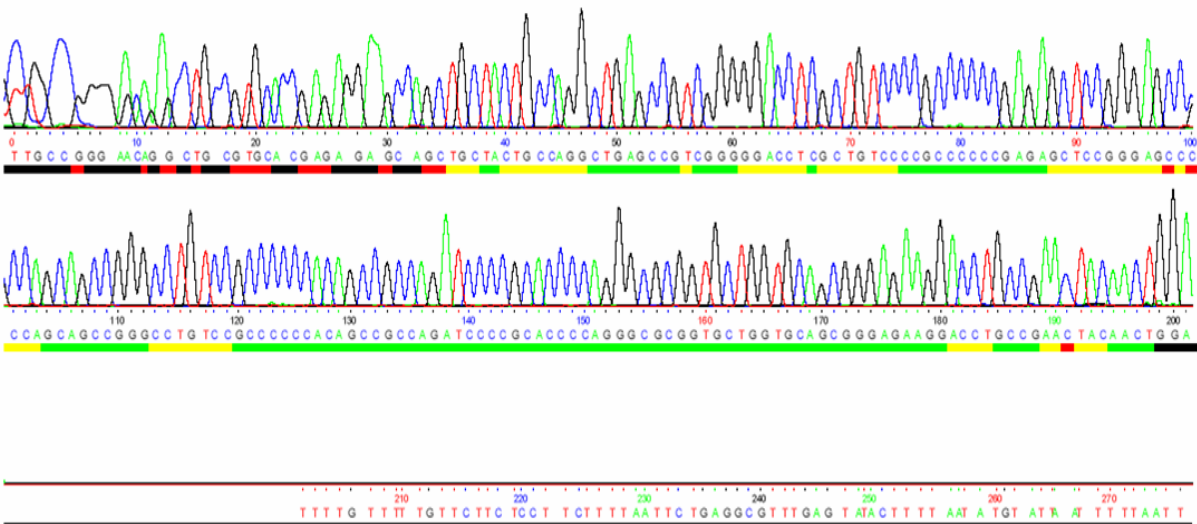
(B)



SCF file: X60_23b_KissbF.scf
 Samples: 15044 Bases: 1466
 Avg. spacing: 10.3
 Avg. qual. >= 10: 17, 20: 55, 30: 106

Clip left: -1
 Clip right: -1

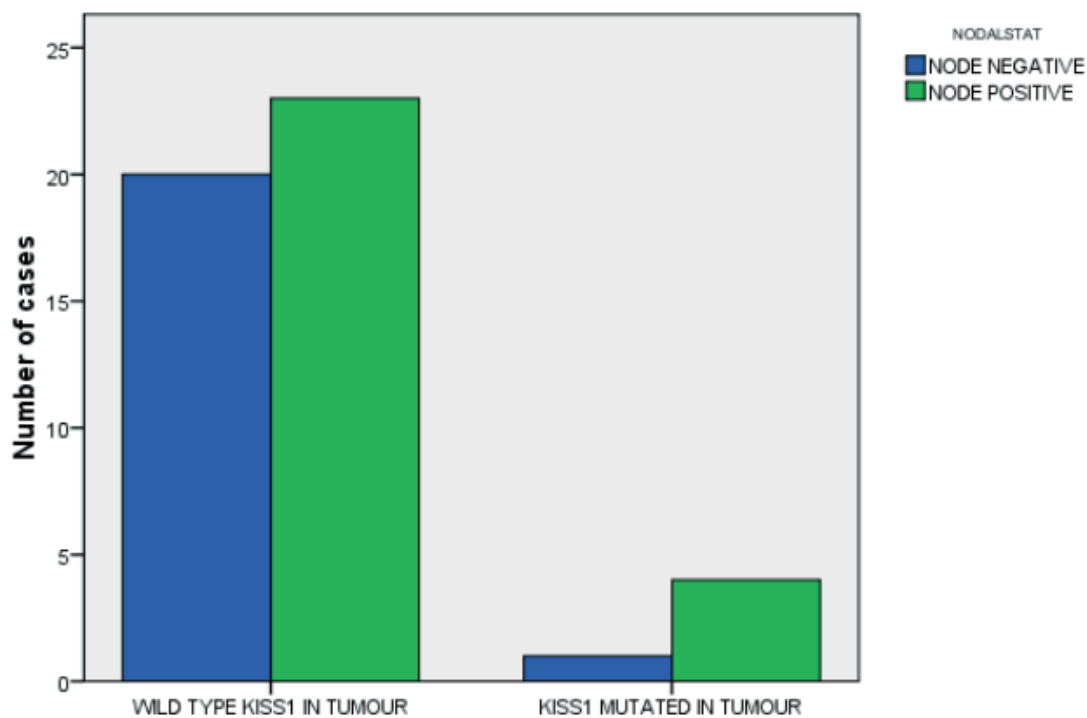
Page: 1/3



Εικόνα 3. Αλληλούχηση του γονιδίου *KiSS1*. (A) Ανίχνευση της μετάλλαξης στη θέση 101 του εξονίου IVa του γονιδίου *KiSS-1* (mutated *KiSS-1*), και (B) Αλληλουχία του εξονίου IVa του γονιδίου *KiSS-1* αγρίου-τύπου.

Παρότι η υποκατάσταση νουκλεοτιδίου στο εξόνιο IVa του γονιδίου *KiSS-1* δεν συσχετίστηκε στατιστικά με την έκφραση της πρωτεΐνης, προϊόν του γονιδίου *KiSS-1*, δεν μπορεί να αποκλειστεί μια αντίστροφη συσχέτιση. Δηλαδή, η αναλογία της θετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης στην πρωτεΐνη *KiSS-1* ήταν 56% σε όγκους άγριου-τύπου έναντι 20% σε όγκους που περιείχαν την παραλλαγή *KiSS-1* (συσχέτιση Spearman $r = 0,21$, $p = 0,14$).

Επιπλέον, το 80% των ασθενών, που εμφάνιζαν την παραλλαγή *KiSS-1* στα δείγματα του όγκου, είχαν διηθημένους (θετικούς) μασχαλιαίους λεμφαδένες σε σύγκριση με το 55% των ασθενών που έφεραν όγκους άγριου-τύπου *KiSS-1* (Spearman correlation $r=0.16$, $p=0.027$) (**Εικόνα 4**). Σε αυτές οι συσχετίσεις δεν ήταν εφικτό να αποδειχθεί στατιστική σημαντικότητα πιθανά λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος που καθιστά αδύνατη την κατάληξη σε ισχυρά συμπεράσματα.



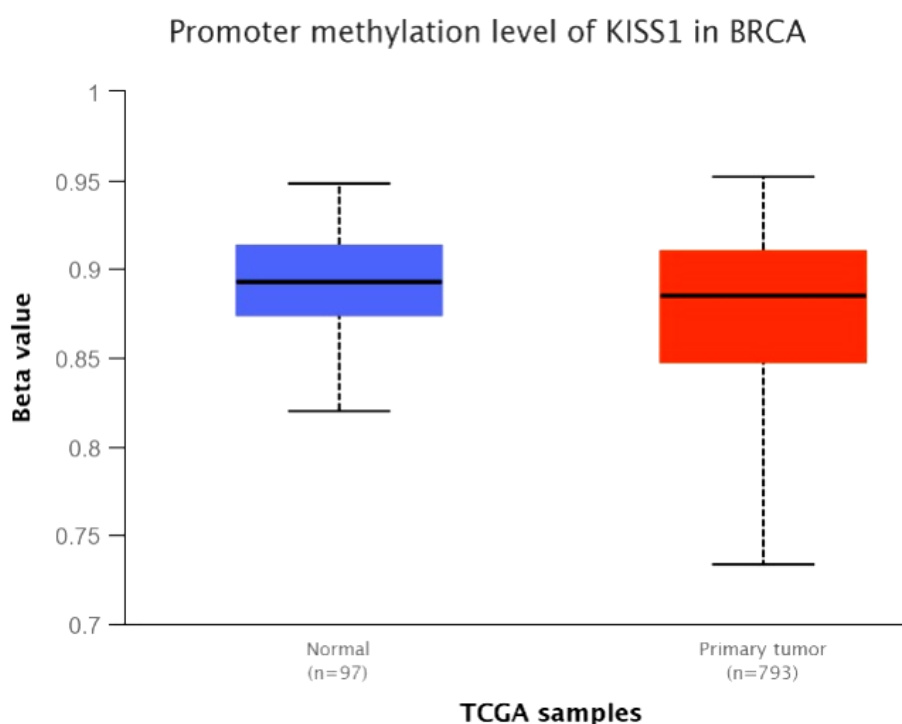
Εικόνα 4. Παρουσία λεμφαδένων σε σύγκριση με τη μετάλλαξη του γονιδίου *KiSS-1*

Έγινε επίσης προσπάθεια να συσχετιστεί η έκφραση της πρωτεΐνης *KiSS-1* με το υψηλό φορτίο λεμφαδενικής νόσου (αριθμός διηθημένων λεμφαδένων μασχάλης). Μεταξύ των 45 ασθενών με *KiSS-1* άγριου τύπου, μόνον το 33%

έφερε 4 ή περισσότερους διηθημένους λεμφαδένες. Αντιθέτως, μεταξύ των 5 ασθενών με *KiSS-1* μη άγριου-τύπου, το 60% είχε 4 ή περισσότερους θετικούς λεμφαδένες.

Αντιστοίχως, δεν βρέθηκε συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου *KiSS-1* με την υπερέκφραση του HER2 ($p = 0,69$), την κατάσταση ορμονικών υποδοχέων ($p = 0,15$), την εμμηνόπαυση ($p = 0,69$), την ηλικία ($p = 0,5$), τον ιστολογικό τύπο του όγκου ($p = 0,27$) ή τον βαθμό διαφοροποίησης ($p = 0,83$).

Η μειορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *KiSS-1* στον καρκίνο οφείλεται είτε στην ομόζυγη απαλοιφή, στη μεθυλίωση του υποκινητή ή σε μεταλλάξεις του γονιδίου *KiSS-1* και αυτοί οι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι στη διεύθυνση των καρκινικών κυττάρων στους παρακείμενους ιστούς.



Comparison	Statistical significance
Normal-vs-Primary	5.23825427478641E-12

Εικόνα 5. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *KiSS-1* στον καρκίνο του μαστού (BRCA). Η τιμή Beta (Beta-value) υποδεικνύει το επίπεδο μεθυλίωσης του DNA που κυμαίνεται από 0 (μη μεθυλιωμένο) έως 1 (πλήρως μεθυλιωμένο). Διαφορετική οριακή τιμή beta (cut-off value) υποδεικνύει υπερμεθυλίωση [Τιμή beta: 0,7 - 0,5] ή υπομεθυλίωση [Τιμή beta: 0,3 - 0,25]

Η διερεύνηση σε βάσεις δεδομένων όπως GTEx και COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=KiSS1>) για μεταλλάξεις του γονιδίου *KiSS-1* στον καρκίνο του μαστού δεν κατέδειξε την παρουσία μεταλλάξεων. Διερευνήθηκε επίσης η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *KiSS-1* στον καρκίνο του μαστού με ανεπάρκεια στο γονίδιο *BRCA*, και δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *KiSS-1* στον *BRCA*-ελλειμματικό καρκίνο του μαστού σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (**Εικόνα 5**).

Μεταγραφή του γονιδίου *KiSS-1* και συσχετισμοί

Έγινε εφικτό να αξιολογηθούν τα επίπεδα του *KiSS-1* mRNA σε 48 από τα δείγματα όγκων. Το *KiSS-1* mRNA ανιχνεύθηκε σε 15 από τους 48 όγκους (31%), ενώ οι υπόλοιποι 33 όγκοι δεν εκφράζανε το *KiSS-1* mRNA εντός των ορίων των εξονίων III / IV. Η μεταγραφή του *KiSS-1* φάνηκε να είναι παρόμοια σε όγκους που φέρουν είτε άγριου-τύπου γονίδιο είτε την παραλλαγή *KiSS-1* ($p = 0.13$).

Το *KiSS-1* mRNA δεν μπόρεσε να συσχετιστεί ούτε με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης: Έκφραση του *KiSS-1* mRNA παρατηρήθηκε σε 9/25 (36%) των όγκων που εκφράζανε επίσης την πρωτεΐνη *KiSS-1*, και σε 14/23 των όγκων που εμφάνισαν αρνητική χρώση για την πρωτεΐνη *KiSS-1* ($p = 0.16$).

Η έκφραση του *KiSS-1* mRNA δεν συσχετίστηκε με υπερέκφραση του *HER2*, την παρουσία μασχαλαίων λεμφαδένων, τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, την ηλικία της ασθενούς και τη φάση της εμμηνόπαυσης ($p > 0,05$).

Αν και από το ποσοστό των όγκων που εμφάνιζαν 10 ή περισσότερους θετικούς μασχαλαίους λεμφαδένες ήταν σε 17% των όγκων με θετική έκφραση *KiSS-1* mRNA (+) έναντι 35% των όγκων με αρνητική έκφραση *KiSS-1* mRNA(-) η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p = 0,25$).

Υπήρχε μια τάση για αντίστροφη συσχέτιση του *KiSS-1* mRNA με την έκφραση ορμονικών υποδοχέων στους όγκους (56% των όγκων θετικών σε *KiSS-1* mRNA ήταν θετικοί σε ορμονικούς υποδοχείς έναντι 84% των αρνητικών όγκων σε *KiSS-1* mRNA, $p = 0,037$). Τέλος, τα λοβιακά αδενοκαρκινώματα

αποτελούν το 28% των αρνητικών όγκων σε KiSS-1 mRNA (-) έναντι μόνο του 4,5% των όγκων θετικών σε KiSS-1 mRNA (+) ($p = 0,033$).

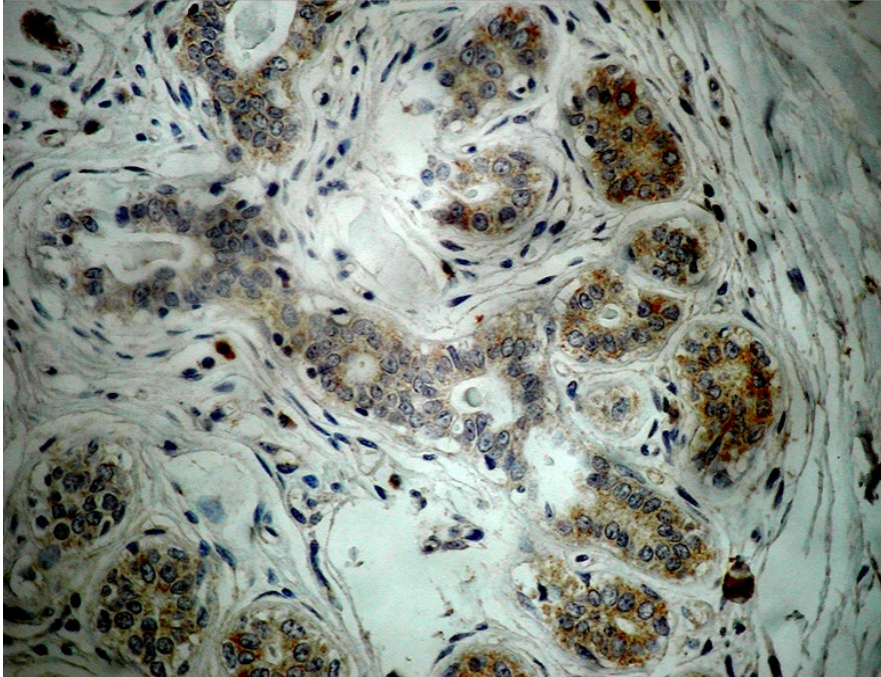
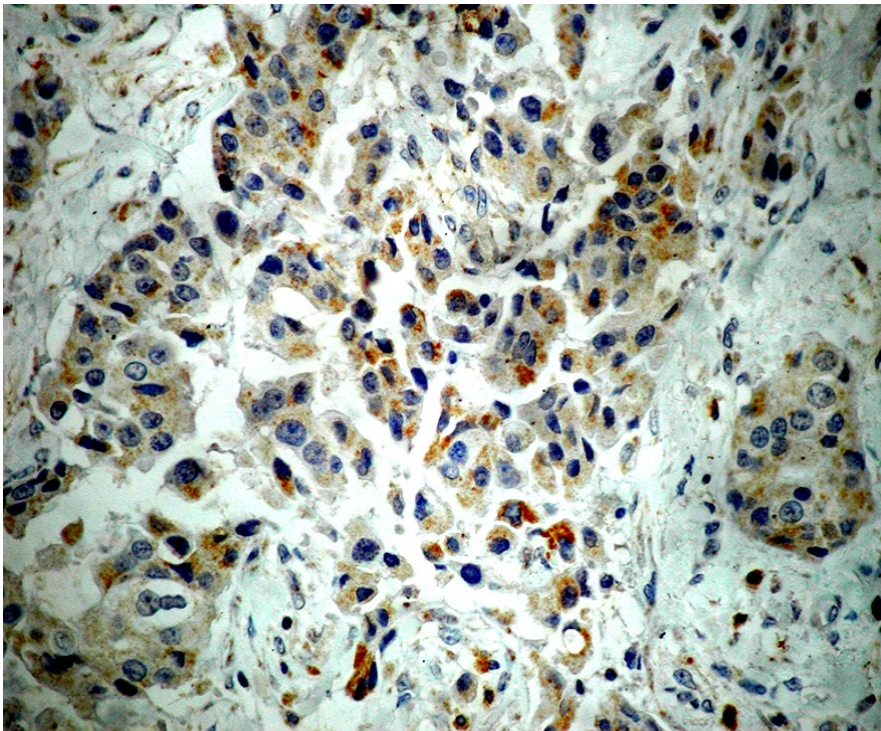
Ανοσοϊστοχημική έκφραση και συσχετισμοί KiSS-1

Είκοσι τέσσερα (24) από τα 50 δείγματα που αναλύθηκαν (48% των εξεταζόμενων περιπτώσεων) αξιολογήθηκαν ως αρνητικά για την έκφραση KiSS-1, ενώ θετική χρώση παρατηρήθηκε σε 26 όγκους (52% των εξεταζόμενων περιπτώσεων).

Είκοσι όγκοι (20) ήταν ασθενώς θετικοί (40%) και 6 μετρίως θετικοί (12%), ενώ κανένας όγκος δεν εμφάνισε ισχυρά θετική χρώση KiSS-1.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση σε θετικά δείγματα ήταν ομοιογενώς κυτταροπλασματική. Σε αντίθεση με τα δείγματα του όγκου, το φυσιολογικό παρέγχυμα του μαστού και οι ιστοί του πλακούντα εμφάνισαν ισχυρή κυτταροπλασματική έκφραση πρωτεΐνης KiSS-1. Χαρακτηριστικά πρότυπα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης KiSS-1 σε φυσιολογικό αδένου του μαστού και σε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του μαστού απεικονίζονται στις **Εικόνες 6A και 6B**, αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η χρώση για την έκφραση της πρωτεΐνης KiSS-1 ανέδειξε μη σημαντική αντίστροφη συσχέτιση με το μεταλλαγμένο εξόνιο IVa του *KiSS-1*, αλλά δεν υπάρχει συσχέτιση με τα επίπεδα KiSS-1 mRNA. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης KiSS-1 δεν συσχετίστηκε επίσης με την υπερέκφραση HER2, τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης ή τύπο, την παρουσία θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων, την έκφραση ορμονικών υποδοχέων, την ηλικία του ασθενούς ή την κατάσταση εμμηνόπαυσης.

(A)**(B)**

Εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης KiSS-1 σε ιστό **(A)** φυσιολογικού μαστού, και **(B)** καρκίνου του μαστού

Συσχέτιση μοριακών δεδομένων KiSS-1 με την έκβαση

Στο μεσοδιάστημα παρακολούθησης 38 μηνών, μόνον 6 από τις 50 γυναίκες υποτροπίασαν (12%). Μία υποτροπή εμφανίστηκε μεταξύ των 5 γυναικών που είχαν όγκους με την παραλλαγή του KiSS-1 (20%), ενώ 6 υποτροπές παρουσιάστηκαν μεταξύ των 45 γυναικών με όγκους άγριου-τύπου KiSS-1 (13%). Ο αριθμός των συμβάντων είναι πολύ χαμηλός, το μέγεθος του δείγματος είναι πολύ μικρό και ο χρόνος παρακολούθησης πολύ μικρός για να επιτρέψει την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων σχετικά με τις αναλύσεις επιβίωσης (Log-rank $p = 0,7$).

Η υποτροπή της νόσου εμφανίστηκε σε 4 από τις 24 γυναίκες με όγκους που δεν εκφράζανε την πρωτεΐνη KiSS-1 (17%) έναντι σε 2 από τις 26 γυναίκες με όγκους που εκφράζανε την πρωτεΐνη KiSS-1 (8%, $p = 0,6$).

Η έκφραση του KiSS-1 mRNA καθώς και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης KiSS-1 δεν παρουσίασαν καμία προγνωστική σημασία για την επιβίωση χωρίς υποτροπή. Ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, ο ιστολογικός τύπος, η ύπαρξη διηθημένων λεμφαδένων, η ηλικία του ασθενούς και η κατάσταση της εμμηνόπαυσης δεν εμφάνισαν καμία προγνωστική σημασία στην μονομερή ανάλυση παλινδρόμησης κινδύνου.

