

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265283



23



Αρ. ατμ.:.....1954.....2008.....





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
Διευθυντής Τομέα: Καθηγητής Ν. Αγνάντη

**«Μελέτη και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης του γονιδίου KLK7
σε γυναικολογικούς καρκίνους»**

Παναγιώτης Πρέζας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2007



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν δηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)).



Ημερομηνία αίτησης του κ. Πρέζα Παναγιώτη: 26-9-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 484^α/15-10-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ταλιέρη Μαρουλιώ Ερευνήτρια του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας του Νοσοκομείου «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 29-10-2002

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 595^α/21-11-2006

Αγνάντη Νίκη	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μακρυδήμας Γεώργιος,	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 1-12-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

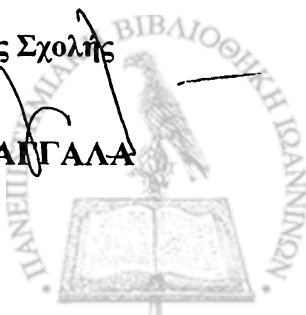
Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



ΗΓ. ραφίστας της Σχολής

Φ. ΑΥΑΓΓΕΛΟΥ Α. ΤΣΑΙΓΓΑΛΑ



Η παρούσα εργασία δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την συνεχή και αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγηση από την Δρ. Μαρουλιώ Ταλιέρη και τον Δρ. Viktor Magdolen. Δε θα ξεχάσω ποτέ τη βοήθειά τους και ό,τι με δίδαξαν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής, την Καθ. Νίκη Αγνάτη, τον Αν. Καθ. Δημήτρη Στεφάνου και τη Δρ. Ταλιέρη για τη βοήθειά τους. Επίσης, τους Καθηγητές Manfred Schmitt και Ελευθέριο Διαμαντή, καθώς η συνεργασία μαζί τους αποτέλεσε ουσιαστικό καταλύτη της διατριβής και τιμή για εμένα.

Ευχαριστίες ανήκουν επίσης στην Κωνσταντίνα Μαθιουδάκη και τη Sabine Kreuzburg, αλλά και σε όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο, για την εξαιρετική συνεργασία μας, για τη συμπαράστασή τους στις δύσκολες στιγμές και για τις άριστες προσωπικές σχέσεις που αναπτύξαμε.

Δε θα μπορούσα να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, για την συνεχή τους υποστήριξη σε όλες τις επιλογές μου. Ευχαριστώ, τέλος, την Δρ. Μαλένα Πάντου γιατί η παρουσία της μου δίνει δύναμη να ξεπερνά τις αντιξοότητες και να κοιτάζω πάντα ψηλά.

Η διατριβή αυτή αποτελεί δικαιωματικά έργο και όλων εκείνων που με δίδαξαν γνώσεις, επιστημονικό και προσωπικό ήθος και αξιοπρέπεια.

Τους Ευχαριστώ.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η καρκινική ανάπτυξη εξαρτάται εν πολλοίς από τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς. Κυρίαρχος παράγοντας που καθορίζει την δυνατότητα αυτή αποτελεί η πρωτεόλυση του εξωκυττάρου στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, έχει ιδιαίτερη σημασία για την ανακάλυψη νέων καρκινικών δεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων, η μελέτη των πρωτεολυτικών ενζύμων που εκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα.

Η οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών αποτελεί μία πολυγονιδιακή οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων με δραστικότητα ανάλογη της σερίνης, των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών τύπων. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια η μελέτη τους έχει κυρίως επικεντρωθεί στην αξιολόγηση του πιθανού τους ρόλου ως καρκινικών δεικτών, ιδιαίτερα σε καρκινικούς τύπους που επηρεάζονται από τις ορμόνες. Όντως, φαίνεται ότι ορισμένα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών παρουσιάζουν ιδιαίτερο διαγνωστικό/προγνωστικό ενδιαφέρον (π.χ. KLK3 στον καρκίνο του προστάτη, KLK6 και KLK10 στον καρκίνο των ωοθηκών). Πρόσφατες μελέτες όμως εμπλέκουν τις καλλικρεΐνες και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Η καλλικρεΐνη 7 αποτελεί ένα από τα λίγα μέλη της οικογένειας, για τα οποία έχει προταθεί συγκεκριμένος φυσιολογικός ρόλος, στη διαδικασία απολέπισης της κεράτινης στιβάδας του δέρματος. Οι πρώτες μελέτες για την KLK7 έδειξαν ορμονικό μηχανισμό ρύθμισης και διαφορική έκφραση του γονιδίου στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών.