Μεταγραφική δραστηριότητα του KiSS-1 στην ομάδα επικύρωσης

Τα επίπεδα KiSS-1 mRNA ανιχνεύθηκαν μόνο σε 8 από τους 272 ασθενείς (3%). Σε αντίθεση, υπήρχαν 264 γυναίκες με αδenoκαρκίνωμα του μαστού χωρίς ανιχνεύσιμη μεταγραφή του KiSS-1 με τη RT-PCR.

Η ενεργή μεταγραφή του KiSS-1 δε φάνηκε να επηρεάστηκε από, τον αριθμό των διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων, τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, την κατάσταση των ορμονικών υποδοχών ή το μέγεθος του όγκου.

Αν και ο αριθμός των περιπτώσεων με ανιχνεύσιμο μεταγραφόμενο KiSS-1 ήταν πολύ χαμηλός για να επιτρέψει αξιόπιστες αναλύσεις στις διαφορετικές υποομάδες, 7 στις 8 ασθενείς με αυξημένα επίπεδα KiSS-1 mRNA στους όγκους ήταν μετεμμηνοπαυσιακές ($p = 0,03$), (Πίνακας 6).

Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση της μεταγραφής του *KiSS-1* με τη μεταγραφή άλλων μοριακών δεικτών που μελετήθηκαν (**Πίνακας 7**).

Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν τα επίπεδα mRNA των *HER2* (ανθρώπινος υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2), *VEGF* (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53*, *BCL2*, *PAEP* (γλυκοδελίνη) και *BIRC5* (επιβιωτίνη), και τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν ως αρνητικά ή θετικά σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Αν και τα παραπάνω μόρια εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής επιβίωσης, της αγγειογένεσης, της επιδιόρθωσης του DNA, της απόπτωσης, η μεταγραφή τους δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με την μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου καταστολής της μετάστασης *KiSS-1*.

Μετά από ένα μέσο διάστημα παρακολούθησης 62 μηνών (εύρος: 0,01-86,5), κατέληξαν 44 ασθενείς (16%), 16% από το σύνολο των ασθενών που δεν εκφράζανε *KiSS-1* και 25% από το σύνολο των ασθενών που εμφάνιζαν έκφραση *KiSS-1*.

Εξέλιξη νόσου παρουσίασαν 76 ασθενείς (28%), 28% από όσες ανήκαν στην ομάδα των ασθενών που ήταν χωρίς έκφραση του *KiSS-1* και 37,5% από την ομάδα ασθενών με έκφραση του *KiSS-1* (**Πίνακας 8**).

Πίνακας 6. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και συσχέτιση με τη μεταγραφική κατάσταση του KiSS-1

	Έκφραση του KiSS-1			
	Αρνητική (N=264)		Θετική (N=8)	
	N	%	N	%
Ηλικία (έτη)				
Μέσος όρος	51		59	
Εύρος	22,5-76		39,5-62	
Εμμηνόπαυση				
Προ-εμμηνοπαυσιακές	138	52	1	12,5
Μετεμμηνοπαυσιακές	126	48	7	87,5
Θεραπευτικό σχήμα				
E-T-CMF	119	45	4	50
E-CMF	145	55	4	50
Χειρουργική παρέμβαση				
Μαστεκτομή	211	80	7	87,5
Ουκτεκτομή	53	20	1	12,5
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων				
Θετικοί	54	20	4	50
Αρνητικοί	206	78	4	50
Άγνωστο	4	1	0	0
Αριθμός λεμφαδένων				
1-3	61	23	2	25
≥4	202	76	6	75
Αρνητικοί	1	0,4	0	0
Βαθμός διαφοροποίησης				
I-II	130	49	3	37,5
III-IV	133	50	5	62,5
Άγνωστο	1	0,4	0	0
Μέγεθος όγκου (εκ)				
≤2	81	31	2	25
2-5	131	50	5	62,5
>5	51	19	1	12,5
Άγνωστο	1	0,4	0	0

Πίνακας 7. Μεταγραφή βασικών μοριακών δεικτών και συσχέτιση με τη μεταγραφική κατάσταση-έκφραση του γονιδίου *KiSS-1*

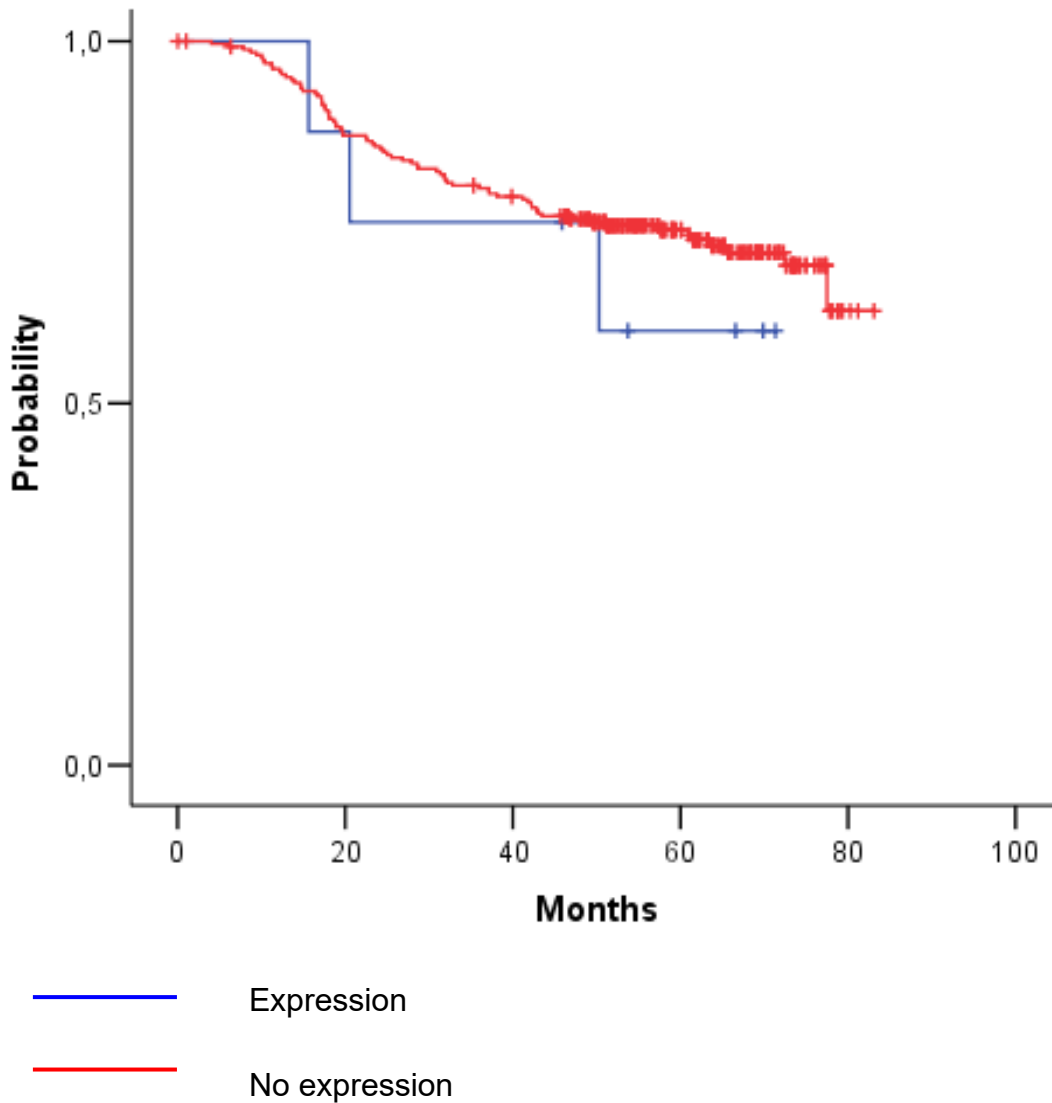
	Έκφραση του <i>KiSS-1</i>			
	Αρνητική (N = 264)		Θετική (N = 8)	
	N	%	N	%
PAEP				
Δεν εκφράζεται	198	75	6	75
Εκφράζεται	66	25	2	25
BIRC5				
Δεν εκφράζεται	9	3	-	-
Εκφράζεται	255	97	8	100
HER2				
	Αρνητική (N = 229)		Θετική (N = 7)	
Δεν εκφράζεται	167	73	4	57
Εκφράζεται	62	27	3	43
VEGF				
	Αρνητική (N = 212)		Θετική (N = 8)	
Δεν εκφράζεται	57	27	2	25
Εκφράζεται	155	73	6	75
p53				
	Αρνητική (N = 234)		Θετική (N = 8)	
Δεν εκφράζεται	180	77	5	62.5
Εκφράζεται	54	23	3	37.5
Bcl2				
	Αρνητική (N = 236)		Θετική (N = 8)	
Δεν εκφράζεται	120	51	6	75
Εκφράζεται	116	49	2	25

*Δεν αποδείχθηκε συσχέτιση τη μεταγραφής του *KiSS-1* με τη μεταγραφή άλλων μοριακών δεικτών του όγκου ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις)*

Πίνακας 8. Συσχέτιση επιβίωσης με τη μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου *KiSS-1*

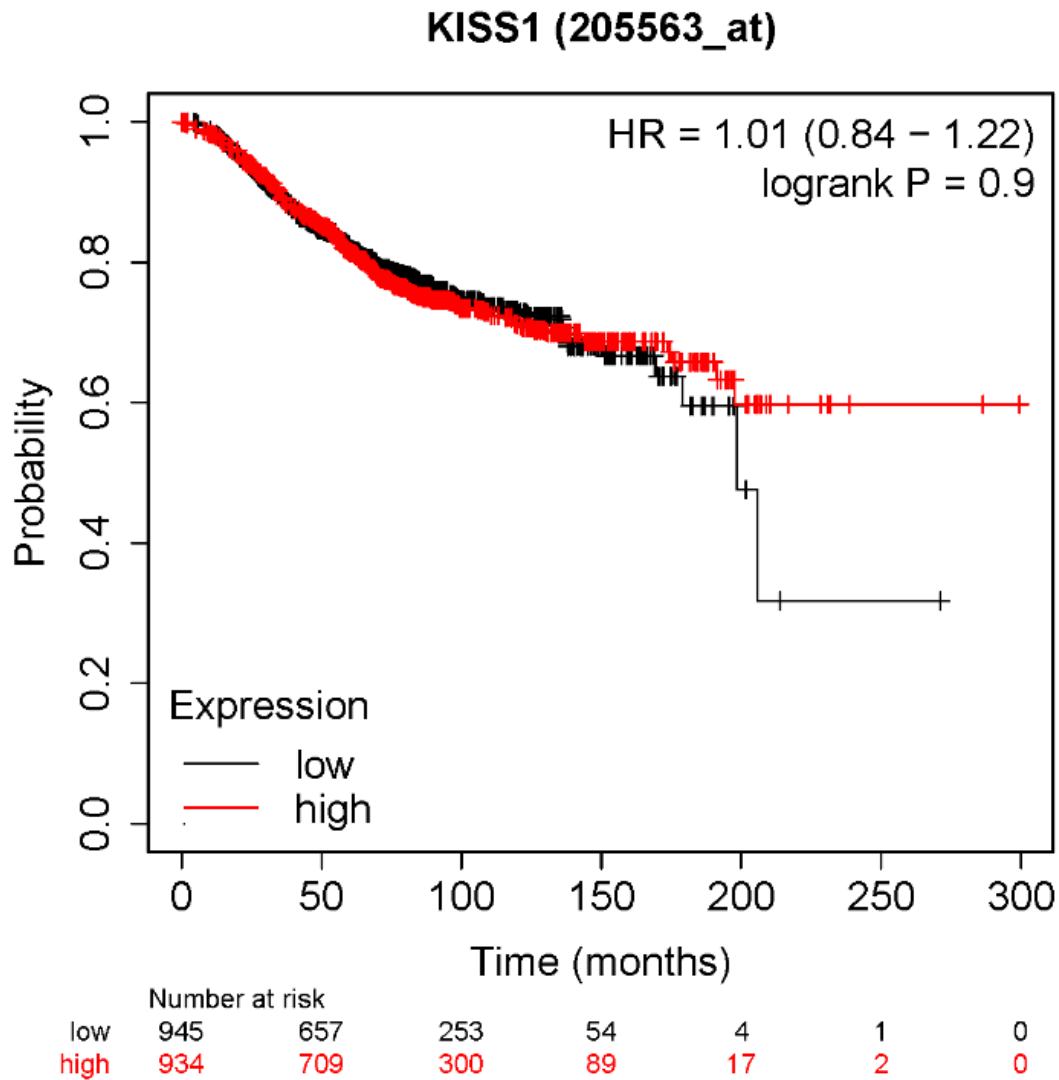
	Έκφραση του <i>KiSS-1</i>	
	Αρνητική (N=264)	Θετική (N=8)
Ολική Επιβίωση (μήνες)		
Ασθενείς	42	2
Εύρος	0.01 - 86.5+	35.02 – 78.03+
Μέσος όρος	Δεν επιτεύχθηκε	78.03
Επιβίωση ελεύθερης νόσου (μήνες)		
Ασθενείς	73	3
Εύρος	0.01 – 83.11+	15.64 – 71.34+
Μέσος όρος	Δεν επιτεύχθηκε	Δεν επιτεύχθηκε

Η ολική επιβίωση (OS) και η επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (log-rank $p = 0,55$ και $p = 0,54$ αντίστοιχα), με τη μεταγραφική κατάσταση του *KiSS-1* να μην εμφανίζει καμία προγνωστική σημασία (**Εικόνα 7**).



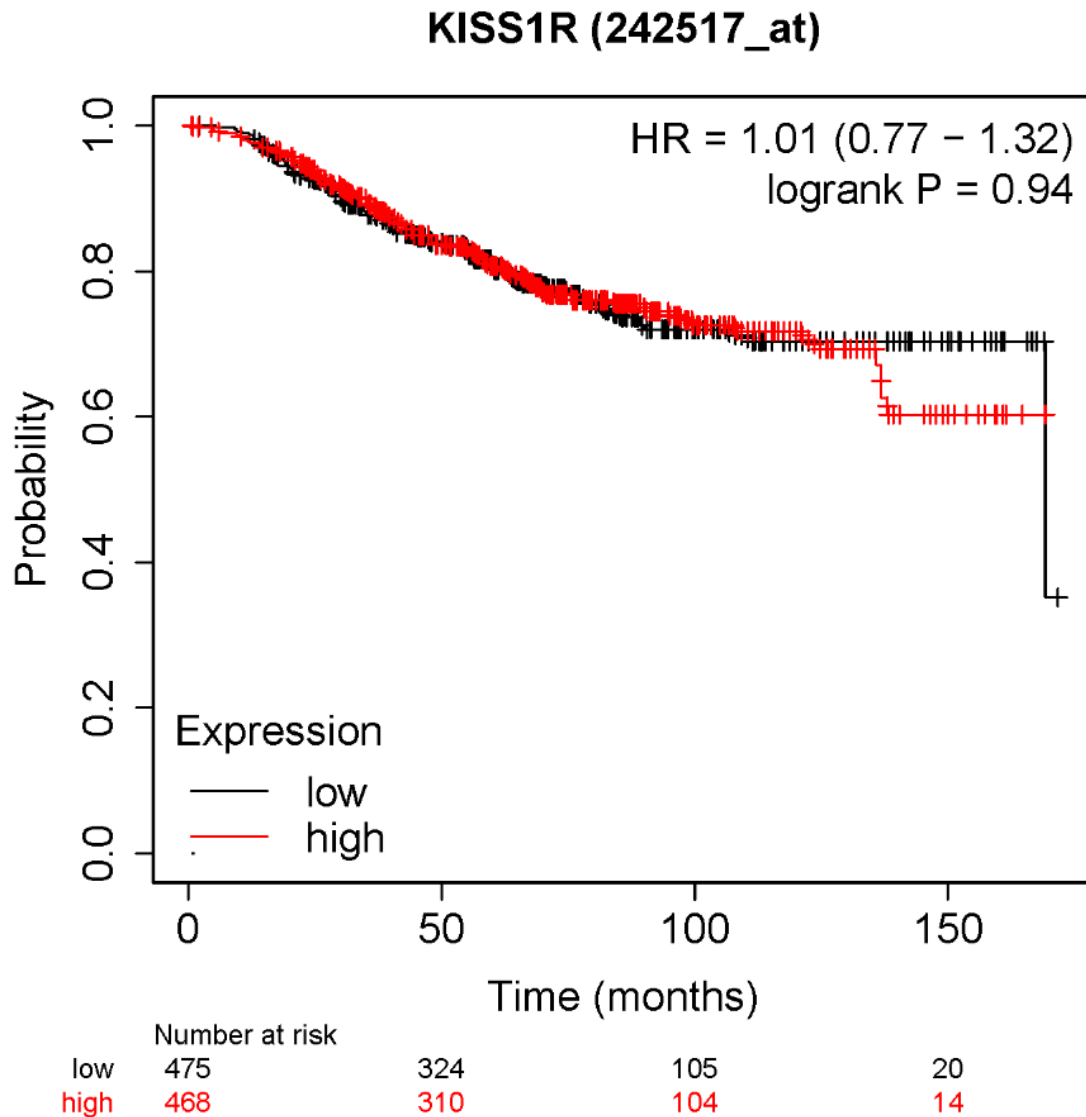
Εικόνα 7. Επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) 272 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού σε σχέση με τη μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου *KiSS-1* (log-rank $p = 0,55$ και $p = 0,54$, αντίστοιχα)

Τα αποτελέσματα μας που δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ολικής επιβίωσης και της επιβίωσης ελεύθερης νόσου των ασθενών ως συνάρτηση της έκφρασης της μεταστίνης/*KISS-1* επιβεβαιώθηκαν με τη βιοπληροφορική ανάλυση σε βάση δεδομένων (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν *KiSS-1*. Επίδραση της έκφρασης της μεταστίνης στην ολική επιβίωση των ασθενών (OS) (Kaplan-Meier plot of overall survival HR=hazard ratio).

Μια παρόμοια ανάλυση σε βάση δεδομένων κατέδειξε ότι επίσης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ολικής επιβίωσης και της επιβίωσης ελεύθερης νόσου των ασθενών ως συνάρτηση της έκφρασης της του υποδοχέα της μεταστίνης/KISS-1R (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα της μεταστίνης KiSS-1R. (Kaplan-Meier plot of overall survival HR=hazard ratio).

Έκφραση της γλυκοδελίνης σε αδενοκαρκινώματα μαστού

Συνολικά, επιλέχθηκαν 272 ασθενείς με επαρκές βιολογικό υλικό και κλινικοπαθολογικά δεδομένα για ανάλυση.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το mRNA της γλυκοδελίνης εκφράζονταν σε 68 από τις ασθενείς (25%) με καρκίνο μαστού. Η μέση κανονικοποιημένη βαθμολογία ήταν 1,8 (3,4 έως 6,9).

Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων με βάση την έκφραση της γλυκοδελίνης καταγράφονται στον **Πίνακα 9**.

Το 32% των προ-εμμηνοπαυσιακών γυναικών έναντι του 18% των μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών είχαν όγκους θετικούς στην έκφραση της γλυκοδελίνης, με το ποσοστό των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών με θετική έκφραση στη PAEP να είναι σημαντικά υψηλότερο ($p = 0,01$).

Η γλυκοδελίνη εκφράζονταν στο 33% των γυναικών με όγκους με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς έναντι στο 22% των γυναικών που οι όγκοι τους είχαν θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Η έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης ήταν εξίσου κατανεμημένο μεταξύ των κατηγοριών των άλλων κλινικοπαθολογικών μεταβλητών (**Πίνακας 9**).

Η έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης μεταξύ των όγκων αναλύθηκε για την πιθανή συσχέτιση με την έκφραση mRNA άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής επιβίωσης και της αγγειογένεσης, όπως της μεταστίνης (KiSS-1), της επιβιωτίνης (survivin, BIRC5), του HER2, του VEGF, του p53, και του Bcl2.

Το ποσοστό των όγκων που εκφράζουν τη γλυκοδελίνη ήταν σημαντικά υψηλότερο μεταξύ των ασθενών με καρκίνο μαστού θετικό στην έκφραση του HER2 mRNA σε σύγκριση με των ασθενών με καρκίνο μαστού αρνητικό στην έκφραση HER2 mRNA ($p = 0,02$).

Δεν ήταν εμφανής άλλος συσχετισμός της μεταγραφής της γλυκοδελίνης με τη μεταγραφή άλλων γονιδίων (**Πίνακας 10**).

Πίνακας 9. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων με βάση την έκφραση της γλυκοδελίνης

	Έκφραση της γλυκοδελίνης			
	Αρνητική (N = 204)		Θετική (N = 68)	
Ηλικία (έτη) Μέσος όρος Εύρος ηλικίας	52 27 - 76		47.5 22.5 - 74	
	N	%	N	%
Εμμηνόπαυση¹ Προ-εμμηνόπαυση n=139 Μετεμμηνόπαυση n=133	95 109	68 82	44 24	32 18
Ομάδα με βάση τη θεραπεία E-T-CMF n=123 E-CMF n=149	86 118	70 79	37 31	30 21
Χειρουργική επέμβαση Μαστεκτομή n=218 Ογκεκτομή n=54	162 42	74 78	56 12	26 22
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων Αρνητική n=58 Θετική n=210 Άγνωστο n=4	39 164 1	67 78	19 46 3	33 22
Λεμφαδένες (θετικοί) 0 – 3 n=63 ≥ 4 n=209	48 156	76 75	15 53	24 25
Στάδιο I – II n=133 III-IV n=138 Άγνωστο n=1	101 102 1	76 74	32 36	24 26
Μέγεθος όγκου ≤ 2 cm n=83 2-5 n=136 > 5 n=53	61 105 38	73 77 72	22 31 15	27 23 28

¹Ο αριθμός των ασθενών που ήταν θετικοί στην έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης ήταν σημαντικά υψηλότερος μεταξύ των προ-εμμηνόπαυσιακών γυναικών (p=0.01)

Πίνακας 10. Μοριακά χαρακτηριστικά με βάση της έκφραση της γλυκοδελίνης

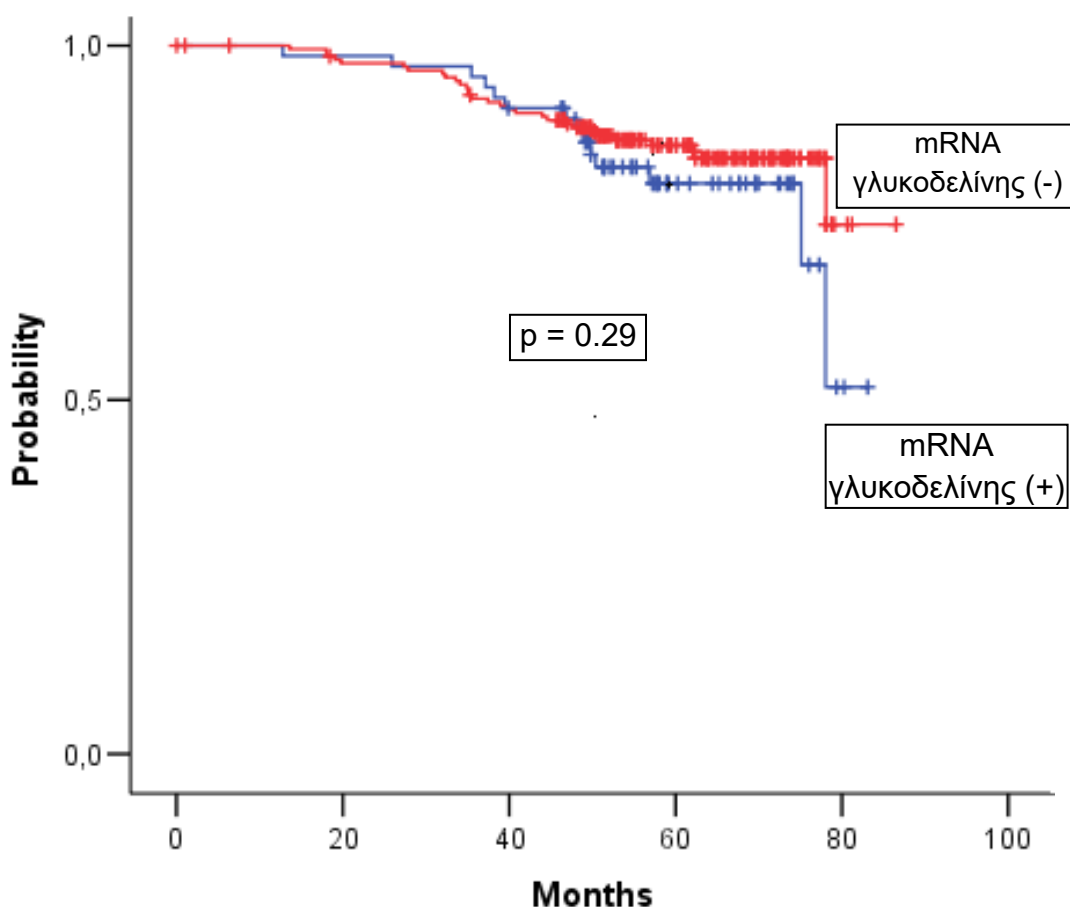
	Έκφραση της Γλυκοδελίνης			
	Αρνητική (N=204)		Θετική (N=68)	
	N	%	N	%
Μεταστατίνη (KiSS-1)				
Δεν εκφράζεται n=264	198	75	66	25
Εκφράζεται n=8	6	75	2	25
Επιβιωτίνη (BIRC5)				
Δεν εκφράζεται n=9	8	89	1	11
Εκφράζεται n=263	196	75	67	25
HER2¹	Αρνητική (N=180)		Θετική (N=56)	
Δεν εκφράζεται n=171	138	81	33	19
Εκφράζεται n=65	42	65	23	35
VEGF	Αρνητική (N=167)		Θετική (N=53)	
Δεν εκφράζεται n=59	44	75	15	25
Εκφράζεται n=161	123	76	38	24
TP53	Αρνητική (N=187)		Θετική (N=55)	
Δεν εκφράζεται n=185	145	78	40	22
Εκφράζεται n=57	42	74	15	26
Bcl2	Αρνητική (N=187)		Θετική (N=57)	
Δεν εκφράζεται n=126	92	73	34	27
Εκφράζεται n=118	95	80	23	20

¹ Ο αριθμός των ασθενών που ήταν θετικοί στην έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης ήταν σημαντικά υψηλότερος μεταξύ των όγκων θετικών για την έκφραση του HER2 mRNA (p=0.01)

Μετά από ένα μέσο όρο παρακολούθησης 62 μηνών (εύρος: 0,01 - 86 μήνες), οι 44 ασθενείς (16%) κατέληξαν και οι 76 εμφάνισαν υποτροπή της νόσου τους (28%).

Αναλυτικότερα κατέληξε το 15% από τις γυναίκες που δεν είχαν καμία έκφραση της γλυκοδελίνης έναντι του 21% από τις γυναίκες των οποίων ο όγκος εξέφραζε τη γλυκοδελίνη. Αντιστοίχως, υποτροπίασε το 26,5% από τις γυναίκες των οποίων ο όγκος δεν εξέφραζε τη γλυκοδελίνη έναντι του 32% από τις γυναίκες με θετική έκφραση.

Η συνολική επιβίωση και η επιβίωση ελεύθερη νόσου δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ασθενών με όγκους που ήταν θετικοί στην έκφραση της γλυκοδελίνης και με όγκους αρνητικούς στην έκφραση της γλυκοδελίνης (log-rank $p = 0,29$ για OS και log-rank $p = 0,33$ για DFS). Οι καμπύλες συνολικής επιβίωσης ανάλογα με την έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης απεικονίζονται στην **Εικόνα 10**.



Εικόνα 10. Επίδραση της έκφρασης της γλυκοδελίνης στην ολική επιβίωση των ασθενών (OS)

Έκφραση της επιβιωτίνης σε αδενοκαρκινώματα μαστού

Το mRNA της επιβιωτίνης (survivin, BIRC5) ανιχνεύθηκε σε 263 από τα δείγματα των όγκων του μαστού (97%). Η μέση κανονικοποιημένη βαθμολογία ήταν 5,92 (0,1-10,4). Το 25^ο και το 75^ο εκατοστημόριο ήταν 5,05 και 6,83, αντίστοιχα.

Ο συσχετισμός των επιπέδων mRNA της επιβιωτίνης με κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών και του όγκου συνοψίζονται στον **Πίνακα 11**.

Η αυξημένη μεταγραφή mRNA της επιβιωτίνης συσχετίστηκε με τον υψηλό βαθμό διαφοροποίησης ($p < 0,001$), με την έκφραση mRNA του VEGF ($p = 0,01$) και την έκφραση mRNA του p53 ($p = 0,04$).

Όγκοι με διαστάσεις μεγαλύτερες των 2εκ (T2) απέδωσαν υψηλότερα επίπεδα mRNA της επιβιωτίνης, αν και η συσχέτιση τους παρουσίασε μόνο μια τάση στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0,07$).

Με ένα μέσο όρο παρακολούθησης 64 μηνών, 44 ασθενείς πέθαναν και 76 ασθενείς παρουσίασαν υποτροπή της νόσου.

Η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της επιβιωτίνης δεν ανέδειξε καμία προγνωστική σημασία για τη συνολική επιβίωση ή για την επιβίωση ελεύθερη νόσου σε ανάλυση μονοπαραγοντική ή πολυπαραγοντική. Στην μονοπαραγοντική ανάλυση, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της επιβιωτίνης και της συνολικής επιβίωσης (HR 1.04, 95% CI 0.83-1.3, $p = 0,74$) ή της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (HR 1.03, 95% CI 0.87-1.22, $p = 0,71$).

Η ανάλυση με παλινδρόμηση πολλαπλών παραλλαγών Cox (Cox multivariate regression analysis) αποκάλυψε ότι η παρουσία του mRNA της επιβιωτίνης ($p > 0,05$), με υψηλό αριθμό θετικών λεμφαδένων και με αρνητική έκφραση ορμονικών υποδοχέων έχουν δυσμενή πρόγνωση για τις ασθενείς.

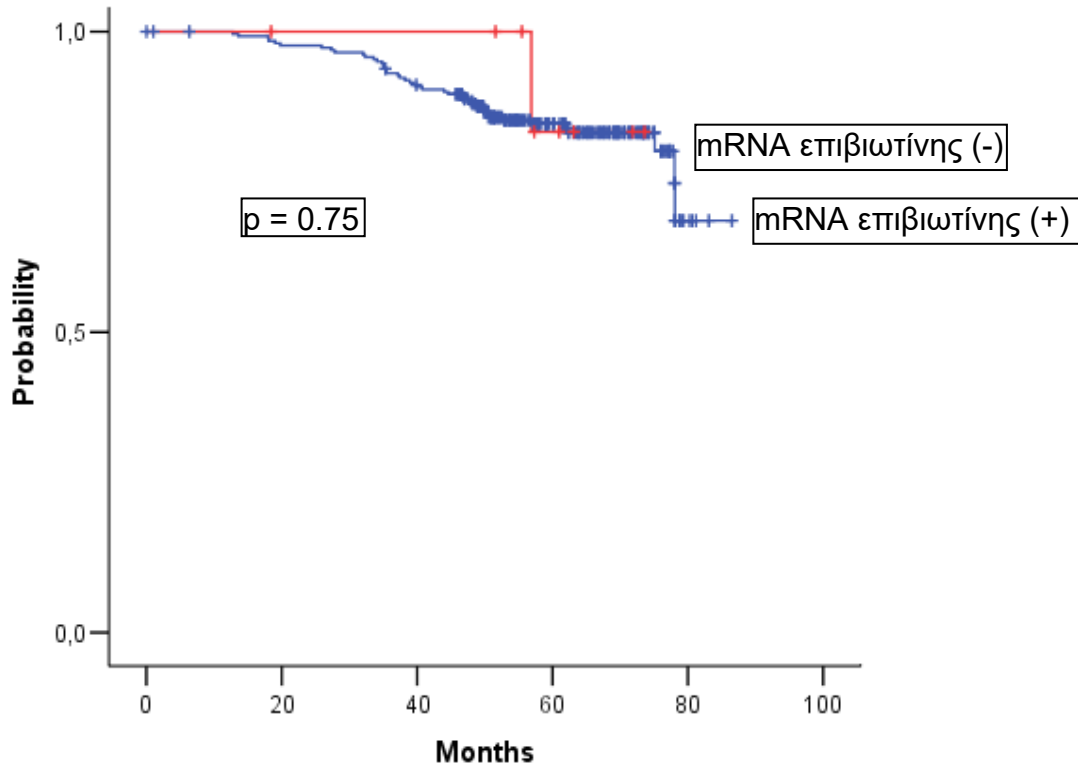
Για 4 ή περισσότερους θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες έναντι 0–3 ισχύει: HR = 2.28, 95% CI 1.14– 4.60 για κίνδυνο υποτροπής και HR = 2.84, 95% CI 1.01– 7.96 για κίνδυνο θανάτου.

Για αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς έναντι θετικών υποδοχέων ισχύει: HR = 1.80, 95% CI 1.09-2.97 για κίνδυνο υποτροπής και HR = 1.9, 95% CI 0.99–3.64 για κίνδυνο θανάτου.

Πίνακας 11. Συσχέτιση της έκφρασης του mRNA της επιβιωτίνης με τα χαρακτηριστικά των ασθενών και τα μοριακά χαρακτηριστικά των όγκων

Χαρακτηριστικά των όγκων	Επιβιωτίνη, (μέσος όρος ± SE)	P
Βαθμός διαφοροποίησης		
I - II	5.47 ± 0.12 (5.64)	p<0.001
III-IV	6.15 ± 0.11 (6.07)	
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων		
Αρνητικοί	5.99 ± 0.16 (5.92)	p=0.25
Θετικοί	5.75 ± 0.10 (5.91)	
Λεμφαδένες		
0 – 3	5.78 ± 0.19 (5.94)	p=0.82
≥ 4	5.83 ± 0.09 (5.91)	
Μέγεθος όγκου		
≤ 2 cm	5.54 ± 0.14 (5.52)	p=0.07
2-5	5.98 ± 0.12 (6.05)	
> 5	5.86 ± 0.22 (5.77)	
Ομάδα με βάση τη θεραπεία		
E-T-CMF	5.95 ± 0.11 (5.92)	p=0.15
E-CMF	5.71 ± 0.12 (5.88)	
HER2		
Δεν εκφράζεται	5.83 ± 0.11 (5.97)	p=0.87
Εκφράζεται	5.89 ± 0.14 (5.87)	
VEGF		
Δεν εκφράζεται	5.50 ± 0.17 (5.52)	p=0.01
Εκφράζεται	6.0 ± 0.11 (6.06)	
P53		
Δεν εκφράζεται	5.73 ± 0.10 (5.82)	p=0.04
Εκφράζεται	6.14 ± 0.14 (6.11)	
Bcl2		
Δεν εκφράζεται	5.85 ± 0.12 (5.92)	p=0.77
Εκφράζεται	5.80 ± 0.14 (5.88)	
Μεταστατίνη (KISS1)		
Δεν εκφράζεται	5.83 ± 0.09 (5.92)	p=0.60
Εκφράζεται	5.56 ± 0.36 (5.76)	
Γλυκοκοδελίνη		
Δεν εκφράζεται	5.86 ± 0.10 (5.96)	p=0.42
Εκφράζεται	5.69 ± 0.15 (5.82)	

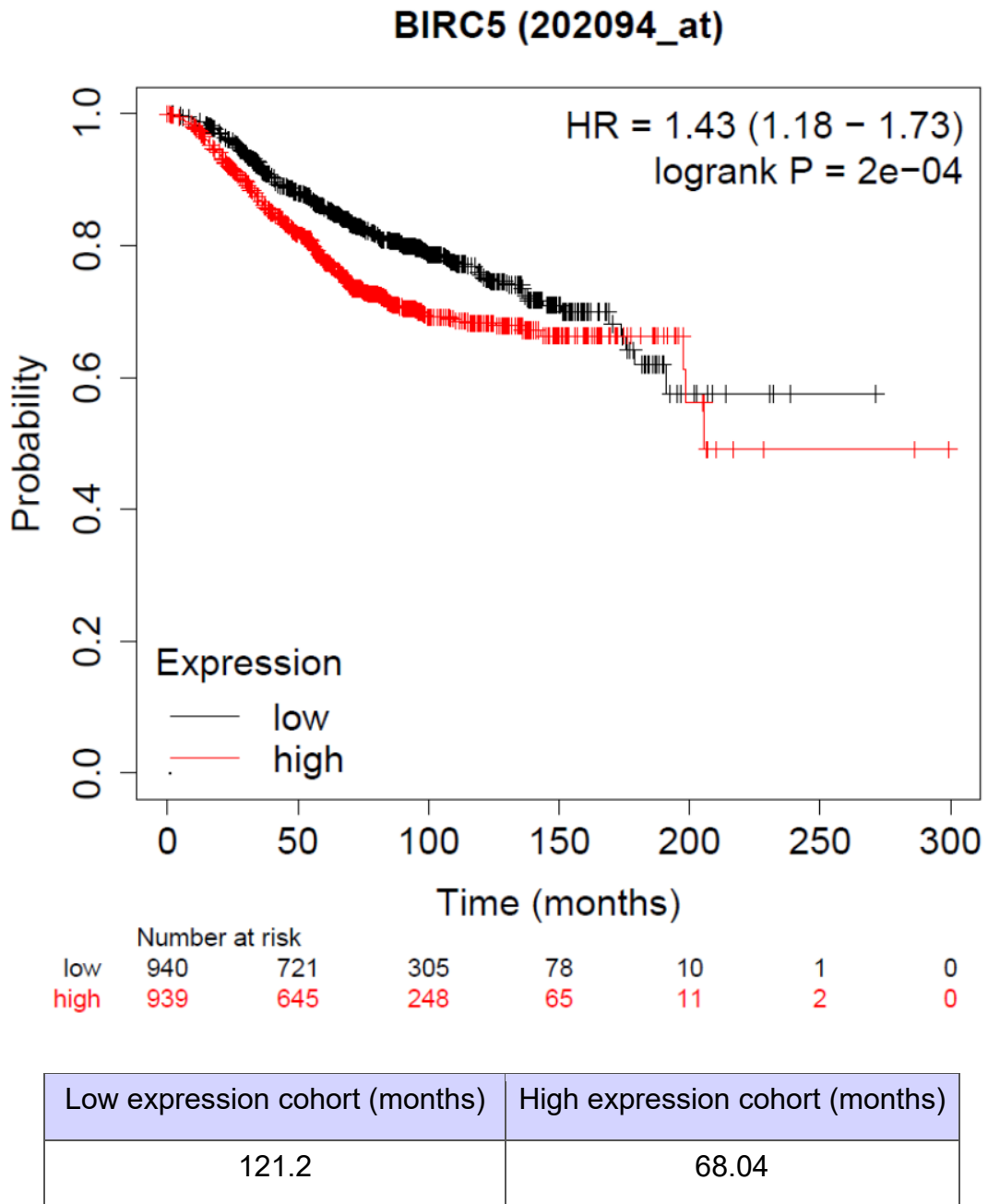
Η συνολική επιβίωση των ασθενών με όγκους που εκφράζουν ή δεν εκφράζουν το mRNA της επιβιωτίνης ήταν πανομοιότυπη (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Επίδραση της έκφρασης της επιβιωτίνης στην ολική επιβίωση των ασθενών (OS)

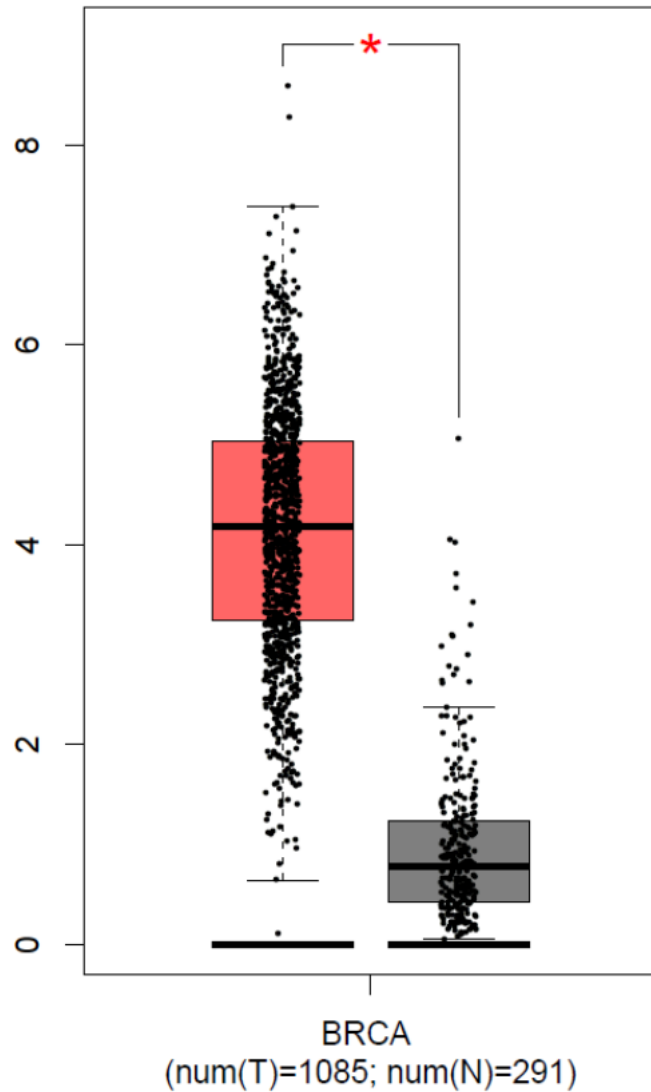
Θελήσαμε στη συνέχεια να συγκρίνουμε τα ευρήματά μας, με αυτά σε βάσεις δεδομένων και προβήκαμε σε περαιτέρω αναλύσεις.

Βιοπληροφορική ανάλυση σε βάση δεδομένων για την ολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού με χαμηλή και υψηλή έκφραση του γονιδίου της επιβιωτίνης κατέδειξε ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση εμφανίζουν μικρότερη διάρκεια επιβίωσης (**Εικόνα 12**).