Στόχος της παρούσης μελέτης ήταν 1) να διερευνηθεί η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε διάφορους ορμονοεξαρτώμενους τύπους καρκίνου, και συγκεκριμένα, σε γυναικολογικούς καρκίνους, προκειμένου να αυξηθεί η διαθέσιμη πληροφορία για την πιθανή χρησιμότητά της ως διαγνωστικού/προγνωστικού δείκτη και 2) να μελετηθεί η επίδραση της έκφρασης του ενζύμου της καλλικρεΐνης 7 μεμονωμένου ή σε συνδυασμό με άλλες καλλικρεΐνες στα καρκινικά κύτταρα.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α΄ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΚΙΝΟΣ	1
1.1. Κλινική εικόνα του καρκίνου	2
1.2. Αιτίες του καρκίνου	4
1.3. Ογκογένεση - Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων	4
1.4. Σταδιοποίηση του καρκίνου	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΙ	13
2.1. Καρκίνος των ωοθηκών	14
2.1.1. Επιδημιολογία	14
2.1.2. Παράγοντες προδιάθεσης και προστασίας	15
2.1.3. Δείκτες διάγνωσης και πρόγνωσης	17
2.1.4. Θεραπεία	18
2.1.5. Βιολογία του καρκίνου των ωοθηκών	18
2.2. Καρκίνος του ενδομητρίου	21
2.2.1. Επιδημιολογία	21
2.2.2. Προδιαθεσικοί Παράγοντες - Διάγνωση και θεραπεία	21
2.2.3. Βιολογία του καρκίνου του ενδομητρίου	23
2.3. Καρκίνος του μαστού	28
2.3.1. Επιδημιολογία	28
2.3.2. Παράγοντες προδιάθεσης	28
2.3.3. Διάγνωση και θεραπεία	28
2.3.4. Βιολογία του καρκίνου του μαστού	29
2.4. Βιολογικοί δείκτες	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	37
3.1. Πρωτεόλυση στη Διείσδυση και Μετάσταση των καρκινικών κυττάρων	38
3.2. Λυσοσωμικές Πρωτεάσες – Πρωτεάσες Κυστεΐνης	41
3.3. Μεταλλοπρωτεάσες	44
3.4. Ειδικές πρωτεάσες των ουδετερόφιλων κυττάρων	46
3.5. Πρωτεάσες Σερΐνης	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ	51
4.1. Ιστορική επισκόπηση	52
4.2. Γονιδιακή οικογένεια των ιστικών καλλικρεΐνων – γενικά χαρακτηριστικά	54
4.3. Ρύθμιση της έκφρασης και ενεργότητας των καλλικρεΐνων	56
4.4. Φυσιολογικός ρόλος των καλλικρεΐνων	58
4.5. Οι καλλικρεΐνες ως μέρος ενός νέου πιθανού ενζυμικού καταρράκτη ή μονοπατιού	59
4.6. Εξέλιξη της γονιδιακής οικογένειας των ιστικών καλλικρεΐνων	60
4.7. Καλλικρεΐνες και καρκίνος	62
4.8. Καλλικρεΐνες στη νεοπλασματική εξέλιξη	65
4.9. Ρύθμιση των καλλικρεΐνων στον καρκίνο	69
4.10. Κλινικές εφαρμογές των καλλικρεΐνων	70



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ 7	73
5.1. Γονίδιο KLK7: Οργάνωση, Ρύθμιση, Προϊόντα Συρραφής	74
5.2. Πρωτεΐνη hK7	75
5.3. Φυσιολογική κατανομή και λειτουργία	75
5.4. Καλλικρεΐνη 7 και καρκίνος	77

Β΄ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	79
6.1. Πληθυσμός μελέτης	80
6.2. Απομόνωση ολικού RNA	82
6.3. Αντιδράσεις RT-PCR	83
6.4. Ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τον προσδιορισμό της καλλικρεΐνης 7	83
6.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	84
6.6. Στατιστική ανάλυση	87
6.7. Ανοσοϊστοχημική μέθοδος για την ανίχνευση της καλλικρεΐνης 7	87
6.8. Στελέχη βακτηρίων	88
6.9. Αντιδράσεις περιορισμού και διασύνδεσης του DNA	88
6.10. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων DH5a και XL1 Blue και μετασχηματισμός	89
6.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια σε μικρή κλίμακα	90
6.12. Πέψεις των πλασμιδιακών DNA και επιλογή των κλώνων	90
6.13. Καλλιέργεια κυττάρων	91
6.14. Ασταθής διαμόλυνση κυττάρων	93
6.15. Σταθερή διαμόλυνση κυττάρων	93
6.16. Ανοσολογική δοκιμασία ELISA	93
6.17. Δοκιμασία Πολλαπλασιασμού	94
6.18. Μελέτη μεταστατικού δυναμικού καρκινικών κυττάρων	94
6.19. Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης καλλικρεΐνων στην ανάπτυξη καρκίνου σε ζωικό μοντέλο	95
6.20. Ανίχνευση του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου KLK7 με ταχεία επάυξηση του 5' άκρου του cDNA (5' RACE)	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
7.1. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές – Επίδραση χημειοφαρμάκων	100
7.2. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο του Μαστού	101
7.2.1. Ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου PCR για τη μέτρηση του mRNA της καλλικρεΐνης 7	101
7.2.2. Έκφραση του mRNA της KLK7 σε δείγματα καρκίνου του μαστού και συσχέτισή της με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους	104
7.2.3. Συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης του mRNA της KLK7 με την ελεύθερα υποτροπής επιβίωση (DFS)	104
7.2.4. Μελέτη της παράλληλης έκφρασης του mRNA των καλλικρεΐνών 5 και 7 και της κλινικής της σημασίας	110
7.3. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο του ενδομητρίου	119
7.4. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο των ωοθηκών	121
7.5. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο του Παχέως	