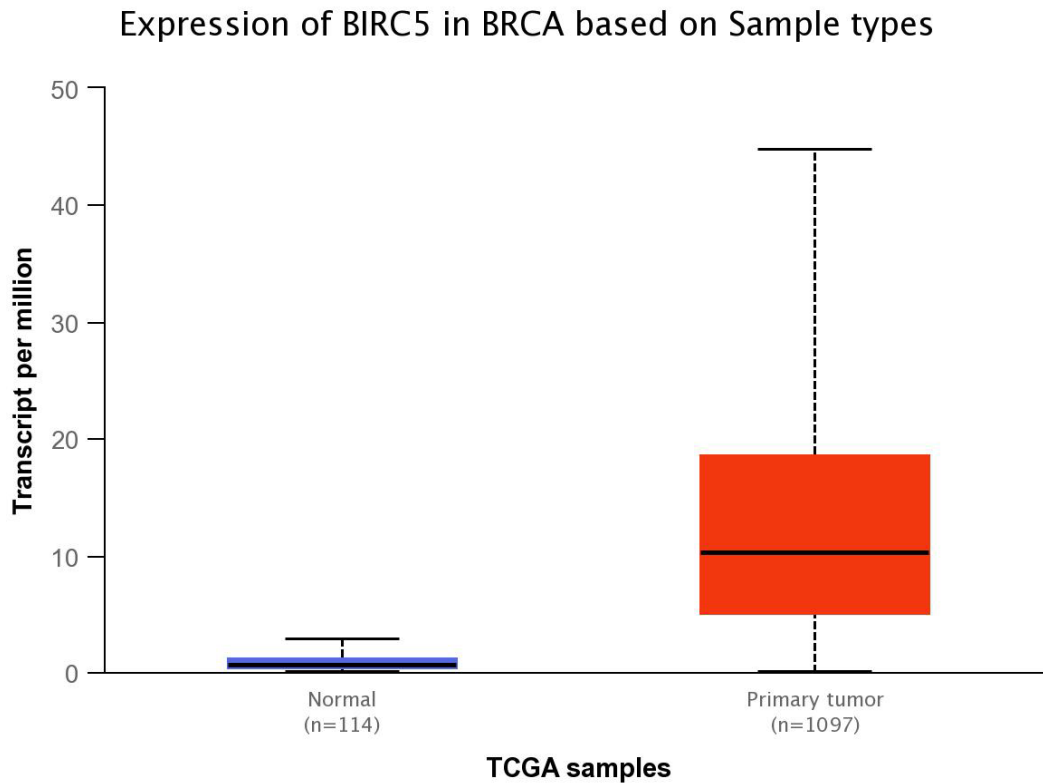
Εικόνα 12. Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν την επιβιωτίνη (BIRC5, survivin) (Kaplan-Meier plot of overall survival HR=hazard ratio).

Η συγκριτική ανάλυση στη βάση δεδομένων GTEx 1085 δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού και 291 φυσιολογικών δειγμάτων κατέδειξε μια σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου της επιβιωτίνης (BIRC5, surivin) στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης (BIRC5, surivin) σε φυσιολογικά δείγματα μαστού (N = 291) και σε δείγματα με καρκίνο του μαστού (BRCA) (N = 1085).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την έκφραση της επιβιωτίνης (BIRC5, survivin) σε φυσιολογικά δείγματα (N = 114) και σε δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού (N = 1097) (**Εικόνα 14**).

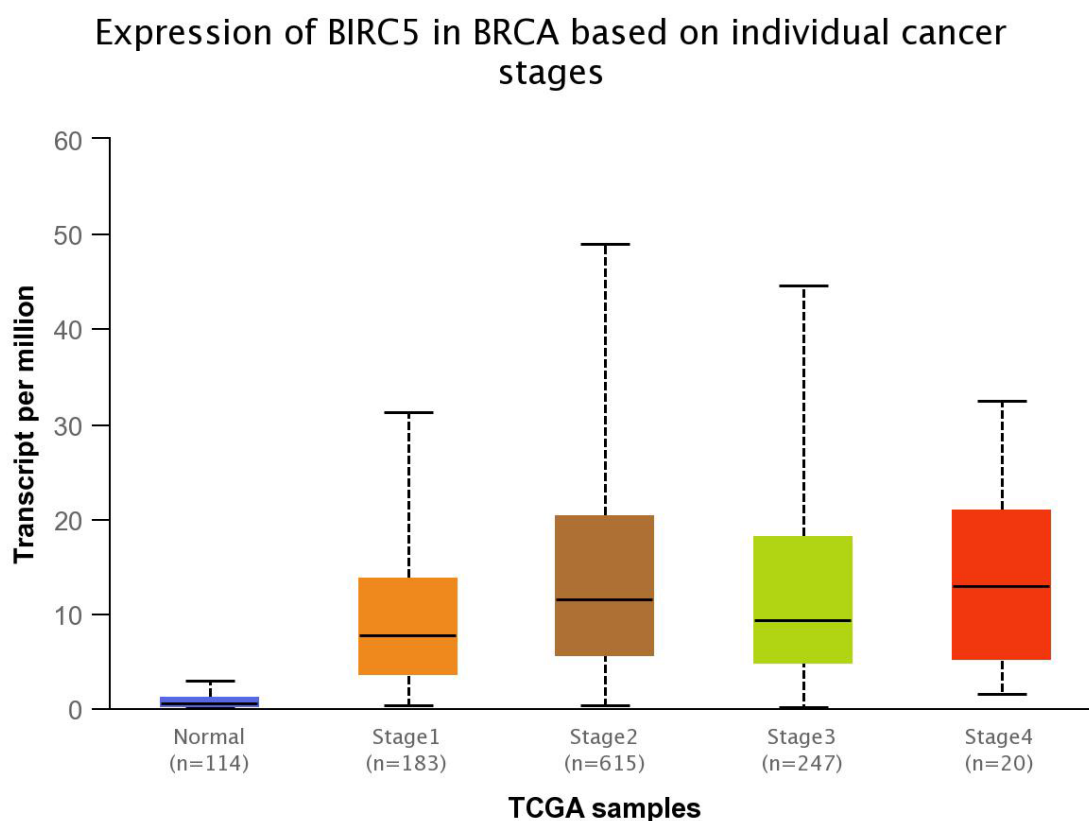


Comparison	Statistical significance
Normal-vs-Primary	<1E-12

Εικόνα 14. Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης (BIRC5, survivin) σε φυσιολογικά δείγματα μαστού (N = 114) και σε δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού (BRCA) (N = 1097).

Η συγκριτική ανάλυση στη βάση δεδομένων GTEx κατέδειξε ότι η επιβιωτίνη (BIRC5, survivin) έχει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού (**Εικόνα 14**).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε την έκφραση της επιβιωτίνης (BIRC5, survivin) σε φυσιολογικά δείγματα (N = 114) και σε δείγματα καρκίνου του μαστού διαφορετικών σταδίων (Στάδιο 1, N = 183; Στάδιο 2, N = 615; Στάδιο 3, N = 247; Στάδιο 4, N = 20) (Σύνολο = 1075) (**Εικόνα 15**).

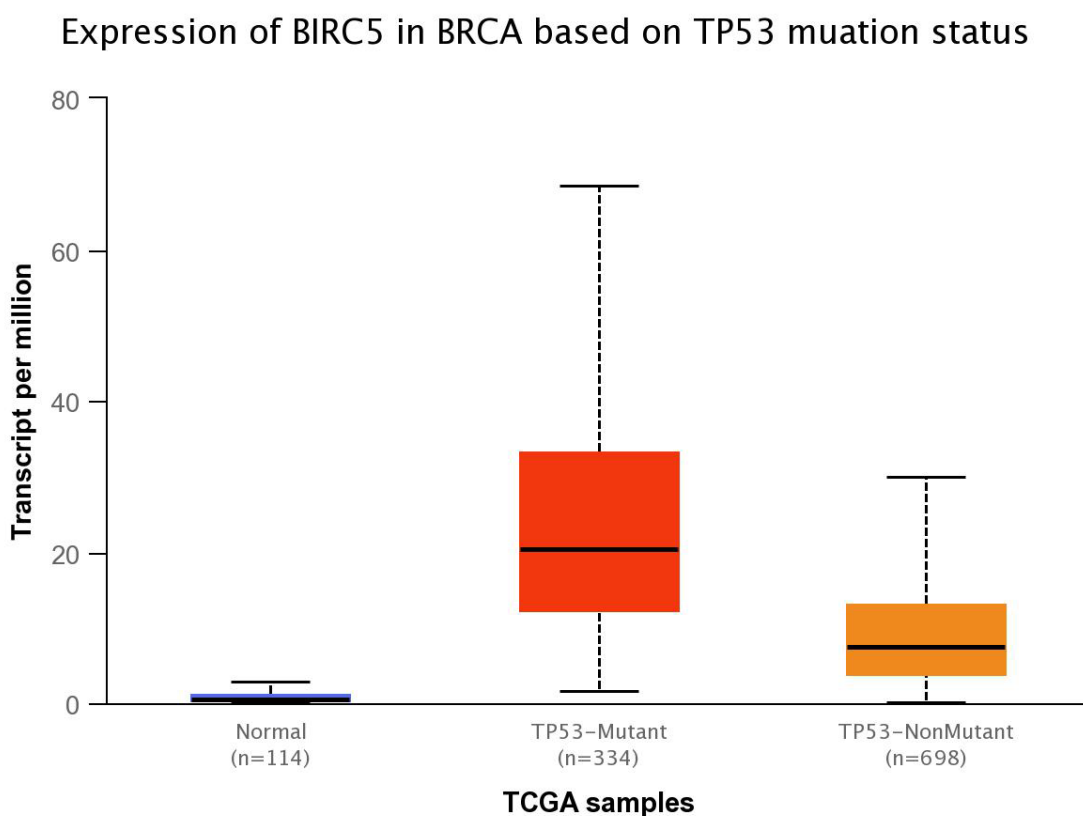


Comparison	Statistical significance
Normal-vs-Stage1	<1E-12
Normal-vs-Stage2	1.62E-12
Normal-vs-Stage3	1.62E-12
Normal-vs-Stage4	1.40E-04
Stage1-vs-Stage2	1.28E-10
Stage1-vs-Stage3	1.22E-03
Stage2-vs-Stage3	4.99E-02

Εικόνα 15. Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης (BIRC5, survivin) σε φυσιολογικά δείγματα (N = 114) και σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού διαφορετικών σταδίων.

Φαίνεται ότι υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές στην έκφραση της επιβιωτίνης μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων σταδίου 4, ή μεταξύ δειγμάτων και δειγμάτων σταδίου 1 και σταδίου 3 καθώς επίσης και μεταξύ δειγμάτων σταδίου 2 και σταδίου 3, όπου οι περισσότεροι προχωρημένοι όγκοι (μεγαλύτερου σταδίου) εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα επιβιωτίνης (**Εικόνα 15**).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε τη σχέση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης, (BIRC5, survivin) ως συνάρτηση μεταλλάξεων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα (**Εικόνα 16**).

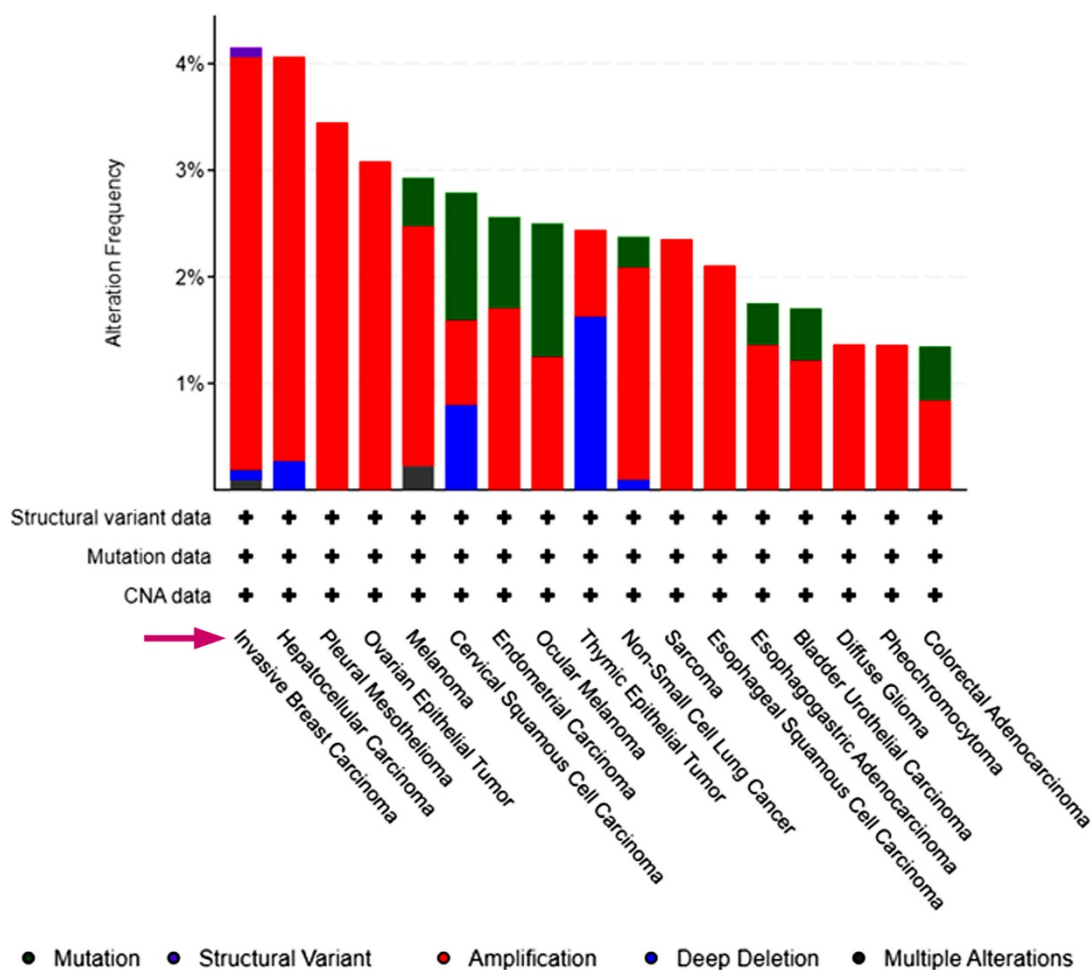


Comparison	Statistical significance
Normal-vs-TP53-Mutant	1.62E-12
Normal-vs-TP53-NonMutant	<1E-12
TP53-Mutant-vs-TP53-NonMutant	1.11E-16

Εικόνα 16. Βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης σε φυσιολογικά δείγματα (N = 114) και σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού ως συνάρτηση της κατάστασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* (μεταλλαγμένο ή φυσιολογικό) στον καρκίνο του μαστού (BRCA). Mutant = μεταλλαγμένο; Non-mutant = φυσιολογικό

Η ανάλυση κατέδειξε ότι όγκοι που έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια *TP53* εκφράζανε την επιβιωτίνη σε υψηλότερα επίπεδα από ότι οι όγκοι του μαστού χωρίς μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* ή τα φυσιολογικά δείγματα μαστού (**Εικόνα 16**).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε στη βάση δεδομένων τις αιτίες για τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης (*BIRC5*, *Survivin*) στον καρκίνο του μαστού (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17. Γονιδιακές αλλαγές υπεύθυνες για τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης (*BIRC5*, *Survivin*) στον καρκίνο του μαστού και σε σύγκριση και με άλλους τύπους καρκίνου.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**, η συχνότερη αιτία για τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *BIRC5* στον καρκίνο του μαστού είναι η γονιδιακή ενίσχυση (gene amplification).

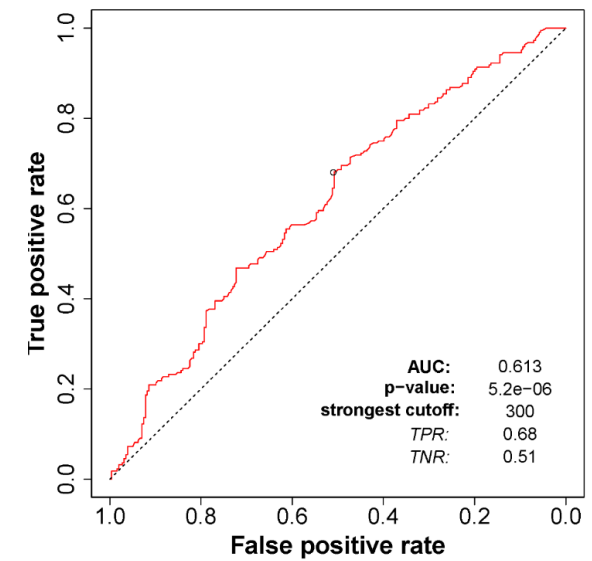
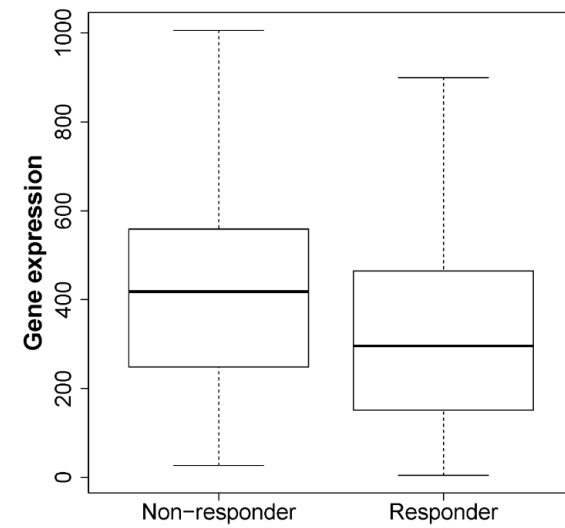
Settings	Parameter
1 Affy ID / Gene symbol	202094_at / BIRC5
2 Response based on	relapse-free survival at 5 years
3 Treatment	any chemotherapy

	N	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum
Responder	256	348	264	296	5	2233
Non-responder	220	441	274	418	27	1889

Result

	Result
AUC:	0.613
ROC p-value:	5.2e-06
Mann-Whitney test p-value:	2e-05
Fold change:	1.3

Εικόνα 18. Σχέση της έκφρασης της επιβιωτίνης (*BIRC5*) με την απόκριση τους στη χημειοθεραπεία. Οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του *BIRC5* αποκρίνονται καλύτερα στη χημειοθεραπεία.



Στη συνέχεια διερευνήσαμε στη βάση δεδομένων, αν υπάρχει σχέση μεταξύ της υπερέκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης (BIRC5, Survivin) και της απόκρισης στη χημειοθεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού (**Εικόνα 18**). Όπως φαίνεται, οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του BIRC5 αποκρίνονται καλύτερα στη χημειοθεραπεία.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καρκίνος του μαστού και ογκοκατασταλτικά γονίδια

1. Σποραδικός Καρκίνος (μη κληρονομικός καρκίνος)

Οι περισσότεροι καρκίνοι - 75% έως 80% - είναι σποραδικοί. Στον σποραδικό καρκίνο, οι γονιδιακές μεταλλάξεις που προκαλούν τον καρκίνο είναι επίκτητες (εμφανίζονται μόνο στα καρκινικά κύτταρα) και δεν κληρονομούνται.

2. Οικογενής καρκίνος

Ορισμένοι συνηθεις καρκίνοι, όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου, μπορεί να εμφανιστούν σε περισσότερα από ένα μέλη της ίδιας οικογένειας, αλλά δεν θεωρείται ότι είναι κληρονομικοί. Πολλά μέλη της οικογένειας στη μία πλευρά της οικογένειας μπορεί να διαγνωστούν με τον ίδιο καρκίνο, αλλά συνήθως ο καρκίνος εμφανίζεται σε μεταγενέστερες ηλικίες και δεν ακολουθεί τα ίδια πρότυπα που παρατηρούνται σε κληρονομικές περιπτώσεις. Παρόλο που οι οικογενείς καρκίνοι συγκεντρώνονται σε μια οικογένεια, ο καρκίνος δεν φαίνεται να προκαλείται από μια αλλαγή σε ένα γονίδιο. Αντίθετα, οι οικογενείς καρκίνοι πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα πολλαπλών επιρροών. Συνδυασμός πολλών γονιδίων και άλλων παραγόντων.

Συχνά δεν είναι δυνατό να εντοπιστούν τα ακριβή αίτια του καρκίνου σε τέτοιες οικογένειες και συνήθως δεν συνιστάται η γενετική εξέταση. Ωστόσο, τα μέλη της οικογένειας μπορεί να χρειάζονται νωρίτερα ή πιο συχνό έλεγχο για τον καρκίνο.

3. Κληρονομικός καρκίνος

Μόνον το 5% έως 10% όλων των καρκίνων είναι κληρονομικοί. Οι κληρονομικοί καρκίνοι αναπτύσσονται λόγω μιας γονιδιακής μετάλλαξης που υπάρχει από τη γέννηση. Συνήθως, η μετάλλαξη περνάει από τη μητέρα ή τον πατέρα στο παιδί. Εξαιτίας αυτού, υπάρχει συνήθως ένα αναγνωρίσιμο μοτίβο καρκίνου στη μία πλευρά της οικογένειας.

Ένα μικρό ποσοστό όλων των καρκίνων του μαστού συγκεντρώνεται σε οικογένειες, που περιγράφονται ως κληρονομικοί και σχετίζονται με κληρονομικές γονιδιακές μεταλλάξεις. Οι κληρονομικοί καρκίνοι του μαστού τείνουν να αναπτύσσονται νωρίτερα στη ζωή τους από τις μη κληρονομικές

(σποραδικές) περιπτώσεις και είναι πιθανότερο πρωτοπαθείς όγκοι να αναπτυχθούν και στους δύο μαστούς.

Η καρκινογένεση του μαστού μπορεί να περιγραφεί ως μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων στην οποία κάθε βήμα θεωρείται ότι συσχετίζεται με μία ή περισσότερες διακριτές μεταλλάξεις σε κύρια ρυθμιστικά γονίδια. Το ερώτημα που τίθεται είναι πόσο θα διαφέρει ένα μοντέλο προόδου πολλαπλών σταδίων για σποραδικό καρκίνο του μαστού από αυτό για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από μια κληρονομική ευαισθησία που οφείλεται σε μια ταυτοποιημένη μετάλλαξη στην αναπαραγωγική (βλαστική) σειρά σε ένα αλληλόμορφο γονίδιο ευαισθησίας υψηλής δείσδυσης, όπως *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *TP53* ή *PTEN*. Η απενεργοποίηση του δεύτερου αλληλόμορφου αυτών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων θα ήταν ένα πρώιμο γεγονός σε αυτό το ογκογόνο μονοπάτι (μοντέλο "δύο γεγονότων" του Knudson). Οι σποραδικοί καρκίνοι του μαστού προκύπτουν από μια διαδοχική σταδιακή συσσώρευση επίκτητων και μη επιδιορθωμένων μεταλλάξεων σε σωματικά γονίδια, χωρίς να παίζει ρόλο καμιά μετάλλαξη στην αναπαραγωγική (βλαστική) σειρά. Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων λόγω μεταλλάξεων, συχνά σε συνδυασμό με την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω ενός άλλου μηχανισμού, και όχι λόγω μετάλλαξης, όπως απαλοιφή του γονιδίου ή του χρωμοσώματος (απώλεια ετεροζυγωτίας, LOH), είναι πιθανά ένα πρώιμο συμβάν στους σποραδικούς όγκους. Ακολουθούν περισσότερες, ανεξάρτητες μεταλλάξεις σε τουλάχιστον τέσσερα ή πέντε άλλα γονίδια, η χρονολογική σειρά των οποίων είναι λιγότερο σημαντική. Ογκογονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί να παίζουν πρώιμο ρόλο στον σποραδικό καρκίνο του μαστού είναι τα *MYC*, *CCND1* (*Cyclin D1*) και *ERBB2* (*HER2/neu*). Σε σποραδικό καρκίνο του μαστού, η αδρανοποίηση των *BRCA1* και *BRCA2* λόγω μεταλλάξεων είναι σπάνια, καθώς η αδρανοποίηση απαιτεί τη μετάλλαξη ή την πλήρη απαλοιφή και των δύο αντιγράφων των γονιδίων. Ωστόσο, η λειτουργική καταστολή θα μπορούσε να προκύψει από διάφορους μηχανισμούς εκτός μεταλλάξεων, όπως η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1* [83] ή η δέσμευση του *BRCA2* από το EMSY [84]. Στη σποραδική ογκογένεση του μαστού, έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί που αφορούν συγκεκριμένα μονοπάτια κατά την πρόοδο και εξέλιξη του όγκου, με την καρκινογένεση του μαστού να είναι

διαφορετική στο πορογενές καρκίνωμα έναντι του λοβιακού καρκινώματος και στο καλά διαφοροποιημένο έναντι του αδιαφοροποίητου πορογενούς καρκινώματος. Έτσι, διαφορετικά μονοπάτια καρκίνου του μαστού εμφανίζονται νωρίς στη διαδικασία της καρκινογένεσης, οδηγώντας τελικά σε κλινικά διαφορετικούς τύπους όγκων. Καθώς οι μεταλλάξεις που δημιουργούνται νωρίς κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης θα υπάρχουν σε όλα τα μεταγενέστερα στάδια, το προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιώντας τεχνικές ανάλυσης μικροσυστοιχιών DNA μπορεί να βοηθήσει στην ταξινόμηση των καρκίνων του μαστού σε κλινικά σχετικούς υποτύπους [85].

Η μετάσταση του καρκίνου του μαστού φαίνεται να ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση και την ισορροπία μεταξύ γονιδίων που την προάγουν (Ras, MEK1, PKC, οστεοποντίνη, χημειοελκυστικά, πρωτεΐνάσες, μόρια προσκόλλησης) και γονιδίων που την καταστέλλουν (E-cadherin, Nm23, TIMPs, KAI1, KiSS1, Maspin, Mkk4, BRMS1) [86].

Μεταξύ των δεκατεσσάρων γνωστών γονιδίων καταστολής της μετάστασης (Metastasis-Suppressor Genes; MSG), το *KiSS-1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη τη μεταστατίνη που είναι το μόνο πρωτεϊνικό προϊόν που αλληλεπιδρά με έναν επιφανειακό υποδοχέα τον KiSS-1R και θεωρείται ότι δρα στις όψιμες φάσεις της μεταστατικής διαδικασίας αποτρέποντας την ανάπτυξη της μεταστατικής εναπόθεσης, σε αντίθεση με τα MSG (Nm23 και CD82/KAI1) που δρουν στα πρώιμα στάδια της μετάστασης και καταστέλλουν την αποκόλληση των κυττάρων και τη μετανάστευση τους από τον πρωτογενή όγκο [87].

Έκφραση και ρόλος του γονιδίου της μεταστατίνης, KiSS1

Το γονίδιο *KiSS1* αποτελείται από τέσσερα εξόνια, με τα δύο πρώτα εξόνια να μην μεταφράζονται. Το εξόνιο III περιέχει τη θέση έναρξης της μετάφρασης η οποία ακολουθείται από μια αλληλουχία 103 βάσεων και η οποία μεταφράζεται. Το εξόνιο IV, που είναι το μεγαλύτερο, αποτελείται από μια αλληλουχία 335 βάσεων η οποία μεταφράζεται και μια αλληλουχία 121 βάσεων η οποία δεν μεταφράζεται [28]. Επιλέξαμε να εξετάσουμε τα εξόνια III και IV για μεταλλάξεις, καθώς μόνον αυτά κωδικοποιούν την πρωτεΐνη KiSS1 πλήρους μήκους, ενώ

αξιολογήσαμε τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου ποσοτικοποιώντας το mRNA που προέρχεται από τα εξόνια I και II.

Η πρωτεΐνη μεταστατίνη (KiSS1), η οποία αποτελείται από 145 αμινοξέα, υφίσταται μετα-μεταφραστική διάσπαση σε διβασικές θέσεις όπως τα R⁶⁶-R και K¹²³-R με αποτέλεσμα την παραγωγή του ενεργού πεπτιδίου μήκους 54 αμινοξέων που ονομάζεται μεταστίνη ή κισπεπτίνη-54 (KP54). Αυτή η υδρόφοβη πρωτεΐνη 145-αμινοξέων περιέχει μια επικράτεια η οποία φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), μια σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης, μια περιοχή πλούσια σε πολυπρολίνη (συνδέτης SH3) και μια σειρά από πρότυπες αμινοξικές αλληλουχίες (μοτίβα) σημαντικές για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Πολλά μικρότερα προϊόντα, που ονομάζονται συλλογικά κισπεπτίνες (KiSSpeptins), τα οποία προκύπτουν από φυσική πρωτεολυτική διάσπαση, διατηρούν τα τελευταία 10 καρβοξυ-τελικά αμινοξέα και δεσμεύουν τον υποδοχέα GPR54 ή AXOR12 ή hOT7T175 για να επιτευχθούν αποτελεσματικά οι δράσεις της πρωτεΐνης KiSS-1 [32,86,87, 88].

Η πρωτεΐνη KiSS1 εκφράζεται φυσιολογικά στον πλακούντα, στους όρχεις, στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό, υποδηλώνοντας ένα ρόλο στη ρύθμιση της τροφοβλαστικής διήθησης, της εφηβικής και νευροενδοκρινικής ανάπτυξης [87,88,89].

Τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης υποδηλώνουν ότι είναι ένα εκκρινόμενο νευροπεπτίδιο που δρα στα κύτταρα στόχους ενδοκρινικά ή παρακρινικά μέσω του υποδοχέα KiSS-1R (hOT7T175, AXOR12, GPR54) συζευγμένου με πρωτεΐνη G στις κυτταρικές επιφάνειες, και ο οποίος δρα μέσω των σηματοδοτικών πορειών cAMP και PI3K [90].

Τα δεδομένα *in vitro* που ταυτοποιούν το γονίδιο *KiSS-1* ως πιθανό κατασταλτικό του όγκου γονίδιο (MSG) επιβεβαιώθηκαν όταν παρατηρήθηκε καταστολή της κυτταρικής διείσδυσης και μετάστασης σε αθυμικά ποντίκια καρκινικών κυτταρικών σειρών του μελανώματος, του μαστού και της ουροδόχου κύστης, τα οποία είχαν διαμολυνθεί με το KiSS-1 cDNA ή το χρωμόσωμα 6 [33,34,38,43].

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MDA-MB-435 και του μελανώματος C8161 και MelJuSo ήταν μεταξύ των πρώτων που αναφέρθηκαν ότι δεν εκφράζανε το γονίδιο *KiSS-1*. Η διαμόλυνση τους με το

KiSS-1 cDNA είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή του μεταστατικού φαινοτύπου τους [35].

Στην παρούσα διατριβή, ελέγχθηκαν πέντε κοινές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που εκφράζανε KiSS-1 και βρέθηκε ότι δύο από αυτές, η ανθρώπινη καρκινική σειρά αδενοκαρκινώματος του μαστού MCF-7 και του πνεύμονα A549 έφεραν την ίδια υποκατάσταση P81R (242C>G). Αυτή η υποκατάσταση έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός ουδέτερου, υδρόφοβου αμινοξέος (προλίνη; P) από ένα πολικό, υδρόφιλο (αργινίνη; R), μια αλλαγή με σημαντική δομική επίδραση καθώς τροποποιεί την τριτοταγή στερεοτακτική δομή της πρωτεΐνης KiSS-1.

Εάν αυτή η τροποποίηση αποδειχθεί ότι αδρανοποιεί την πρωτεΐνη, η απώλεια λειτουργίας ενός MSG θα μπορούσε να επιτρέψει στα κακοήθη κύτταρα να μεταβάλλουν το φαινότυπο τους σε ένα φαινότυπο «ικανό για μετάσταση» που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα μετανάστευσης, επιβίωσης στη λεμφική / φλεβική κυκλοφορία, διείσδυσης στους περιοχικούς λεμφαδένες και ανάπτυξη όγκου σε άλλες θέσεις (μετάσταση). Λαμβάνοντας υπόψη τα διαθέσιμα αποδεικτικά στοιχεία *in vitro* και την περιορισμένη κλωνική προέλευση των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, η ανάλυση της μετάλλαξης του γονιδίου *KiSS-1* και της έκφρασής του θα είχε νόημα σε μια προκαταρκτική ομάδα εξαιρεσίμων καρκίνων του μαστού, ώστε να εκτιμηθεί η συχνότητα εμφάνισης και η κλινική σημασία της.

Στη συνέχεια σε αναδρομικές αναλύσεις ασθενών με μελάνωμα, γαστρικό καρκίνο, καρκίνο του οισοφάγου, του παγκρέατος, του ενδομητρίου και της ουροδόχου κύστης, βρέθηκε ότι η χαμηλή έκφραση του KiSS-1 mRNA ή της πρωτεΐνης συσχετίζεται με διήθηση αγγείων, προχωρημένο στάδιο νόσου, εμφάνιση υποτροπής και μετάσταση [36,37,40,41,91]. Καταδείχτηκε ότι οι εγκεφαλικές μεταστάσεις από τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα του KiSS-1 mRNA και της πρωτεΐνης σε σύγκριση με τους αντίστοιχους πρωτογενείς όγκους και τους φυσιολογικούς ιστούς [47,92].

Τα μοριακά μονοπάτια μέσω των οποίων η πρωτεΐνη KiSS-1 ασκεί τις αντι-μεταστατικές της δράσεις δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί [92,93,50]. Το σύστημα KiSS-1/KiSS-1R συζευγμένο με Gαq/11 ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC). Η ενεργοποίηση PLC προάγει η υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής

φωσφατιδυλινοσιτόλης η οποία, με τη σειρά της, οδηγεί στην παραγωγή «δεύτερων αγγελιοφόρων» (second messengers) μορίων, την ινοσιτόλη-1,4,5-τριφωσφορική (IP3) και τη διακυλογλυκερόλη (DAG). Η ενεργοποίηση της DAG οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, (PKC) και της φωσφορυλίωσης ERK1/2 και p38, ενώ η IP3 προκαλεί απελευθέρωση ενδοκυτταρικού Ca^{2+} [50].

Η αυξορρύθμιση της έκφρασης της E-καντερίνης, η μείωση της έκφρασης της μεταλλοπρωτεάσης 9 της εξοκυττάριας θεμέλιας ουσίας (MMP9), η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η ρύθμιση ενεργότητας της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK), η αυξημένη ενδοκυτταρική απελευθέρωση ασβεστίου και η αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C έχουν αναφερθεί ως αποτελέσματα της ενεργοποίησης του *KiSS-1*. Άλλες ερευνητικές ομάδες παρατήρησαν παρεμπόδιση της σηματοδοτικής πορείας PI3K-AKT μονοπατιού από την *KiSS-1* με αποτέλεσμα την πρόκληση απόπτωσης και την αναστολή της CXCR4-διαμεσολαβούμενης χημειοταξίας των νεοπλασματικών κυττάρων. Παρατηρήθηκε επίσης μερική καταστολή της σηματοδοτικής πορείας των MAPK και καταστολή του NF-κB p50/p65 κατά την έκφραση της *KiSS-1* σε καλλιέργειες νεοπλασματικών κυττάρων [93,94].

Στη παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκαν τα υπάρχοντα προκαταρκτικά δεδομένα σχετικά με τη σημασία της απώλειας της λειτουργίας του κατασταλτικού γονιδίου της μετάστασης *KiSS-1* σε κακοήθεις κλώνους με δυνατότητα μετάστασης. Επιπλέον, συνεχίσαμε την ανάλυση προκειμένου να χαρακτηρίσουμε τους δύο εμπλεκόμενους μηχανισμούς: την ταυτοποίηση μιας αδρανοποιητικής μετάλλαξης και την μειορρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *KiSS-1*.

Στη μελέτη μας, αναφέρουμε για πρώτη φορά την ταυτοποίηση μιας μετάλλαξης του γονιδίου *KiSS-1* στον καρκίνο του μαστού, που πιθανά οδηγεί στην απώλεια της λειτουργίας του. Περιγράφουμε επίσης την επίπτωση και την πιθανή κλινική σημασία μιας απλής αντικατάστασης νουκλεοτιδίου 242C>G στο εξόνιο IVa του γονιδίου *KiSS-1*.

Αυτή η μεταβολή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι η ίδια που περιγράφεται ως 391C>G στη βάση δεδομένων NCBI SNP Databank.

Η γενετική αυτή αλλαγή ταυτοποιήθηκε μόνον στο 4% των όγκων του μαστού των ασθενών της μελέτης. Η ίδια αντικατάσταση ανιχνεύθηκε επίσης και στα

λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε 3 από τις 5 ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έφεραν την μετάλλαξη στο δείγμα του όγκου τους .

Αυτή η σημειακή μετάλλαξη αλλάζει ένα κωδικόνιο CCC σε CGC, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος προλίνη από το πολικό, υδρόφιλο αμινοξύ αργινίνη (P81R) και κατά συνέπεια στην τροποποίηση της τριτοταγούς στερεοτακτικής δομής της πρωτεΐνης KiSS-1. Αυτό θα μπορούσε να έχει ως επακόλουθο την αδρανοποίηση της πρωτεΐνης, επιτρέποντας στα κακοήγη κύτταρα να εξαλλαχθούν σε κύτταρα με έντονη μεταστατική διάθεση, όπως συζητήθηκε παραπάνω.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης KiSS-1 ήταν κυτταροπλασματική και σημαντικά μειωμένη στα περισσότερα από τα 50 δείγματα των όγκων σε αντίθεση με το ότι συμβαίνει στους φυσιολογικούς ιστούς. Αυτή η παρατήρηση συμβαδίζει με την ασθενή κυτταροπλασματική χρώση που επιδεικνύεται από γαστρικούς όγκους και τις εγκεφαλικές μεταστάσεις καρκινικών κυττάρων του μαστού, καθώς και με τα μειωμένα επίπεδα KiSS-1 mRNA που ανιχνεύθηκαν με την τεχνική RT-PCR στην ομάδα επικύρωσης. Άλλες μελέτες μπορεί να ανέφεραν μέτρια έως ισχυρή χρώση της KiSS-1 σε πρωτογενείς όγκους του μαστού, τονίζοντας όμως ότι μπορεί να οφείλεται στην ετερογένεια των κακοηθών όγκων ή και σε πιθανά τεχνικά ζητήματα. Καθώς η εμπειρία με την ανοσοϊστοχημική χρώση της KiSS-1 είναι περιορισμένη, η επίδραση της μετάλλαξης 242C σε G στην ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης είναι επί του παρόντος άγνωστη.

Με βάση τα ευρήματα μας, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι μπορεί να υπάρξει μειορρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου και ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη μπορεί να είναι λιγότερο ανοσο-αντιδρούσα από την πρωτεΐνη αγρίου-τύπου.

Στην ευρύτερη ομάδα των 272 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, το 97% αυτών δεν είχε ανιχνεύσιμα επίπεδα KiSS-1mRNA προερχόμενο από τα εξόνια I ή II του γονιδίου *KiSS-1*. Αυτή η έντονη μειορρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου ανιχνεύθηκε σε μια ομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου που είχαν καρκίνο μαστού με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Στην πραγματικότητα, το 76% των ασθενών της μελέτης είχαν τέσσερις ή περισσότερους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες, πρόκειται δηλαδή για ασθενείς δυνητικά με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μεταστατικής νόσου.

Αυτά τα ευρήματα θα μπορούσαν να υποδηλώσουν ότι η λειτουργική αποσιώπηση του γονιδίου καταστολής της μετάστασης *KiSS-1* είναι συνήθης και λαμβάνει χώρα σε ορισμένους πρωτοπαθείς καρκίνους του μαστού ήδη από τα πρώιμα στάδια της νόσου, με αποτέλεσμα να τους δίνεται το πλεονέκτημα για μικρομεταστατική διάδοση. Η αποσιώπηση ενός MSG θα μπορούσε να επιτρέψει στα κακοήθη κύτταρα να εκφράσουν ένα φαινότυπο «ικανό για μετάσταση» που χαρακτηρίζεται από μετανάστευση, επιβίωση στη λεμφική / φλεβική κυκλοφορία, διείσδυση σε περιφερειακούς λεμφαδένες και ανάπτυξη σε δευτερεύουσες θέσεις. Η παρατήρησή μας συμβαδίζει με δημοσιευμένα ευρήματα των μειωμένων επιπέδων *KiSS-1* mRNA σε συμπαγείς όγκους προηγμένου σταδίου.

Πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ομόζυγη απαλοιφή και τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *KiSS-1*, αλλά και την απώλεια ή απενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που απαιτούνται για τη μεταγραφή του γονιδίου *KiSS-1*.

Έχει αποδειχθεί ότι η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου *KiSS-1* απαιτεί τη δέσμευση του μεταγραφικού συμπλόκου Activator Protein-2 άλφα (AP2α) / Specificity Protein-1 (Sp1) σε θέσεις δέσμευσης του Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου *KiSS-1* [46]. Ο μεταγραφικός παράγοντας AP2α κωδικοποιείται από ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p, και η απαλοιφή του εμπλέκεται στην απώλεια της ρύθμισης των ογκογονιδίων και στην ογκογένεση. Είναι ενδιαφέρον ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 6 έχει συσχετιστεί με την απώλεια της έκφρασης του *KiSS-1* και την εμφάνιση μεταστάσεων σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου και σε περιπτώσεις μελανώματος, ενώ αντίστοιχα η εισαγωγή ενός ανέπαφου χρωμοσώματος 6 σε κυτταρικές σειρές μελανώματος βρέθηκε ότι καταστέλλει τη μετάσταση τους [35].

Αξίζει να σημειωθεί ότι στον πληθυσμό των ασθενών μας, η μεταγραφή του *KiSS-1* δεν συσχετίζονταν με τη μεταγραφή άλλων γονιδίων όπως αυτών της επιβιωτίνης, της γλυκοδελίνης, του HER2, του p53 ή του BCL2, υποδηλώνοντας έτσι, ότι η κατασταλτική δράση της μεταστατίνης (*KiSS-1*) μπορεί να επηρεαστεί ανεξάρτητα από αυτά τα βασικά ρυθμιστικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου.