εντέρου	123
7.6. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 σε ενδοκρανιακούς όγκους	129
7.7. Ανοσοϊστοχημικός κυτταρικός εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7	134
7.8. Μελέτη της δράσης της καλλικρεΐνης 7 και άλλων καλλικρεΐνών στον καρκίνο	139
7.8.1. Διαμόλυνση και έκφραση μελών της οικογένειας των καλλικρεΐνών σε καρκινικά κύτταρα	139
7.8.2. Επίδραση της υπερέκφρασης των καλλικρεΐνών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	144
7.8.3. Επίδραση της υπερέκφρασης των καλλικρεΐνων στη δυνατότητα διήθησης του κυτταρικού περιβάλλοντος	147
7.8.4. Επίδραση της υπερέκφρασης των καλλικρεΐνων στην καρκινική ανάπτυξη	150
7.9. Μελέτη του υποκινητή της καλλικρεΐνης 7	157
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	161
8.1. Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε γυναικολογικούς και μη- τύπους καρκίνου	162
8.2. Ρόλος των καλλικρεΐνών στην καρκινική ανάπτυξη	170
8.3. Μελέτη του υποκινητή του γονιδίου KLK7	173
8.4. Μελλοντικές προοπτικές στην μελέτη και κλινική αξιοποίηση των καλλικρεΐνών	176
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	177
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	207
SUMMARY	209
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ & ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ	211



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ



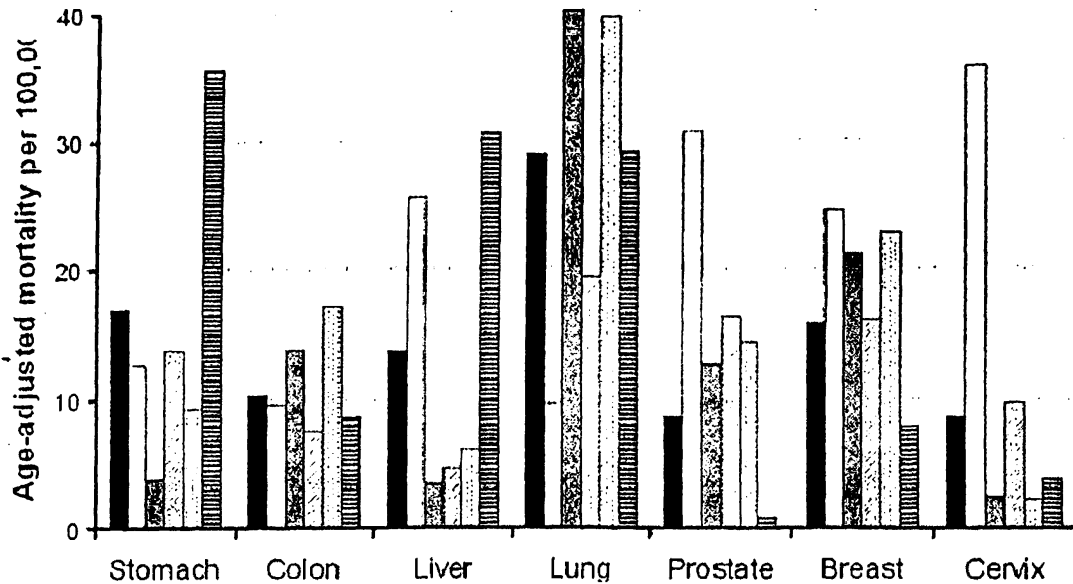
1.1 Κλινική εικόνα του καρκίνου

Η ασθένεια που αποκαλούμε καρκίνο στην πραγματικότητα περιλαμβάνει περισσότερο από 200 διαφορετικές νόσους. Όλες μαζί, είναι υπεύθυνες για το 1/5 περίπου όλων των θανάτων στο Δυτικό Κόσμο. Ο ένας στους τρεις ανθρώπους κάποια στιγμή στη ζωή του προσβάλλεται από κάποιον τύπο καρκίνου. Καθώς μάλιστα η εμφάνιση των περισσότερων καρκίνων σχετίζεται με την ηλικία, η αναμενόμενη αύξηση στο προσδόκιμο επιβίωσης αναμένεται να οδηγήσει σε αντίστοιχη αύξηση στον αριθμό των κρουσμάτων.

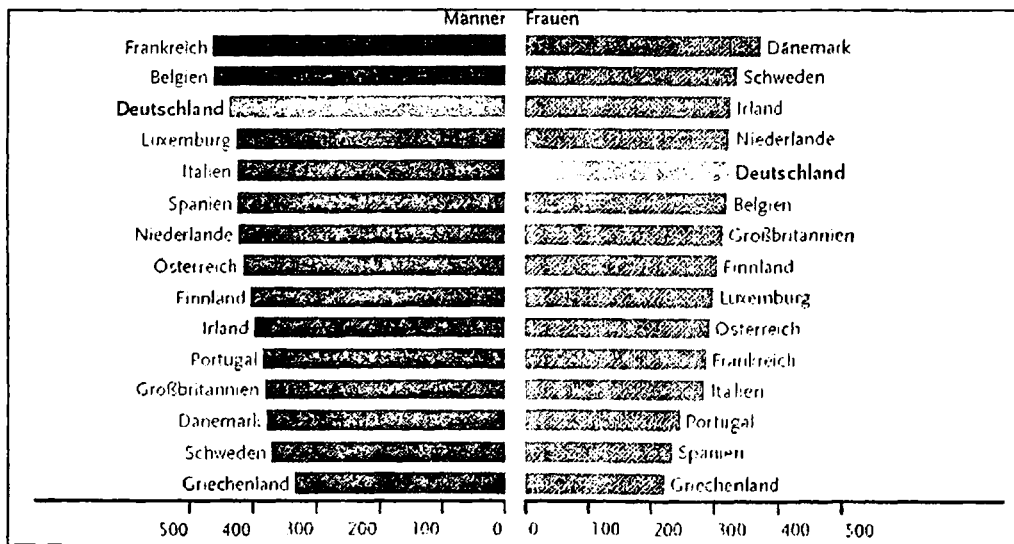
Ανάλογα με την ιστολογική προέλευση των καρκινικών κυττάρων, οι κακοήθεις όγκοι χωρίζονται σε 4 ομάδες: καρκίνωμα (όταν ένας συμπαγής όγκος σχηματίζεται από κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης), σάρκωμα (όταν τα κύτταρα προέρχονται από συνδετικό ιστό), λευχαιμία (από αιμοποιητικά κύτταρα) και λέμφωμα (από λεμφοκύτταρα). Οι επικρατέστεροι τύποι καρκίνου ως προς την συχνότητα εμφάνισης και τον αριθμό θανάτων ανήκουν στα καρκινώματα (Σχήμα 1.1). Οι καρκίνοι του πνεύμονα, του παχέως εντέρου (κόλον και ορθού), του μαστού και του προστάτη αποτελούν τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές κακοήθειας και παράλληλα τις κύριες αιτίες θανάτου από καρκίνο, με σημαντικές όμως διαφορές ανάμεσα σε διάφορες περιοχές του πλανήτη (Σχήμα 1.2). Η Ελλάδα, ευτυχώς βρίσκεται στην τελευταία θέση στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στην Ευρωπαϊκή Ένωση των 15 (Σχήμα 1.3).

Estimated New Cases*		Estimated Deaths	
Male	Female	Male	Female
Prostate 234,460 (33%)	Breast 212,920 (31%)	Lung & bronchus 90,330 (31%)	Lung & bronchus 72,130 (26%)
Lung & bronchus 92,700 (13%)	Lung & bronchus 81,770 (12%)	Colon & rectum 27,870 (10%)	Breast 40,970 (15%)
Colon & rectum 72,800 (10%)	Colon & rectum 75,810 (11%)	Prostate 27,350 (9%)	Colon & rectum 27,300 (10%)
Urinary bladder 44,690 (6%)	Uterine corpus 41,200 (6%)	Pancreas 16,090 (6%)	Pancreas 16,210 (6%)
Melanoma of the skin 34,260 (5%)	Non-Hodgkin lymphoma 28,190 (4%)	Leukemia 12,470 (4%)	Ovary 15,310 (6%)
Non-Hodgkin lymphoma 30,680 (4%)	Melanoma of the skin 27,930 (4%)	Liver & intrahepatic bile duct 10,840 (4%)	Leukemia 9,810 (4%)
Kidney & renal pelvis 24,650 (3%)	Thyroid 22,590 (3%)	Esophagus 10,730 (4%)	Non-Hodgkin lymphoma 8,840 (3%)
Oral cavity & pharynx 20,180 (3%)	Ovary 20,180 (3%)	Non-Hodgkin lymphoma 10,000 (3%)	Uterine corpus 7,350 (3%)
Leukemia 20,000 (3%)	Urinary bladder 16,730 (2%)	Urinary bladder 8,990 (3%)	Multiple myeloma 5,630 (2%)
Pancreas 17,150 (2%)	Pancreas 16,580 (2%)	Kidney & renal pelvis 8,130 (3%)	Brain & other nervous system 5,560 (2%)
All sites 720,280 (100%)	All sites 679,510 (100%)	All sites 291,270 (100%)	All sites 273,560 (100%)

Σχήμα 1.1: Κύριοι τύποι καρκίνου ως προς τον αριθμό κρουσμάτων και θανάτων στις ΗΠΑ - εκτίμηση για το 2006. *Δεν συμπεριλαμβάνονται οι βασεοκυτταρικοί και ακανθοκυτταρικοί καρκίνοι του δέρματος και *in situ* καρκινώματα πλην της ουροδόχου κύστης (American Cancer Society, 2006).



Σχήμα 1.2: Θνησιμότητα από επιλεγμένους τύπους καρκίνου σε διάφορες περιοχές του κόσμου το 2000. Σε κάθε ομάδα ράβδων από αριστερά προς δεξιά: Παγκόσμιος Μέσος Όρος, Αφρική, Βόρειος Αμερική, Νότιος Αμερική, Βορειο-Δυτική Ευρώπη, Κίνα (Πηγή: Shibuya et al, 2002).



Σχήμα 1.3: Συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στην Ευρωπαϊκή Ένωση για το έτος 1998. Κρούσματα ανά 100.000 άτομα (Robert Koch Institute, www.rki.de).

Η στατική περιγραφή του καρκίνου σήμερα αποκρύπτει βέβαια τις σημαντικές αλλαγές που έχουν συντελεστεί τις τελευταίες δεκαετίες. Για παράδειγμα, η μεγάλη κλίμακας βιομηχανοποίηση και η διάδοση βλαβερών συνηθειών, όπως το κάπνισμα, έχουν οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των καρκίνων του πνεύμονα, του νεφρού και της ουροδόχου κύστης. Η επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης συνδέεται με την αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου του προστάτη και των όρχεων, ενώ στην αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών αποδίδεται εν πολλοίς και η ανησυχητική αύξηση των δερματικών καρκίνων. Από την άλλη πλευρά, η βελτίωση της γενικής υγιεινής και της ποιότητας της τροφής έχουν συνεισφέρει στη θεαματική μείωση εμφάνισης του καρκίνου του στομάχου και του εντέρου. Παράλληλα, η ανάπτυξη πιο

ευαίσθητων διαγνωστικών μεθόδων έχουν οδηγήσει σε μείωση της θνησιμότητας μερικών τύπων καρκίνου, όπως της μήτρας (Schulz, 2005, American Cancer Society, 2006).