Το υψηλό ποσοστό των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών στην ομάδα που εξέφραζε το *KiSS-1* μπορεί να προσφέρει μια βιολογική εξήγηση στην πιο απρόβλεπτη συμπεριφορά του καρκίνου του μαστού της ομάδας αυτής σε σύγκριση με την ομάδα των νεότερων γυναικών. Δυστυχώς, το μικρό μέγεθος των όγκων που μελετήθηκαν και που βρέθηκε να εκφράζουν το *KiSS-1* δεν επιτρέπει αξιόπιστη ανάλυση της προγνωστικής του σημασίας.

Σε αντίθεση με τα ευρήματά μας, υπάρχει μελέτη που αναφέρει την παρουσία από αυξημένα επίπεδα του *KiSS-1* mRNA και της πρωτεΐνης του σε καρκινώματα μαστού από 124 ασθενείς. Ειδικότερα πρόκειται για ασθενείς με όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας, με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, από τη μελέτη των οποίων κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση το *KiSS-1* σχετίζεται με κακή πρόγνωση και μεταστατική διάδοση [44].

Όμως, η παραπάνω αντίθεση των ευρημάτων θα μπορούσε να ερμηνευθεί σύμφωνα με τα παρακάτω: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές, για την ανάλυση της έκφρασης του mRNA με RT-PCR μπορεί να έχουν πλαισιώσει διαφορετικές αλληλουχίες, καθιστώντας έτσι δυσμενή την ερμηνεία των διαφορετικών αποτελεσμάτων.

Πρέπει επίσης να λάβουμε υπ' όψη μας, ότι η ανοσοϊστοχημεία της μελέτης πραγματοποιήθηκε σε τομές κρουστάτη που μπορεί να περιέχουν πάνω από 50% υγιή ιστό, ενώ το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν ειδικό.

Τέλος, θα πρέπει να εξεταστεί η δυνατότητα ανίχνευσης mRNA του μεταλλαγμένου ανενεργού γονιδίου του *KiSS-1*. Πράγματι, όπως ανέφεραν οι συγγραφείς του άρθρου, μειωμένα επίπεδα του υποδοχέα *KiSS1* συσχετίστηκαν με δυσμενή έκβαση στις 124 ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Παρουσιάζουμε για πρώτη φορά δεδομένα που καταδεικνύουν τη δομική ή λειτουργική απενεργοποίηση του γονιδίου *KiSS-1* σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν προκλινικά και κλινικά στοιχεία που έχουν δημοσιευτεί στο παρελθόν και παρέχουν περαιτέρω στοιχεία υποστηρίζοντας τον ρόλο του γονιδίου *KiSS-1* ως καταστολέα της μετάστασης.

Η επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων και η ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου *KiSS-1* και σε άλλους συμπαγείς όγκους είναι αναγκαία, καθώς αυτή η μοριακή μεταβολή φαίνεται να συμβαίνει σχετικά στα πρώιμα στάδια

ανάπτυξης του όγκου. Η κλινική έρευνα για την ανάπτυξη αγωνιστών MSG ή άλλων προσεγγίσεων με σκοπό την αποκατάσταση της λειτουργίας του *KiSS-1* είναι πολύ υποσχόμενη σε σχέση με την παρεμπόδιση της μικρομεταστατικής ανάπτυξης και της κακοήθους υποτροπής των όγκων στους πάσχοντες από καρκίνο.

Έκφραση και ρόλος του γονιδίου της γλυκοδελίνης

Η γλυκοδελίνη, επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη του πλακούντα 14 (PP14) και πρωτεΐνη του ενδομητρίου που σχετίζεται με την προγεστερόνη (PAEP), είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 24 kDa που εκφράζεται συνήθως σε ιστούς που ελέγχονται από τα στεροειδή του αναπαραγωγικού συστήματος (ενδομήτριο, σπερματοδόχες κύστεις). Η γλυκοδελίνη, που ανήκει στην οικογένεια των λιποκαλινών, παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και αποτελεί δείκτη για την υποδεκτικότητα αυτού.

Η πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε φυσιολογικά και νεοπλασματικά αδενικά κύτταρα του μαστού, των ιδρωτοποιών αδένων, των παραβρογχικών αδένων, του παγκρέατος καθώς και στα άωρα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η γλυκοδελίνη βρέθηκε ότι έχει ανοσοκατασταλτικές και αντισυλληπτικές ιδιότητες [53, 61].

Η γλυκοδελίνη καταστέλλει την κυτταρολυτική δραστηριότητα των ανθρώπινων φυσικών φονικών κυττάρων (NKcells) και αναστέλλει τη σύνδεση των σπερματοζωαρίων με τη διαυγή ζώνη των ωοκυττάρων [52].

Τα τελευταία χρόνια αντιφατικά δεδομένα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία σχετικά με τον λειτουργικό ρόλο της γλυκοδελίνης σε κακοήθεις ιστούς. Οι Jeschke και συνεργάτες κατέδειξαν ότι η γλυκοδελίνη είναι ένας αποτελεσματικός αναστολέας της διαμεσολαβούμενης από την E-σελεκτίνη κυτταρικής προσκόλλησης *in vitro*, γεγονός που υποδηλώνει τον σημαντικό ρόλο της στην καρκινογένεση και στο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων [95].

Οι Song και συνεργάτες ανέφεραν ότι η γλυκοδελίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση του καρκινικού ιστού, ενώ ανοσοϊστοχημικά και μοριακά δεδομένα κατέδειξαν την σχεδόν καθολική έκφραση της

γλυκοδελίνης στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού καθώς και αυξημένη έκφραση αυτής στον καρκίνο των ωοθηκών και του ενδομητρίου [72,75,77].

Στη μελέτη μας, η έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης παρατηρήθηκε μόνο σε ένα μικρό αριθμό του πληθυσμού των ασθενών υψηλού κινδύνου με καρκίνο του μαστού, όπως σε ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες (25%) και γενικότερα συσχετίστηκε με ανεπιθύμητα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά.

Η έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης παρατηρήθηκε συχνότερα σε νεότερες, προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με όγκους θετικούς στην έκφραση της επιβιωτίνης και του HER2. Αν και η συσχέτιση της έκφρασης γλυκοδελίνης με την υπερέκφραση του HER2 ήταν η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Επιπλέον, η έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης παρατηρήθηκε τόσο σε ορμονο-θετικούς (22%) όσο και σε ορμονο-αρνητικούς (33%) όγκους, παρότι η έκφρασή της ανιχνεύεται συνήθως σε φυσιολογικούς ιστούς που ανταποκρίνονται στα στεροειδή και επάγονται από την προγεστερόνη [70]. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να υποδηλώνει την ενεργοποίηση της έκφρασής της στους νεοπλασματικούς ιστούς. Αν και αυτές οι παρατηρήσεις μας ευνοούν τον ρόλο της γλυκοδελίνης ως ενός παράγοντα ανάπτυξης του όγκου, άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει δεδομένα που καταδεικνύουν ένα λειτουργικό της ρόλο ως καταστολέα της ογκογένεσης. Η ογκοκατασταλτική δράση της έκφρασης της γλυκοδελίνης σε πρωτεϊνικό επίπεδο και επίπεδο mRNA στους ιστούς αναφέρεται διότι φαίνεται ότι μειώνεται κατά τη νεοπλασματική εξέλιξη από τους φυσιολογικούς ιστούς στους εντοπισμένους όγκους και τελικά στη συστηματική νόσο [96].

Η επιμόλυνση με το cDNA της γλυκοδελίνης σε κυτταρικές καλλιέργειες από καρκίνο του μαστού κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό τους και επήγαγε προς ένα διαφοροποιημένο επιθηλιακό αδενικό φαινότυπο.

Η διαφορική γλυκοζυλίωση του σκελετού της πρωτεΐνης της γλυκοδελίνης θα μπορούσε να επιφέρει ένα διπλό λειτουργικό ρόλο αυτής, που εξαρτάται τόσο από τη σύσταση σε κυτταροκίνες του μικροπεριβάλλοντος, όσο και την παρουσία εναλλακτικών μορφών ματίσματος μεταξύ φυσιολογικών και κακοηθών ιστών [97]. Όλα τα παραπάνω θα ήταν δυνατό να οδηγήσουν στα αντίθετα δημοσιευμένα αποτελέσματα.

Έκφραση και ρόλος του γονιδίου της επιβιωτίνης

Η επιβιωτίνη (Survivin ή BIRC5) εντοπίζεται σε χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στους φυσιολογικούς ιστούς, όπου ρυθμίζει τη μίτωση και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπασών [98, 99]. Είναι ένα από τα γονίδια που αυξορρυθμίζονται στους καρκινικούς ιστούς και είναι απαραίτητο για την αύξηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων μέσω της καταστολής της απόπτωσης [100]. Ειδικότερα η επιβιωτίνη καταστέλλει βλάβες του DNA που πιθανά επάγονται από την ενεργοποίηση της διαδικασίας της αυτοφαγίας σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού [101].

Η υψηλή έκφραση της επιβιωτίνης έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση ασθενών σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Οι Span και συνεργάτες, και οι Ryan και συνεργάτες επιβεβαίωσαν την ανεπιθύμητη προγνωστική σημασία των επιπέδων του mRNA της επιβιωτίνης με τη χρήση της RT-PCR σε ομάδες 275 και 420 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, αντίστοιχα [102, 103].

Η έκφραση της επιβιωτίνης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται και αυξάνεται από τις ογκοπρωτεΐνες HER2, STAT3, COX2, BCL2 σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, ενώ με τη σειρά της επάγει προ-αγγειογενετικές κυτταροκίνες (VEGF, ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης) οι οποίες είναι βασικές για τη διεργασία της νεο-αγγειογένεσης [103, 104, 105].

Στην παρούσα διατριβή καταδείξαμε την καθολική μεταγραφή του mRNA της επιβιωτίνης στην ομάδα των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού (97%). Τα αποτελέσματα δε θα πρέπει να προκαλούν έκπληξη, αν λάβουμε υπόψη ότι οι ασθενείς πάσχουν από καρκίνο του μαστού και θεωρούνται υψηλού κινδύνου για εμφάνιση μεταστατικής νόσου. Το 99% των ασθενών είχαν διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες, με το 77% αυτών να έχουν 4 ή περισσότερους θετικούς λεμφαδένες και το 70% των πρωτοπαθών όγκων να είναι μεγαλύτεροι από 2εκ. Από τη βιβλιογραφία όπως αναφέρουν ο Vasaturo και συνεργάτες παρατηρείται αυξορύθμιση της μεταγραφής της επιβιωτίνης στους κακοήθεις όγκους μαστού σε σύγκριση με τα αδενώματα μαστού, ενώ οι Ryan και συνεργάτες αναφέρουν μια ισχυρή συσχέτιση της μεταγραφής της επιβιωτίνης με την παρουσία μεταστάσεων στους λεμφαδένες [103, 106].

Σύμφωνα με τη μελέτη μας, η μεταγραφή της επιβιωτίνης συσχετίστηκε με την έκφραση mRNA του VEGF, mRNA του p53, τον υψηλό βαθμό πυρηνικής

ατυπίας και με όγκους με μέγεθος μεγαλύτερο των 2εκ, αν και η τελευταία συσχέτιση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

Συγκριτική βιοπληροφορική ανάλυση στη βάση δεδομένων GTE_x 1085 δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού και 291 φυσιολογικών δειγμάτων κατέδειξε μια σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου της επιβιωτίνης (*BIRC5*, *survivin*) στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού (**Εικόνα 13**).

Επίσης, η βιοπληροφορική συγκριτική ανάλυση στη βάση δεδομένων GTE_x της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης σε φυσιολογικά δείγματα μαστού (N = 114) και σε δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού (*BRCA*) (N = 1097) κατέδειξε ότι η επιβιωτίνη έχει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού (**Εικόνα 14**).

Μια περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της έκφραση της *επιβιωτίνης* σε φυσιολογικά δείγματα (N = 114) και σε δείγματα καρκίνου του μαστού διαφορετικών σταδίων (Στάδιο 1, N = 183; Στάδιο 2, N = 615; Στάδιο 3, N = 247; Στάδιο 4, N = 20) (Σύνολο = 1075) κατέδειξε ότι υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές στην έκφραση της επιβιωτίνης μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων σταδίου 4, ή μεταξύ δειγμάτων και δειγμάτων σταδίου 1 και σταδίου 3 καθώς επίσης και μεταξύ δειγμάτων σταδίου 2 και σταδίου 3, όπου οι περισσότεροι προχωρημένοι όγκοι (μεγαλύτερου σταδίου) εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα επιβιωτίνης (**Εικόνα 15**).

Διερευνήσαμε επίσης στη βάση δεδομένων τις γονιδιακές αλλαγές που πιθανά να είναι υπεύθυνες για τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου της επιβιωτίνης στον καρκίνο του μαστού, αλλά και σε σύγκριση και με άλλους τύπους καρκίνου. Οι αναλύσεις κατέδειξαν ότι η συχνότερη αιτία για τη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου *BIRC5* στον καρκίνο του μαστού είναι η γονιδιακή ενίσχυση (*gene amplification*) (**Εικόνα 17**).

Προϋπάρχουσες μελέτες κατέδειξαν την αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της επιβιωτίνης από του άγριου-τύπου p53 και υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης της επιβιωτίνης παρουσία των μεταλλαγμένων μορφών της p53 [107,108].

Τα ευρήματα μας σχετικά με της συσχέτιση της έκφρασης της επιβιωτίνης με την έκφραση της άγριου-τύπου p53 μπορεί να υποδηλώνουν την παρουσία ενός άγνωστου ελλείμματος στο μηχανισμό ελέγχου της λειτουργίας του p53,

που έχει ως αποτέλεσμα η επαγόμενη p53 να αποτυγχάνει να ελέγξει την έκφραση της επιβιωτίνης.

Η σχέση της έκφρασης της επιβιωτίνης με την κατάσταση του γονιδίου TP53 στον καρκίνο του μαστού επιβεβαιώθηκε και από τη βιοπληροφορική ανάλυση σε δημόσιες βάσεις δεδομένων. Η ανάλυση αυτή κατέδειξε ότι όγκοι που έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια TP53 εκφράζανε την επιβιωτίνη σε υψηλότερα επίπεδα από ότι οι όγκοι του μαστού χωρίς μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 ή τα φυσιολογικά δείγματα μαστού (**Εικόνα 16**).

Σε αντίθεση με τις δύο μεγάλες σειρές περιστατικών που ανέφεραν οι Span και οι Ryan, στη μελέτη μας δεν καταφέραμε να αποδείξουμε την προγνωστική αξία της γλυκοδελίνης και της επιβιωτίνης στην υποτροπή της νόσου ή στην ολική επιβίωση των ασθενών.

Ακόμα τρεις άλλες σειρές περιστατικών απέτυχαν εξίσου στο να αναδείξουν την προγνωστική σημασία της επιβιωτίνης και της γλυκοδελίνης. Το προαναφερόμενο αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί στο μικρό μέγεθος του δείγματος των ασθενών, στη μη εξειδικευμένη αντίδραση του αντισώματος κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση με τις προ-αποπτωτικές εναλλακτικές μορφές ματίσματος της επιβιωτίνης ή στη μειωμένη ποιοτική ευαισθησία της PCR [109,110,111].

Επιπλέον, όλα τα εργαστήρια δεν χρησιμοποίησαν τις ίδιες μεθόδους ανίχνευσης και υλικά, καθώς κάποιοι χρησιμοποίησαν ELISA έναντι qRT-PCR και φρέσκους έναντι μονιμοποιημένων ιστών. Αυτές οι διαφορετικοί μέθοδοι και τα υλικά θα μπορούσαν να συμβάλουν στα διαφορετικά αποτελέσματα. Επομένως απαιτείται περαιτέρω ανάλυση για να διευκρινιστεί ο ρόλος των μοριακών δεικτών όπως η ανάλυση με qPCR έναντι των κλασικών δεικτών της ανοσοϊστοχημείας.

Παρόλο που χρησιμοποίησαμε τη μέθοδο της ποσοτικής PCR, η μελέτη μας εμφανίζει μειονεκτήματα που μπορεί να ενοχοποιούνται για την έλλειψη της προγνωστικής χρησιμότητας της επιβιωτίνης η μέση παρακολούθηση των ασθενών είναι σχετικά μικρή (62 μήνες), διάστημα κατά το οποίο υπήρχαν μόνο 44 θάνατοι (16%) και 76 υποτροπές (28%).

Το πιο σημαντικό όλων είναι ότι ο πληθυσμός των ασθενών μας, αποτελείται από ασθενείς που διαγνώστηκαν και αντιμετωπίστηκαν για καρκίνο του μαστού με υψηλό κίνδυνο υποτροπής, όπως θετικοί λεμφαδένες (99%), σε

αντίθεση με τους πληθυσμούς ασθενών άλλων μελετών στις οποίες μόνον το 52% και το 56% των περιπτώσεων, αντίστοιχα, είχαν θετικούς λεμφαδένες [102,103].

Η επιβιωτική θα μπορούσε να αποτελεί έναν αρνητικό προγνωστικό παράγοντα στα πρώιμα στάδια της νόσου και η δράση της στα μετέπειτα στάδια της νόσου να χάνεται ή να αποδυναμώνεται από τη συσσώρευση πρόσθετων γενετικών βλαβών.

Η βιοπληροφορική ανάλυση σε βάσεις δεδομένων κατέδειξε ότι η ολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν την επιβιωτική (BIRC5, Survivin) λόγω γονιδιακής ενίσχυσης ήταν σαφώς μειωμένη σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν χαμηλότερη έκφραση της επιβιωτικής (**Εικόνα 12.**)

Η περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση μας στη βάση δεδομένων, θέτωντας το ερώτημα αν υπάρχει σχέση μεταξύ της υπερέκφρασης του γονιδίου της επιβιωτικής και της απόκρισης στη χημειοθεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού κατέδειξε ότι οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του BIRC5 αποκρίνονται καλύτερα στη χημειοθεραπεία (**Εικόνα 18**).

Συμπερασματικά, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να επιβεβαιωθεί αν αυτοί οι δύο ρυθμιστές της ανάπτυξης, προόδου και εξέλιξης του καρκίνου του μαστού, η επιβιωτική και η γλυκοδελίνη, και ιδιαίτερα η επιβιωτική καθώς έχει εμπλακεί και σε πορείες αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα, μπορούν να αξιοποιηθούν για την ταξινόμηση των ασθενών σε σχέση με την επικινδυνότητα της νόσου ή τον κίνδυνο υποτροπής καθώς και την χρησιμότητά τους ως θεραπευτικοί στόχοι.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μεταστίνη (Metastin, KiSS-1)

- Ταυτοποίηση μετάλλαξης του γονιδίου KiSS-1 που πιθανά οδηγεί στην απώλεια της λειτουργίας του. Πρόκειται για μια υποκατάσταση/ αντικατάσταση της κυτοσίνης σε γουανίνη, 242 ζεύγη βάσεων από την έναρξη της μετάφρασης (242 C>G) . Αυτή η απλή νουκλεοτιδική υποκατάσταση στο εξόνιο IVa του γονιδίου KiSS-1 αλλάζει ένα κωδικόνιο CCC σε CGC με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος προλίνη από το υδρόφιλο αμινοξύ αργινίνη στην προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων αγρίου τύπου και αλλαγή στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης
- Η προαναφερόμενη μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και A549 και ανιχνεύτηκε επίσης στο 10% των δειγμάτων των 50 ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού, αλλά σε κανένα από τα 50 δείγματα των υγιών ατόμων.
 - Μονό το 4% των ασθενών αυτών φέρει τη σωματική μετάλλαξη του γονιδίου KiSS-1.
 - Δεν υπήρξε σημαντική στατιστική συσχέτιση της ύπαρξης της μετάλλαξης με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης καθώς και του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων μασχάλης.
 - Δεν υπήρξε καμία συσχέτιση της μετάλλαξης KiSS-1 με την υπερέκφραση του Her-2, τους ορμονικούς υποδοχείς, την ηλικία, την εμμηνόπαυση, τον ιστολογικό τύπο και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου.
 - Η έκφραση του KiSS-1 mRNA καθώς και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης KiSS-1 δεν παρουσίασαν καμία προγνωστική σημασία για την επιβίωση χωρίς υποτροπή.
- Στην ομάδα επικύρωσης ο αριθμός των ασθενών με ανιχνεύσιμο μεταγραφόμενο KiSS-1 ήταν πολύ μικρός (3%)
 - 7 στις 8 ασθενείς με αυξημένα επίπεδα KiSS-1 mRNA στους όγκους ήταν μετεμμηνοπαυσιακές (p = 0,03).

- Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση της μεταγραφής του KiSS-1 με τη μεταγραφή των άλλων μοριακών δεικτών που μελετήθηκαν
- Η ολική επιβίωση (OS) και η επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών που εμφάνιζαν ή όχι έκφραση του KiSS-1, με αποτέλεσμα η μεταγραφική κατάσταση του KiSS-1 να μην εμφανίζει καμία προγνωστική σημασία

Γλυκοδελίνη (Glycodelin, PAEP)

- Το mRNA της γλυκοδελίνης εκφράζονταν στο 25% των ασθενών
- Το ποσοστό των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών με θετική έκφραση στη PAEP να είναι σημαντικά υψηλό ($p = 0,01$).
- Η γλυκοδελίνη εκφράζονταν σε υψηλότερο ποσοστό σε όγκους με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς, η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης ήταν εξίσου κατανεμημένη μεταξύ των κατηγοριών των άλλων κλινικοπαθολογικών μεταβλητών.
- Το ποσοστό των όγκων που εκφράζουν τη γλυκοδελίνη ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με καρκίνο μαστού θετικό στην έκφραση του HER2 mRNA ($p = 0,02$), ενώ δεν ήταν εμφανής άλλος συσχετισμός της μεταγραφής της γλυκοδελίνης με τη μεταγραφή άλλων γονιδίων
- Δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συνολική επιβίωση και στην επιβίωση ελεύθερη νόσου ανάλογα με την έκφραση του mRNA της γλυκοδελίνης

Επιβιωτίνη (Survivin, BIRC5)

- Η επιβιωτίνη εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα μαστού.
- Η έκφραση της επιβιωτίνης φαίνεται ότι αυξάνεται με την πρόοδο της νόσου από το στάδιο I στο στάδιο IV κατά την καρκινογένεση του μαστού.
- Η αυξημένη μεταγραφή mRNA της επιβιωτίνης συσχετίστηκε με υψηλό βαθμό πυρηνικής ατυπίας ($p < 0,001$), με την έκφραση mRNA του VEGF ($p = 0,01$) και την έκφραση mRNA του p53 ($p = 0,04$).

- Όγκοι με διαστάσεις μεγαλύτερες των 2εκ (T2) απέδωσαν υψηλότερα επίπεδα mRNA της επιβιωτίνης, αν και η παραπάνω συσχέτιση παρουσίασε μόνο μια τάση στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0,07$).
- Όγκοι μαστού με μεταλλαγμένες μορφές της *TP53* εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της επιβιωτίνης σε σχέση με όγκους του μαστού που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* ή σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα μαστού.
- Η μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της επιβιωτίνης δεν ανέδειξε καμία προγνωστική σημασία για τη συνολική επιβίωση ή για την επιβίωση ελεύθερη νόσου σε ανάλυση μονοπαραγοντική ή πολυπαραγοντική. Βέβαια, η βιοπληροφορική ανάλυση μας σε βάσεις δεδομένων που έχουν περισσότερα δείγματα κατέδειξε ότι οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα επιβιωτίνης έχουν χαμηλότερη ολική επιβίωση.
- Η ανάλυση με παλινδρόμηση πολλαπλών παραλλαγών Cox (Cox multivariate regression analysis) αποκάλυψε ότι η παρουσία του mRNA της επιβιωτίνης ($p > 0,05$), με υψηλό αριθμό θετικών λεμφαδένων και με αρνητική έκφραση ορμονικών υποδοχέων έχουν δυσμενή πρόγνωση για τις ασθενείς. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από βιοπληροφορική ανάλυση σε δημόσιες βάσεις δεδομένων, και κατέδειξε ότι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα επιβιωτίνης αποκρίνονται πιο αποτελεσματικά σε χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις.
- Τα αποτελέσματα συνολικά καταδεικνύουν ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της επιβιωτίνης στην καρκινογένεση του μαστού.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος που εμφανίζεται στις γυναίκες . Παρά την πρόοδο που έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια στην αντιμετώπισή του, σχεδόν οι μισές ασθενείς που διαγιγνώσκονται με πρώιμο καρκίνο του μαστού θα υποτροπιάσουν και θα καταλήξουν από τη νόσο. Η δημιουργία μεταστάσεων είναι μία πολύπλοκη διαδικασία και τα τελευταία χρόνια η βασική έρευνα προσπαθεί να αναγνωρίσει γονίδια καταστολής της μετάστασης που δεν σχετίζονται με την ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου.

Μεταστίνη (KiSS-1)

Υπόβαθρο: Το KiSS-1 είναι γονίδιο καταστολής της μετάστασης και η αδρανοποίηση του οδηγεί σε εμφάνιση καρκίνου προχωρημένου σταδίου καθώς και χειρότερη πρόγνωση για τις ασθενείς. Μελετήσαμε την ύπαρξη μεταλλάξεων του γονιδίου, την μεταγραφή του και την έκφραση της πρωτεΐνης του KiSS-1 σε καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών και δείγματα καρκίνου ασθενών που διαγνώστηκαν με πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Υλικό και Μεθοδολογία: DNA και mRNA από τα εξόνια III και IV του KiSS-1 προερχόμενο από τις καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών σειρών και από βιοπτικά δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη 50 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού αναλύθηκαν με τις μεθόδους PCR- SSCP, RT-PCR και αλληλούχισης. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός για την αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης KiSS-1 με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα για τη μεταστίνη συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη-βιοτίνη. Η παρουσία μεταλλάξεων του KiSS-1 γονιδίου, η μεταγραφή του και η ανοσοϊστοχημική έκφραση έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και μοριακών δεικτών του όγκου.

Επιπλέον από δείγματα ιστού σε τομές παραφίνης 272 γυναικών που έπασχαν από καρκίνο του μαστού σταδίου II ή και III με θετικούς λεμφαδένες

μασχάλης πραγματοποιήθηκε εξαγωγή mRNA του γονιδίου του KiSS-1 εξόνιο I/II. Επίσης έγινε προσπάθεια να συσχετιστεί το mRNA του KiSS-1 με την έκβαση των ασθενών, καθώς και με τη νόσο ή με μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου.

Αποτελέσματα: Μια υποκατάσταση/ αντικατάσταση της κυτοσίνης σε γουανίνη (P81R), 242 ζεύγη βάσεων από την έναρξη της μετάφρασης (242 C>G), η οποία προκαλεί αλλαγή της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης αναγνωρίστηκε στις κυτταρικές σειρές MCF-7, A549 και σε 5/50 δείγματα των όγκων (10%).

Καθώς η αντικατάσταση αναγνωρίστηκε στη γαμετική σειρά 3/5 γυναικών που έφεραν τη σωματική μετάλλαξη, προκύπτει ότι η συχνότητα εμφάνισης της σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου KiSS-1 στους όγκους των 50 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού είναι 4%. Αν και η P81R αντικατάσταση φαίνεται ότι συσχετίζεται με τη μειωμένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης του KiSS-1 και με τον αυξημένο αριθμό διηθημένων λεμφαδένων μασχάλης, η στατιστική ανάλυση αυτών απέτυχε να αναδείξει στατιστικά σημαντικό συσχετισμό.

Το mRNA του KiSS-1 γονιδίου αναδείχθηκε στα 15/48 των δειγμάτων και δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση με την ύπαρξη μετάλλαξης ή την έκφραση της πρωτεΐνης. 26 δείγματα είχαν θετική ανοσοϊστοχημική χρώση, σε αντίθεση με την ισχυρά κυτταροπλασματική χρώση που εμφανίζεται στο φυσιολογικό παρέγχυμα του μαστού και τους ιστούς του πλακούντα.

Σε ένα μέσο διάστημα παρακολούθησης 38 μηνών το 20% των γυναικών με μετάλλαξη στο KiSS-1 εμφάνισαν υποτροπή νόσου έναντι του 13% των γυναικών που δεν έφεραν τη μετάλλαξη. Η παρουσία μετάλλαξης του KiSS-1, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης δεν συσχετίζονται με το διάστημα επιβίωσης χωρίς υποτροπή.

Στην ομάδα επικύρωσης μόνο 8/272 (3%) από τα δείγματα των όγκων παρουσίαζαν ανιχνεύσιμο mRNA του KiSS-1. Δεν υπήρξε καμία συσχέτιση της μεταγραφής του KiSS-1 με τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων, το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων και το μέγεθος του όγκου.

Από τις γυναίκες που εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα του KiSS-1 mRNA το 87,5% ήταν μετεμμηνοπαυσιακές ενώ από τις γυναίκες που δεν είχαν

μετρήσιμα επίπεδα του KiSS-1 mRNA μόνο το 48% αυτών ήταν μετεμμηνοπαυσιακές. Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση της μεταγραφής του KiSS-1 με τη μεταγραφή των παρακάτω μορίων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου: HER2, VEGF, p53, BCL2, PAEP και BIRC5. Με μια μέση περίοδο παρακολούθησης 62 μηνών, φάνηκε ότι δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσο αφορά στην ολική επιβίωση και στην επιβίωση ελεύθερης νόσου μεταξύ των γυναικών που εμφάνιζαν ή όχι έκφραση του KiSS-1

Γλυκοδελίνη (PAEP)

Υπόβαθρο: η Γλυκοδελίνη είναι πολυπεπτίδιο που εμπλέκεται σε μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην απόπτωση και την αγγειογένεση. Υπάρχουν αντιφατικά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το λειτουργικό της ρόλο στους καρκινικούς ιστούς, για το λόγο αυτό μελετήσαμε τη μεταγραφή της στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Υλικό και Μεθοδολογία: Με ποσοτική πραγματικού χρόνου PCRmRNA Γλυκοδελίνης απομονώθηκε από μονιμοποιημένα δείγματα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη, 272 γυναικών που διαγνώστηκαν με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Υπολογίσθηκε και κανονικοποιήθηκε η έκφρασή της με βάση των διαχειριστικών γονιδίων GAPDH, RPL37A και έγινε προσπάθεια να συσχετιστεί το mRNA της με την έκβαση των ασθενών, καθώς και με τη νόσο ή με μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου.

Αποτελέσματα: Συνολικά μελετήθηκαν 272 γυναίκες με σταδίου III καρκίνο του μαστού (θετικοί λεμφαδένες μασχάλης και όγκοι > 2εκ). Το mRNA της Γλυκοδελίνης εκφράζονταν σε 68 ασθενείς (25%), η πλειοψηφία των οποίων ήταν προεμμηνοπαυσιακές και σε έκφραση του HER2 mRNA. Σε μια μέση περίοδο παρακολούθησης 62 μηνών, δεν ανεδείχθη καμία προγνωστική της σημασία για τη συνολική επιβίωση ή για την επιβίωση ελεύθερη νόσου σε μονοπαραγοντική ή πολυπαραγοντική ανάλυση.

Επιβιωτίνη (BIRC5)

Υπόβαθρο: η Επιβιωτίνη είναι πολυπεπτίδιο που εμπλέκεται σε μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην απόπτωση και την αγγειογένεση. Υπάρχουν αντιφατικά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το λειτουργικό της ρόλο στους καρκινικούς ιστούς, για το λόγο αυτό μελετήσαμε τη μεταγραφή της στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Υλικό και Μεθοδολογία: Με ποσοτική πραγματικού χρόνου PCRmRNA Επιβιωτίνης απομονώθηκε από μονιμοποιημένα δείγματα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη, 272 γυναικών που διαγνώστηκαν με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Υπολογίστηκε και κανονικοποιήθηκε η έκφρασή της με βάση των διαχειριστικών γονιδίων GAPDH, RPL37A και έγινε προσπάθεια να συσχετιστεί το mRNA της με την έκβαση των ασθενών, καθώς και με τη νόσο ή με μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου.

Αποτελέσματα: Συνολικά μελετήθηκαν 272 γυναίκες με σταδίου III καρκίνο του μαστού (θετικοί λεμφαδένες μασχάλης και όγκοι > 2 εκ). Σε 263 γυναίκες (97%) εκφράζονταν η επιβιωτίνη και συσχετίστηκε με υψηλό βαθμό πυρηνικής ατυπίας, με την έκφραση mRNA του VEGF και την έκφραση mRNA του p53. Όμως, εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση σε δημόσιες βάσεις δεδομένων σε συνάρτηση με τα αποτελέσματά μας ανέδειξε τα ακόλουθα:

(α) Η επιβιωτίνη εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα μαστού.

(β) Όγκοι με διαστάσεις μεγαλύτερες των 2 εκ (T2) απέδωσαν υψηλότερα επίπεδα mRNA της επιβιωτίνης, αν και η παραπάνω συσχέτιση παρουσίασε μόνο μια τάση στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0,07$).

Η έκφραση της επιβιωτίνης φαίνεται ότι αυξάνεται με την πρόοδο της νόσου από το στάδιο I στο στάδιο IV στον καρκίνο του μαστού.

(γ) Όγκοι μαστού με μεταλλαγμένο *TP53* εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της επιβιωτίνης σε σχέση με όγκους του μαστού που δεν φέρουν τη μετάλλαξη ή σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα μαστού.

(δ) Σε μια μέση περίοδο παρακολούθησης 62 μηνών, δεν ανεδείχθη καμία προγνωστική της σημασία για τη συνολική επιβίωση ή για την επιβίωση ελεύθερη νόσου σε μονοπαραγοντική ή πολυπαραγοντική ανάλυση. Βέβαια, η βιοπληροφορική ανάλυση μας σε βάσεις δεδομένων που έχουν περισσότερα δείγματα κατέδειξε ότι οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα επιβιωτίνης έχουν χαμηλότερη ολική επιβίωση.

(ε) Η ανάλυση με παλινδρόμηση πολλαπλών παραλλαγών Cox αποκάλυψε ότι η παρουσία του mRNA της επιβιωτίνης ($p > 0,05$), με υψηλό αριθμό θετικών λεμφαδένων και με αρνητική έκφραση ορμονικών υποδοχέων έχει δυσμενή πρόγνωση για τις ασθενείς. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από βιοπληροφορική ανάλυση σε δημόσιες βάσεις δεδομένων, και κατέδειξε ότι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα επιβιωτίνης ανταποκρίνονται αποτελεσματικότερα στη χημειοθεραπεία.

Τα αποτελέσματα συνολικά καταδεικνύουν ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της επιβιωτίνης στην καρκινογένεση του μαστού.

SUMMARY IN ENGLISH

Breast cancer is the leading cause of cancer-related mortality among women in most developed countries. Despite progress achieved with adjuvant chemotherapy, approximately half of all women with resected early breast cancer eventually experience systemic malignant relapse that is ultimately fatal. The metastatic spread of malignant cells is a multi-step process. Over the last decade basic research has identified metastasis suppressor genes that block each of these steps, thus inhibiting formation of metastasis without affecting primary tumor growth.

Metastin (KiSS-1)

Background: KiSS-1 is a metastasis suppressor gene, its inactivation linked to advanced tumor stage and dismal prognosis. We studied its mutational status, transcription and protein expression in human cancer cell lines and patients with early breast cancer.

Materials and Methods: Tumor tissue DNA and mRNA of KiSS-1 exons III and IV from human cancer cell lines and from formalin-fixed resected breast adenocarcinomas from 50 women were analyzed by means of PCR-SSCP, RT-PCR and sequencing. Tumor tissue was stained for KiSS-1 protein expression by means of streptavidin-biotin complex immunoperoxidase assay. Presence of KiSS-1 mutation, mRNA levels and protein staining were examined for correlations with patient/tumor characteristics.

Also tumor messenger RNA of the KiSS-1 exon I/II boundary was extracted from paraffin-embedded stage II or III node positive breast adenocarcinomas of 272 women. KiSS-1 mRNA was examined for associations with outcome, disease and molecular characteristics.

Results: A transversion in exon IVa replacing cytosine with guanine was identified 242 base pairs from the translation start site (242C>G) in the cell lines

MCF-7, A549 and in 5/50 tumors (10%), resulting in substitution of proline by arginine (P81R) and alteration of the tertiary structure.

As the substitution was present in germ-line DNA in 3/5 breast cancer patients harbouring the polymorphism in their tumor, the tumor-specific somatic mutation was 4% among the 50 patients with early breast cancer.

Although the P81R substitution was associated with reduced KiSS-1 protein immunoreactivity and with axillary nodal involvement, the correlations did not reach statistical significance.

KiSS-1 mRNA was detected in only 15/48 tumors (31%) and showed no correlation with mutation or protein expression. 26 tumors stained for KiSS-1 protein, in contrast to the universal strong staining seen in normal breast parenchyma and placental tissues. At a median follow-up of 38 months, relapses occurred in 20% of women with non-wild tumors versus 13% of women with wild-type KiSS-1 tumors. Presence of KiSS-1 mutation, mRNA levels and protein expression did not have prognostic significance for relapse-free survival.

Only 8/272 tumors (3%) yielded detectable KiSS-1 mRNA levels. There was no evidence of correlation of KiSS-1 transcription with the number of involved axillary nodes, grade, hormone receptor status or tumor size. Of women with increased KiSS-1 mRNA tumor levels, 87.5% were postmenopausal, whereas only 48% were postmenopausal among patients without detectable KiSS-1 mRNA. No association of KiSS-1 transcription was found with transcription of cell cycle regulators HER2, VEGF, p53, BCL2, PAEP or BIRC5. At a median follow-up of 62 months, there was no statistically significant difference between women harbouring KiSS-1 mRNA-negative versus-positive tumors in terms of disease-free and overall survival.

Glycodelin (PAEP)

Background: Glycodelin is key polypeptide regulator of cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis. In view of contradictory reports on its functional role in tumors, we studied its transcriptional levels in localized breast cancer.

Materials and Methods: Glycodelin mRNA was isolated and amplified by quantitative reverse-transcription PCR from paraffin-embedded breast carcinomas of 272 women. A normalized score was calculated by use of GAPDH, RPL37A reference genes and was correlated with clinicopathologic/molecular parameters and patient outcome.

Results: A total of 272 patients were eligible, most harbored stage III node positive breast carcinomas larger than 2cm. Glycodelin mRNA was expressed in 68 patients (25%), more frequently in premenopausal women and those with HER2 mRNA positive tumors. At a median follow-up of 62 months, glycodelin mRNA expression wasn't demonstrated prognostic utility for overall or disease free survival at univariate and multivariate analysis.

Survivin (BIRC5)

Background: Survivin is key polypeptide regulator of cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis. In view of contradictory reports on its functional role in tumors, we studied its transcriptional levels in localized breast cancer.

Materials and Methods: Survivin mRNA was isolated and amplified by quantitative reverse-transcription PCR from paraffin-embedded breast carcinomas of 272 women. A normalized score was calculated by use of GAPDH, RPL37A reference genes and was correlated with clinicopathologic/molecular parameters and patient outcome.

Results: A total of 272 patients were eligible, most harbored stage III node positive breast carcinomas larger than 2cm. Survivin mRNA was present in 263 tumors (97%) and its levels correlated significantly with high nuclear grade, VEGF mRNA and p53 mRNA presence.

However, an extensive bioinformatics analysis in public databases in relation to our results revealed the following:

(a) Survivin is expressed at higher levels in primary breast tumors compared to normal breast tissue.

(b) Tumors larger than 2 cm (T2) yielded higher levels of survivin mRNA, although the above correlation showed only a trend of statistical significance ($p = 0.07$).

Survivin expression appears to increase with disease progression from stage I to stage IV during breast carcinogenesis.

(c) Breast tumors with mutant TP53 show higher levels of survivin expression than breast tumors that do not have mutations in the TP53 or compared to normal breast tissue.

(d) At a median follow-up of 62 months, survivin mRNA expression wasn't demonstrated prognostic utility for overall or disease free survival at univariate and multivariate analysis

(e) Cox multivariate analysis revealed that the presence of survivin mRNA ($p > 0.05$), with a high number of positive lymph nodes and a negative expression of hormone receptors has an unfavorable prognosis for patients. This was also confirmed by bioinformatics analysis in public databases, and showed that patients with low levels of survivin respond more effectively to chemotherapeutic agents.