Δυστυχώς, όμως, η συνολική συχνότητα εμφάνισης αλλά και η θνησιμότητα του καρκίνου δεν έχουν μειωθεί σημαντικά από συνειδητή ανθρώπινη παρέμβαση τις τελευταίες δεκαετίες. Οι κύριοι τρόποι αντιμετώπισης του καρκίνου παραμένουν επί 30 χρόνια η χειρουργική αφαίρεση, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Η αποτελεσματικότητα αυτών των προσεγγίσεων, αν και βελτιωμένη, παραμένει περιορισμένη. Η σύγχρονη Ιατρική αναγνωρίζει ότι οι ελπίδες για αποτελεσματικότερη καταπολέμηση του καρκίνου βασίζονται στη κατανόηση της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας του.

1.2 Αιτίες του καρκίνου

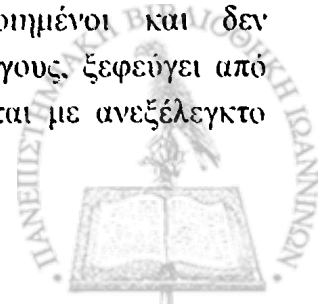
Ο καρκίνος προκαλείται από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες (χημικούς, φυσικούς ή βιολογικούς), αλλά και ενδογενείς διαδικασίες (Πίνακας 1.1). Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να δρουν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό, με διαφορετικούς μηχανισμούς και σε διαφορετικά στάδια της καρκινογένεσης, γεγονός που καθιστά εξαιρετικά δύσκολη τη μελέτη και κατανόηση της καρκινικής ανάπτυξης. Επιπλέον, υπάρχουν πολλοί παράγοντες, που αν και θεωρούνται ύποπτοι για καρκινογένεση, δεν έχουν πραγματοποιηθεί πλήρεις επιδημιολογικές μελέτες που να καταδεικνύουν τη σημασία τους.

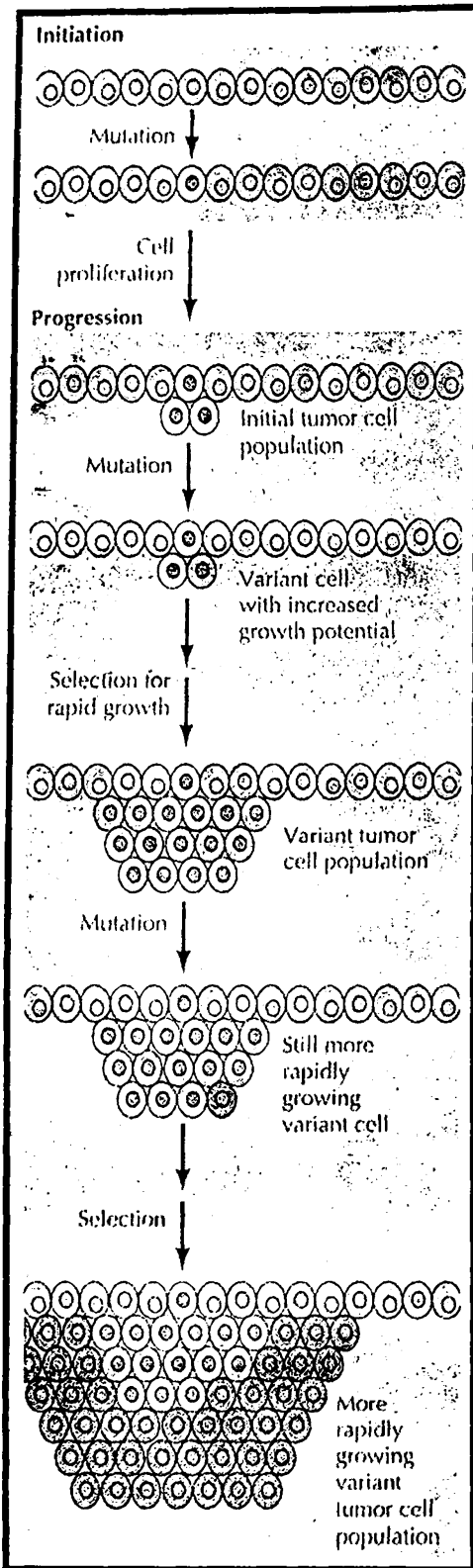
Τύπος καρκινογόνου παράγοντα	Παραδείγματα
Χημικοί παράγοντες	Νικέλιο, κάδμιο, αρσενικό, νιτροζαμίνες, τριχλωροεθυλένιο, αρυλαμίνας, βενζοπυρένιο, αφλατοξίνες, δραστικές ρίζες οξυγόνου
Φυσικοί παράγοντες	Υπεριώδης ακτινοβολία (κυρίως UVB), ιοντική ακτινοβολία
Βιολογικοί παράγοντες	Ιοί ανθρώπινου θηλώματος (HPV), Epstein-Bar και ηπατίτιδας Β, <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Schistosoma mansoni</i>
Ενδογενείς διεργασίες	Αντιγραφή DNA, μεταβολικές αντιδράσεις που παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου, χρόνια φλεγμονή

Πίνακας 1.1: Τύποι και παραδείγματα καρκινογόνων παραγόντων.

1.3 Ουγκογένεση - Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων

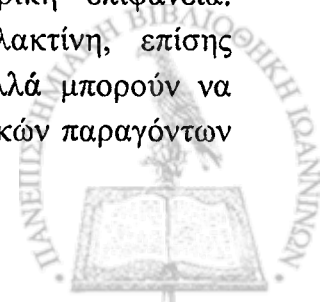
Τα φυσιολογικά κύτταρα είναι ενσωματωμένα στο περιβάλλον τους με αυστηρά ρυθμισμένο τρόπο. Η αύξησή τους επάγεται ή αναστέλλεται από εξωτερικούς ρυθμιστές, που δρουν μέσω διαφόρων κυτταρικών μονοπατιών. Στον ενήλικα οργανισμό, οι περισσότεροι κυτταρικοί πληθυσμοί είναι πλήρως διαφοροποιημένοι και δεν πολλαπλασιάζονται. Ο καρκίνος προκύπτει όταν, για διάφορους λόγους, ξεφεύγει από τον έλεγχο του περιβάλλοντός του και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται με ανεξέλεγκτο τρόπο (Σχήμα 1.4).





Σχήμα 1.4: Στάδια ανάπτυξης του καρκίνου: Η ανάπτυξη του καρκίνου ξεκινά όταν ένα κύτταρο υφίσταται εξαλλαγή και διαιρείται ανώμαλα. Ακολουθούν επιπρόσθετες μεταλλάξεις μέσω μιας διαδικασίας επιλογής των ταχύτερα διαιρούμενων κυττάρων του πληθυσμού.

Οι εξωκυτταρικοί παράγοντες που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό περιλαμβάνουν πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) και τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF), οι οποίοι προσδένονται σε υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης στην κυτταρική επιφάνεια. Κυτταροκίνες, όπως αυξητικές ορμόνες, ιντερλευκίνες, και προλακτίνη, επίσης προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς που δεν είναι κινάσες, αλλά μπορούν να μεταγουν σήματα αλληλεπιδρώντας με κινάσες. Μία άλλη τάξη αυξητικών παραγόντων



προσδένονται σε σπειροειδείς (serpentine) υποδοχείς, οι οποίοι συνδέονται με ενδοκυτταρικά μονοπάτια μέσω ετεροτριμερών G πρωτεϊνών. Τέλος, στεροειδείς ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα, που προσδένονται σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς, έχουν μιτωτική δράση. Όλες οι τάξεις υποδοχέων έχουν τη δυνατότητα να εκκινούν μονοπάτια μεταγωγής σήματος που αυξάνουν τη μιτωτική δράση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

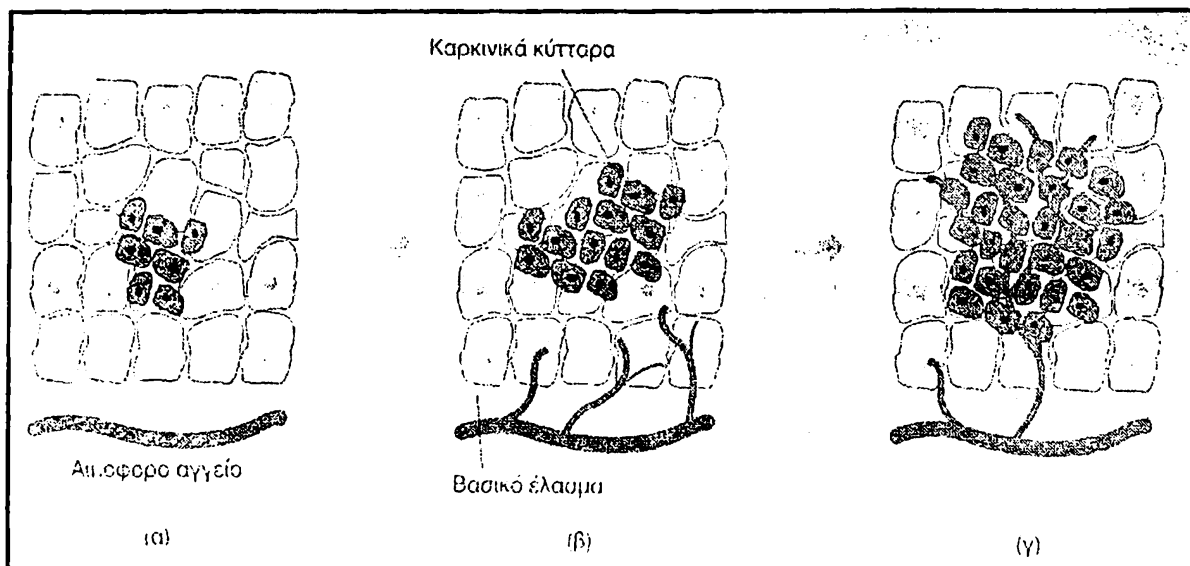
Στα καρκινικά κύτταρα, τα γονίδια που ελέγχουν τα μονοπάτια διέγερσης του πολλαπλασιασμού είναι συχνά μεταλλαγμένα, με αποτέλεσμα τη συνεχή δράση αυτών των σημάτων. Τα γονίδια αυτά μπορεί να έχουν θετική ή αρνητική αυξητική δράση, οπότε χαρακτηρίζονται αντίστοιχα ογκο-γονίδια ή ογκο-κατασταλτικά γονίδια. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα συχνά αναπτύσσουν δικό τους αυτοκρινές κύκλωμα, όπου ένας αυξητικός παράγοντας που απαιτείται για την ενεργοποίηση ενός προ-αυξητικού μονοπατιού παράγεται συνεχώς και εκκρίνεται στο εξωκυττάριο μέσο. Παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού συναντάται σε καρκινικά κύτταρα μαστού, που παράγουν τον παράγοντα TGF- α , ο οποίος ενεργοποιεί τον υποδοχέα του EGF, επάγοντας μιτωτικά μονοπάτια.