The results overall indicate that more studies are needed to clarify the role of survival in breast carcinogenesis.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ανακοινώσεις

1. **Κωσταδήμα Λ**, Ντόβα Λ, Γεωργίου Ι, Πενθερουδάκης Γ, Μαλάμου-Μήτση Β, Βαρθολομάτος Γ, Φούντζηλας Γ, ΠαυλίδηςΝ: Μελέτη της έκφρασης του εμβρυϊκού γονιδίου KiSS-1 στο πρώιμο καρκίνο του μαστού. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 6-8 Απριλίου 2006, Ιωάννινα **(ελεύθερη ανακοίνωση)**

2. **Κωσταδήμα Λ**, Πενθερουδάκης Γ, Φούντζηλας Γ, ΠαυλίδηςΝ: Μελέτη έκφρασης των εμβρυϊκών μορίων επιβιωτίνης (surviving) και γλυκοδελίνης (glycodeline) στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 6-8 Απριλίου 2006, Ιωάννινα **(ελεύθερη ανακοίνωση)**

3. **Kostadima L**, PentheroudakisG, Dova L, Georgiou I, Malamou-Mitsi V, Vartholomatos G, Fountzilas G, Kolaitis N, Ntemou M, PavlidisN: Themissingkissoflife: Analysisofmutationandproteinexpressionofthemetastasis-suppressorgeneKiSS-1 inearlybreastcancer. 2nd Inter-Congress of European Society of Pathology, 24-27 May 2006, Ioannina, Greece **(poster)**

4. Pentheroudakis G, **Kostadima L**, Dova L, Malamou-Mitsi V, Georgiou I, Fountzilas G, Stropp U,Vartholomatos G, Kolaitis N, PavlidisN: Themissingkissoflife: Analysisofmutationandproteinexpressionofthemetastasis-suppressorgeneKiSS-1 inearlybreastcancer.31st ESMO Congress 29 September - 3 October, 2006: Istanbul, Turkey **(poster)**

Δημοσιεύσεις

1. Pentheroudakis G, **Kostadima L**, Dova L, Malamou-Mitsi V, Georgiou I, Fountzilas G, Stropp U, Vartholomatos G, Kolaitis N and Pavlidis N: The missing kiss of life: Analysis of mutation and protein expression of the metastasis-suppressor gene KISS1 in early breast cancer. *Ann Oncol* 17(Suppl 9): ix59(101P), 2006.
2. **Kostadima L**, Pentheroudakis G, Pavlidis N. The missing KiSS1 of life: transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1-1 in early breast cancer. *Anticancer Res.* Jul-Aug;27(4B):2499-504, 2007
3. Pentheroudakis G, **Kostadima L**, Dova L, Georgiou I, Tzavaras T, Vartholomatos G, Wirtz R.M, Fountzilas G, Malamou-Mitsi V, Pavlidis N. A twisted KiSS1: in vitro and in vivo evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis- suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Neoplasma* 57(1):2010

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer' World Health Organization International Agency for Research on Cancer.** The Global Cancer Observatory. 2018 statistics.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. **Global cancer statistics, 2012.** *CA Cancer J Clin.* 65(2):87,2015
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. **Cancer statistics, 2019.** *CA Cancer J Clin.* 69(1):7, 2019.
4. De Gelder R, Heijnsdijk EA, Fracheboud J, Draisma G, de Koning HJ. **The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy.** *Int J Cancer.* 137(1):165, 2015.
5. Munoz D, Near AM, van Ravesteyn NT, Lee SJ, Schechter CB, Alagoz O, Berry DA, Burnside ES, Chang Y, Chisholm G, de Koning HJ, Ali Ergun M, Heijnsdijk EA, Huang H, Stout NK, Sprague BL, Trentham-Dietz A, Mandelblatt JS, Plevritis SK. **Effects of screening and systemic adjuvant therapy on ER-specific US breast cancer mortality.** *J Natl Cancer Inst.* 106(11), 2014.
6. Tabár L, Dean PB, Chen TH, Yen AM, Chen SL, Fann JC, Chiu SY, Ku MM, Wu WY, Hsu CY, Chen YC, Beckmann K, Smith RA, Duffy SW. **The incidence of fatal breast cancer measures the increased effectiveness of therapy in women participating in mammography screening.** *Cancer.* 125(4):515, 2019.
7. Allemani C, Minicozzi P, Berrino F. et al. **Predictions of survival up to 10 years after diagnosis for European women with breast cancer in 2000-2002.** *Int J Cancer.* 132:2404-2412, 2013.
8. **American Cancer Society. Cancer statistics 1998.** *CA Cancer J Clin* 48:1-63,01998
9. Chambers AF. **The metastatic process: basic research and clinical implications.** *Oncol Res* 11:161-8, 1999.
10. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Hortobagyi GN. **Breast cancer-major**

- changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual.** *CA Cancer J Clin* 67(4): 290–303, 2017
11. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, Hammond ME, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, Van Poznak C, Wolff AC, Stearns V. **Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women with Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline focused update.** *J Clin Oncol.* 35(24):2838, 2017.
 12. Billena C, Wilgucki M, Flynn J, Modlin L, Tadros A, Razavi P, Braunstein LZ, Gillespie E, Cahlon O, McCormick B, Zhang Z, Morrow M, Powell S, Khan AJ. **10-Year Breast Cancer Outcomes in Women \leq 35 Years of Age.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 109(4):1007, 2021.
 13. Van de Water W, Markopoulos C, van de Velde CJ, Seynaeve C, Hasenburger A, Rea D, Putter H, Nortier JW, de Craen AJ, Hille ET, Bastiaannet E, Hadji P, Westendorp RG, Liefers GJ, Jones SE. **Association between age at diagnosis and disease-specific mortality among postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer.** *JAMA* 307(6):590-7, 2012.
 14. Swain SM, Jeong JH, Geyer CE Jr, Costantino JP, Pajon ER, Fehrenbacher L, Atkins JN, Polikoff J, Vogel VG, Erban JK, Rastogi P, Livingston RB, Perez EA, Mamounas EP, Land SR, Ganz PA, Wolmark N. **Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer.** *N Engl J Med.* 362(22):2053, 2010.
 15. Shen Y, Yang Y, Inoue LY, Munsell MF, Miller AB, Berry DA. **Role of detection method in predicting breast cancer survival: analysis of randomized screening trials.** *J. Natl Cancer Inst.* 97(16):1195-203, 2005.
 16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. **Cancer Statistics, 2017.** *Cancer J Clin.* 67(1):7, 2017.
 17. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, Holmberg SB, Lindtner J, Snyder R, Thürlimann B, Murray E, Viale G, Castiglione-Gertsch M, Coates AS, Goldhirsch A, International Breast Cancer Study Group. **Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15**

- International Breast Cancer Study Group clinical trials.** J Clin Oncol.26(18):3006, 2008.
18. Elston CW, Ellis IO. **Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.** Histopathology. 19(5):403, 1991.
 19. Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N, Kvistgaard ME, Overgaard M, Toftdahl DB, Mouridsen HT, Danish Breast Cancer Cooperative Group. **Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer.** J Natl Cancer Inst. 101(10):729-35, 2009.
 20. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. **Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients.** Br J Cancer. 96(10):1504, 2007.
 21. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. **Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients.** Breast 2008 Aug; 17(4):323-34.
 22. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. **Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.** J Clin Oncol. 17(5):1474, 1999.
 23. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, van de Velde CJ, Billingham LJ, Campbell FM, Grant M, Hasenburg A, Hille ET, Kay C, Kieback DG, Putter H, Markopoulos C, Kranenbarg EM, Mallon EA, Dirix L, Seynaeve C, Rea D. **Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial.** J Clin Oncol. 29(12):1531, 2011.
 24. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. **HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer.**J Clin Oncol. 7(8):1120, 1989.

25. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R. **Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group.** J Clin Oncol. 10(7):1049, 1992.
26. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, Huntsman D, Olivotto IA, Nielsen TO, Gelmon K. **Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers.** J Clin Oncol. 26(35):5697, 2008.
27. Yoshida BA, Sokoloff M, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. **Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field.** J Natl Cancer Inst 92:1717-30, 2000
28. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. **Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KiSS-1).** Genomics 54: 145-148, 1998
29. Nash KT, Welch DR. **The KiSS-1 metastasis suppressor: mechanistic insights and clinical utility.** Front Biosci 11:647-59, 2006
30. Janneau JL, Maldonado-Estrada J, Tachdjian G, Miran I, Motte N, Saulnier P, Sabourin J-C, Cote J-F, Simon B, Frydman R, Chaouat G, Bellet D. **Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells.** J. Clin Endocrinol Metab. 87(11): 5336-5339, 2002.
31. Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki CK, Usuki S, Fujino M. **Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: Metastin as a novel placenta-derived hormone in humans.** J. Clin. Endocr. Metab. 88(2): 914-919, 2003.
32. Kotani, M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Soares-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann S, Vassart G, Parmentier M. **The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes KiSS1peptins, the natural ligands of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54.** J. Biol. Chemistry 276(37): 34631-34636, 2001.

33. Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Onda H, Kurokawa T, Nishimura O, Fujino M. **Bioch. Biophys. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor.** Res. Commun. 286: 958-963, 2001.
34. Goldberg SF, Harms JF, Welch DR. **Metastasis-suppressed C8161 melanoma cells arrest in lung but fail to proliferate.** Clin Exp Metastasis. 17(7):601-7, 1999
35. Welch DR, Chen P, Miele Me, McGary CT, Bower JM, Stanbridge EJ, Weissman BE. **Microcell-mediated transfer of chromosome 6 into metastatic human C8161 melanoma cells suppresses metastasis but does not inhibit tumorigenicity.** Oncogene 9:255-62,1994
36. Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. **Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1- 1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q 16.3-q23.** Cancer Res 61(20): 7422-7425, 2001.
37. Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, Burch HB, Schuppert F, Burman KD and Saji M. **Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells.** J Clin Endocrin Metab 87: 2399, 2002
38. Sancher-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. **Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and outcome.** Am. J. Pathol 162(2): 609-617, 2003.
39. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. **Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma.** J Cancer Res Clin Oncol 129;531-535, 2003
40. Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, Tachibana M, Ono T, Otani H and Nagasue N. **Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumour invasion and worse prognosis in gastric carcinoma.** Int J Cancer 111: 868-872, 2004

41. Jiang T, Zhang SL, Lin B, Meng LR and Gao H. **Expression and clinical significance of KISS1 and GPR54 mRNA in endometrial carcinoma.** Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 27: 229-231, 2005
42. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, Ito D, Peiper SC, Broach JR, Oishi S, Niida A, Fujii N, Imamura M. **Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 315:85-92, 2004
43. Lee JH and Welch DR. **Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene KiSS-1.** Cancer Res. 57(12): 2384-2387, 1997.
44. Martin TA, Watkins G and Jiang WG. **KiSS-1 expression in human breast cancer.** Clin Exp Metastasis 22: 503-511, 2005.
45. Papaiconomou E, Lymperi M, Petraki C, Philippou A, Msaquel P, Michalopoulou F, Kafiri G, Vassilakos G, Zografos G, Koutsilieris M. **KiSS-1/GPR54 protein expression in breast cancer.** Anticancer Res. 34;1401-1408, 2014
46. Mitchell DC, Abdelrahim M, Weng J, Stafford LJ, Safe S, Bar-Eli M and Liu M. **Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by direct interaction of transcription factors AP2a and SP1.** J Biol Chem 6;281(1): 51-58, 2006
47. Stark AM, Tongers K, Mass N, Mehdorn HM and Held-Feindt J. **Reduced metastasis-suppressor gene mRNA expression in breast cancer brain metastases.** J Cancer Res Clin Oncol 131:191-198, 2005
48. Ulasov I, Kaverina N, Pytel P, Thaci B, Liu F, Hurst D, Welch D, Sattar H, Olopade O, Baryshnikov A, Kadagidze Z, Lesniak M. **Clinical significance of KiSS-1 protein expression for brain invasion and metastasis.** Cancer 15;118(8):2069-2105, 2012
49. Ulasov I, Borovjagin A, Timashev P, Cristofanili M, Welch D. **KiSS-1 in breast cancer progression and autophagy.** Cancer metastasis Rev. 38(3):493-506, 2019

50. Fratangelo F, Carriero MV, Motti ML. **Controversial role of Kisspeptins/KiSS-1R signalling system in tumor development.** *Front Endocrinol* 9:192, 2018
51. Shoji S, Tang XY, Sato H, Usui Y, Uchida T, Terachi T. **Metastin has potential as suitable biomarker and novel effective therapy for cancer metastasis (review).** *Oncology Lett.* 1:783-788, 2010
52. Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehninger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M, Clark G F. **Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities.** *J Biol Chem* 270:24116–24126, 1995
53. Seppälä M, Bohn H, Tatarinov Y. **Glycodelins.** *Tumour Biol* 19:213-220, 1998
54. Vaisse C, Atger M, Potier B, Milgrom E. **Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication.** *DNA Cell Biol* 9:401–413, 1990
55. Seppälä M, Taylor R, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. **Glycodelin: a Major Lipocalin Protein of the Reproductive Axis with Diverse Actions in Cell Recognition and Differentiation.** *Endocrine Rev.* 23(4):401-430, 2002
56. Horowitz IR, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S, Ramachandran S. **Increased glycodelin levels in gynecological malignancies.** *Int J Gynecol Cancer* 11:173–179, 2001
57. Kämäräinen M, Miettinen M, Seppälä M, Von Boguslawsky K, Benassi MS, Bohling T, Andersson LC. **Epithelial expression of glycodelin in biphasic synovial sarcomas.** *Int. J. Cancer* 18;76(4):487-90, 1998
58. Cui J, Liu Y, Wang X. **The Roles of Glycodelin in Cancer Development and Progression.** *Front Immunol* 8:1685, 2017
59. Koistinen H, Hautala LC, Seppala M, Stenman UH, Laakkonen P, Koistinen R. The role of glycodeline in cell differentiation and tumor growth. *Scand J. Clin Lab Invest* 69(4): 452-48-59, 2009

60. Song M, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA, Parthasarathy S. **Angiogenic role for glycodeclin intumorigenesis.** Proc Natl Acad Sci USA 98:9265-9270, 2001
61. Kämäräinen M, Halttunen M, Koistinen R, von Bogulsawsky K, Von Smitten K, Andersson LC, Seppälä M. **Expression of glycodeclin in human breast and breast cancer.** Int J Cancer 83:738-742, 1999
62. Kämäräinen M, Seppälä M, Virtanen I, Andersson LC. **Expression of glycodeclin in MCF7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium.** Lab Invest 77:565–573, 1997
63. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. **Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma.** Cancer Lett. 184:105-116, 2002
64. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. **Developmentally regulated expression of novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation.** Am J Pathol 152:43-49, 1998
65. Altieri DC, Marchisio C. **Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer.** Lab Invest 79;(11):1327-1333, 1999
66. Altieri DC. **Validating survivin as a cancer therapeutic target.** Nat Rev Cancer 3:46-54, 2003
67. Johnson M E, Howerth E W. **Survivin: A bifunctional inhibitor of apoptosis protein.** Vet Pathol 41:599-607, 2004
68. Li F. **Role of survivin and its variants in tumorigenesis.** Br.J. Cancer 92:212-216, 2005
69. Altieri DC. **Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.** Oncogene 22:8581-8589, 2003
70. Kim P, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. **Surviving and molecular pathogenesis of colorectal cancer.** Lancet 362:205-09, 2003

71. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. **Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in HCC.** Cancer 95(9):1938-45, 2002
72. Kappler M, Köhler T, Kampf C, Diestelkötter P, Würfl P, Schmitz M, Bartel C, Lautenschläger C, Rieber EP, Schmidt H, Bache M, Taubert H, Meye A. **Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients.** Int. J. Cancer (Pred. Oncol) 95:360-363, 2001
73. Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, Oprandi B, Buttita F, Barassi F, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S. **Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer.** J Pathol 200:620-626, 2003
74. Schlette E, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis G. **Surviving expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma.** J Clin Oncol 22:1682-1688, 2004
75. Sohn DM, Kim SY, baek MJ, Lim CW, Lee MH, Cho MS, Kim TY. **Expression of survivin and correlation in patients with breast cancer.** Biomedicine & Pharmacotherapy 60:289-292, 2006
76. Jha K, Shukla M, Pandey M. **Surviving expression and targeting in breast cancer.** Surgical oncology 21:125-131, 2012
77. Lyu H, Wang S, Huang J, Wang B, He Z, Liu B. **Survivin-targeting miR-542-3p overcomes HER3 signaling-induced chemoresistance and enhances the antitumor activity of paclitaxel against HER2-overexpressing breast cancer.** Cancer Lett. 420:97-108, 2018
78. Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K. **Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer.** WJCO 5(5):883-894, 2014
79. Fountzilas G, Skarlos D, Dafni U, Gogas H, Briasoulis E, Pectasides D, Papadimitriou C, Markopoulos C, Polychronis A, Kalofonos HP, Siafaka V, Kosmidis P, Timotheadou E, Tsavdaridis D, Bafaloukos D, Papakostas P, Razis E, Makrantonakis P, Aravantinos G, Christodoulou C, Dimopoulos AM. **Postoperative dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, followed by CMF with or without paclitaxel, in patients**

- with high-risk operable breast cancer: a randomized phase III study conducted by HeCOG.** *Ann Oncol.* 16:1762-1771.2005
80. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, Jasz R, *et al.* **The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project.** *Nature Genet.* 45, 580-585, 2013
 81. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, and Zhan Z. **GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses.** *Nucleic Acids Res*3; 45 (WebServerissue): W98-W102, 2017
 82. GaoJ, Arman B, DogrusozU, DresdnerG, GrossB, SumerSO, *et al.* **Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal.** *Sci Signal*6(269), 2013
 83. Dobrovic A, SimpfendorferD. **Methylation of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer.** *Cancer Res* 15;57(16):3347-50, 1997
 84. Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin SF, Milner J, Brown LA, Hsu F, Gilks B, Nielsen T, Schulzer M, Chia S, Ragaz J, Cahn A, Linger L, Ozdag H, Cattaneo E, Jordanova ES, Schuuring E, Yu DS, Venkitaraman A, Ponder B, Doherty A, Aparicio S, Bentley D, Theillet C, Ponting CP, Carlos Caldas C, Kouzarides T. ***EMSY* links the *BRCA2* pathway to sporadic breast and ovarian cancer.** *Cell* 26;115(5):523-35, 2003
 85. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. **Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer.** *Maturitas*24;49(1):34-43, 2004
 86. Debies WT, Welch DR. **Genetic basis of human breast cancer metastasis.** *J Mamm. Gland Biol Neoplasia*6:441-51, 2002
 87. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. **AXOR 12: a novel human G-protein couple receptor, activated by the peptide Kiss-1.** *J Biol Chem.* 276:28969-975, 2001

88. Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. **Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system.** Br J Pharmacol 151:1143-53, 2007
89. Othaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. **Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein coupled receptor.** Nature 411:613-17, 2001
90. Nash KT, Welch DR. **The KiSS1 metastasis suppressor mechanistic insights and clinical utility.** Front Biosci 11:647-59, 2006
91. HataK, Dhar DK, Watanabe Y, NakaiH, Hoshiai H. **Expression of metastin and a G-protein coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer.**Eur.J Cancer 43:1452-9, 2007
92. Zohrabian VM, Nandu H, Gulati N, Khitrov G, Zhao C, Mohan A, Demattia J, Braun A, Das K, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. **Gene expression profiling of metastatic brain cancer.** Oncol Rep 18:321-8, 2007
93. Yan CH, Wang H, Boyd DD. **KiSS1-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF- κ B binding to the promoter as a consequence of I κ B α -induced block of p65/p50 nuclear translocation.** J. Biol. Chem. 276(2): 1164-1172, 2001.
94. Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC. **Kisseptin-10-induced signalling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptines.** Cancer Res 65:10450-456, 2005
95. Jeschke U, Wang X, Briese V, Friese K, Stahn R. **Glycodeline and amniotic fluid transferring as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion.** Histochem Cell Biol 119:345-354, 2003
96. Jeschke U, Mylonas I, Kunert-Keil C, Dazert E, Shabani N, Werling M, Kuhn C, Wolfgang J, Gerber B, Friese K. **Expression of glycodelin**

- protein and mRNA in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive ductal carcinomas, their lymph node and distant metastases, and ductal carcinomas with recurrence.** *Oncol Rep* 13:413–419, 2005
97. Garde J, Bell SC, Eperon IC. **Multiple forms of mRNA encoding human pregnancy-associated endometrial α 2-globulin, a β -lactoglobulin homologue.** *Proc Nat Acad Sci* 88:2456–2460, 1991
 98. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. **A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** *Nat Med* 3:917-921, 1997
 99. Reed JC, Bischoff JR. **BIRing chromosomes through cell division- and surviving the experience.** *Cell* 102:545-548, 2000
 100. Velculescu V, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson A, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Kinzel KW et al. **Analysis of human transcriptomes.** *Nat Genet* 23:387-388, 1999
 101. Lin T-Y, Chan H-H, Chen S-H, Sarvagalla S, Chen P-S, Coumar MS, Cheng SM, Chang Y-C, Lin C-H, Leung E, Cheung CHA. **BIRC5/Survivin is a novel ATG12-ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells.** *Autophagy* 16(7):1296-1313, 2020
 102. Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ETG, Tjan-Heijnen V, Manders P, Beex LV, De Kok JB. **Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients.** *Clin Chem* 50:1986–1993, 2004
 103. Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, Meng G, Pegram MD, Podratz KC, Crown J, Slamon DJ, Duffy MJ. **Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1.** *Ann Oncol* Jan 10, 2006
 104. Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. **Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of**

mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. Clin Cancer Res 9:2683-2692, 2003

- 105.** Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R. **Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells.** Clin Cancer Res 12:11-19, 2006
- 106.** Vasaturo F, Sallusti E, Gradilone A, Malacrino C, Nardo T, Avagnano G, Aglianò AM, Granato T, De Vincenzi B, Coppotelli G, Marzullo A, Soda G, Simonelli L, Modesti M, Scarpa S. **Comparison of extracellular matrix and apoptotic markers between lesions and carcinomas in human breast.** Int J Oncol 27:1005-1011, 2005
- 107.** Tsuji N, Fuuse K, Asanuma K, Furuya M, Kondoh K, Kamagata C, Sasaki M, Kobayashi D, Yagihashi A, Takahashi H, Watanabe N. **Mutations of the p53 gene and loss of heterozygosity at chromosome 17p13.1 are associated with increased survivin expression in breast cancer.** Breast Cancer Res Treat 87:23–31, 2004
- 108.** Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop R, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. **Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway.** Oncogene 21:2613–2622, 2002
- 109.** Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. **Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas.** Clin Cancer Res 6:127–134, 2000
- 110.** O'Driscoll L, Linehan R, Kennedy S, Cronin D, Purcell R, Glynn S, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Clynes M. **Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer.** Cancer Lett 201:225–236, 2003

- 111.** Chu JS, Shew JY, Huang CS. **Immunohistochemical analysis of survivin expression in primary breast cancers.** J Formos Med Assoc 103:925–931, 2004