Άλλη μια φυσιολογική λειτουργία που απορυθμίζεται στα καρκινικά κύτταρα είναι η απόπτωση (Jacotot *et al*, 2000). Στο φυσιολογικό κύτταρο, μία σειρά προϋποθέσεων πρέπει να ικανοποιούνται πριν τη διαίρεση. Εάν υπάρχει ανεπανόρθωτη βλάβη στο DNA, το κύτταρο υφίσταται απόπτωση, ώστε η βλάβη να μη μεταφερθεί στα θυγατρικά κύτταρα. Στη διαδικασία της απόπτωσης πολύ σημαντικό ρόλο παίζει μία οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων κυστεΐνης, οι κασπάσες. Τα μόρια που ρυθμίζουν τη λειτουργία της απόπτωσης είναι συχνά μεταλλαγμένα ή αδρανοποιημένα στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά να μην μπορούν να εισέλθουν σε αποπτωτική διαδικασία.

Τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να ελέγχουν την αύξησή τους μέσω σημάτων και επαφής με τα γειτονικά τους κύτταρα. Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (cellular adhesion molecules, CAMs) και οι καντερίνες (cadherins) εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και ρυθμίζουν αρνητικά την ανάπτυξη. Τα μόρια καντερίνης γειτονικών κυττάρων προσδένονται μεταξύ τους με Ca^{++} -εξαρτώμενο τρόπο. Η πρόσδεση αυτή εμποδίζει τα κύτταρα να εισέλθουν σε μίτωση (Christofiori and Semb, 1999). Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν άλλα διακυτταρικά σήματα μέσω της οικογένειας των κατενινών, οι οποίες συνδέουν τις καντερίνες με τον κυτταροσκελετό και το μεταγραφικό μηχανισμό. Η αρνητική ρύθμιση που προκύπτει από την αλληλεπίδραση αυτών των μορίων χάνεται συχνά στα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, η καντερίνη των επιθηλιακών κυττάρων (E-καντερίνη) είναι μεταλλαγμένη, απύσα ή σε πολύ μικρή συγκέντρωση σε πολλούς τύπους καρκίνου. Άλλοτε, δεν γίνεται σωστή φωσφορυλίωση των κατενινών. Συχνά παρατηρούνται μεταλλάξεις σε ένα όγκο-κατασταλτικό γονίδιο που σχετίζεται με τη β -κατενίνη, το APC. Ως αποτέλεσμα, τα καρκινικά κύτταρα όταν βρίσκονται σε καλλιέργεια, δεν σχηματίζουν κυτταρικές συνδέσεις και παρουσιάζουν αυξημένη κινητικότητα και διηθητικότητα, ενώ δε σχηματίζουν μονό στρώμα ανάπτυξης, αλλά συσσωματώματα. Έτσι, η απώλεια της λειτουργίας αυτών των μορίων απορυθμίζει τη φυσιολογική διαδικασία της αναστολής μέσω επαφής, γεγονός που αποτελεί ορόσημο για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων

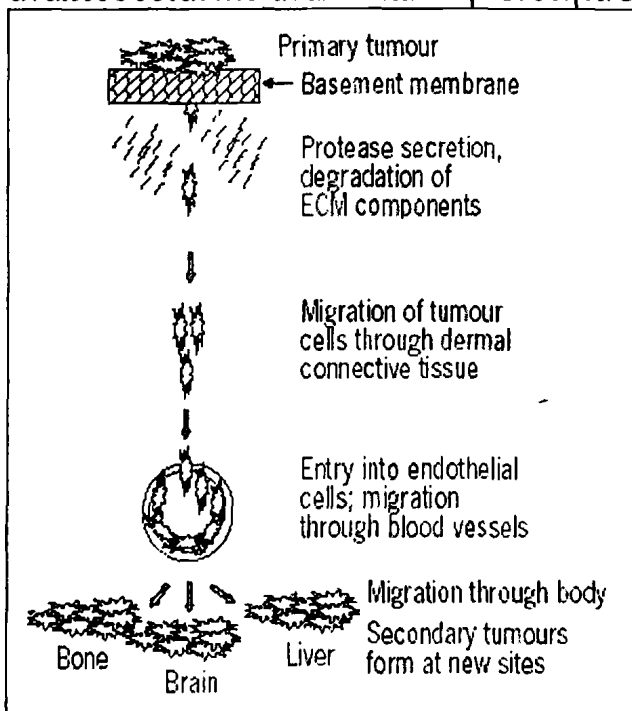
Η κυτταρική ανάπτυξη μπορεί επίσης να ρυθμιστεί από τις αλληλεπιδράσεις με το εξωκυττάριο στρώμα ή υπόστρωμα (όπως η βασική μεμβράνη) όπου μεγαλώνουν τα κύτταρα (Miyamoto *et al.*, 1998). Πρωτεΐνες όπως η φιβρονεκτίνη, που αποτελεί συστατικό του εξωκυττάριου στρώματος, προσδένονται σε υποδοχείς ιντεγκρίνης στην κυτταρική επιφάνεια. Οι υποδοχείς αυτοί τότε, σε συνεργασία με αυξητικούς παράγοντες, ενεργοποιούν μιτογονικά μονοπάτια. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν ισομορφές ή συνδυασμούς ιντεγκρινών που δεν συναντώνται σε φυσιολογικά κύτταρα, διαθέτοντας έτσι πρόσθετους μηχανισμούς διέγερσης των αυξητικών σημάτων.

Οι καρκινικοί όγκοι επιδεικνύουν επίσης εκτεταμένη αγγειογένεση, η οποία αυξάνει παράλληλα με τον όγκο (Folkman, 2000). Η αγγειογένεση ορίζεται ως η έκφυση νέων αγγείων από προϋπάρχον αγγειακό σύστημα και είναι κρίσιμη διαδικασία για την καρκινική ανάπτυξη, διείσδυση και μετάσταση. Στους φυσιολογικούς ιστούς ενηλίκων, αγγειογένεση παρατηρείται μόνο στην επούλωση πληγών και την εγκυμοσύνη, όπου σχηματίζονται νέοι ιστοί. Απουσία αγγείων, ο όγκος μπορεί να μεγαλώσει μέχρι μεγέθους ~1mm σε διάμετρο, απόσταση όπου το οξυγόνο και τα θρεπτικά μπορούν να διαχυθούν (Kurschaut and Mauch, 2000). Η αγγειογένεση, επομένως, επιτρέπει στον όγκο να αναπτυχθεί σε μέγεθος. Η εκδήλωση αγγειογενετικού φαινοτύπου αποτελεί πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν το ενδοθήλιο και το μικροπεριβάλλον του όγκου, και εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων. Η υπερέκφραση προ-αγγειογενετικών ερεθισμάτων και/ή απώλεια ανασταλτικών ρυθμιστών θεωρείται ότι ενεργοποιεί τη διαδικασία αυτή (Hanahan and Folkman, 1996) (Σχήμα 1.5).



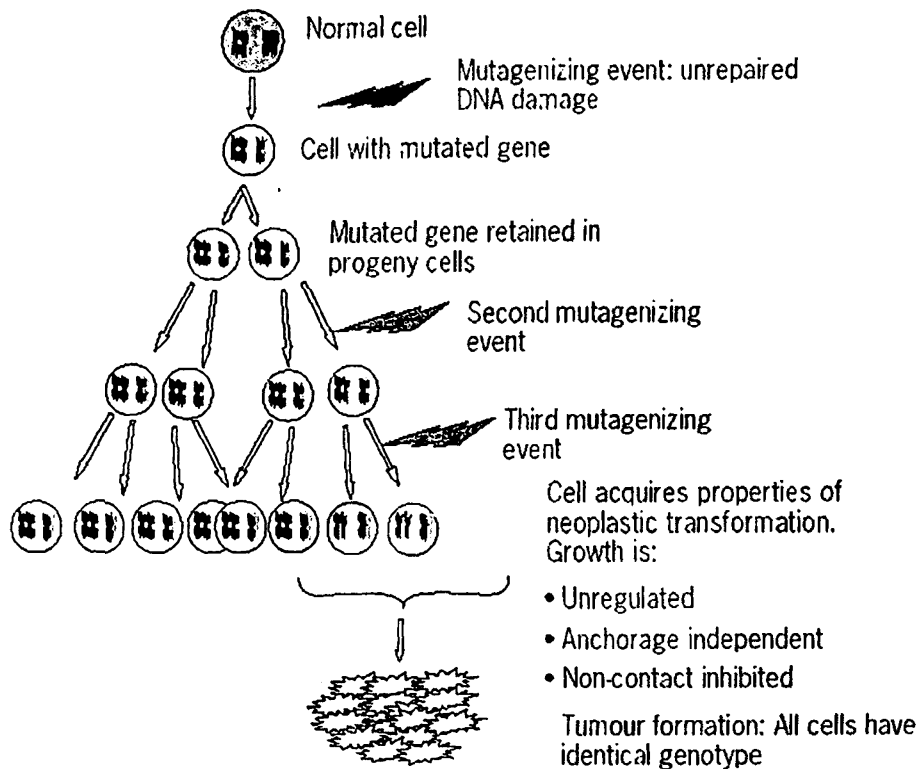
Σχήμα 1.5: Αγγειογένεση και ανάπτυξη του όγκου. Αρχικά τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν έναν μικρό όγκο (α), ο οποίος παραμένει μικρός έως ότου αρχίσει να εκκρίνει αυξητικούς παράγοντες που θα επάγουν την αγγειογένεση. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα προτεόλυση της βασικής μεμβράνης από ένζυμα που απελευθερώνονται από τον όγκο και τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, διευκολύνοντας τη μετανάστευση των τελευταίων προς το αγγειογενετικό ερέθισμα (β) με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη δημιουργία νέων αγγείων και τη συνεχή παροχή θρεπτικών στον όγκο, ο οποίος αυξάνεται απεριόριστα (γ).

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν συχνά την ικανότητα να μεταναστεύουν από το αρχικό σημείο του όγκου και να αναπτύσσονται σε άλλα όργανα του σώματος (Kurschaut and Mauch, 2000). Η ικανότητα μετάστασης προϋποθέτει την παραγωγή και έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων από τα καρκινικά κύτταρα. Τα ένζυμα αυτά αποδομούν το βασικό υμένα των αιμοφόρων αγγείων και έτσι, τα κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταναστεύουν σε άλλες περιοχές του σώματος. Τα μεταστατικά κύτταρα αποφεύγουν το ανοσολογικό σύστημα του οργανισμού και αναπτύσσουν δευτερογενή όγκο σε άλλο σημείο, που παρουσιάζει ευνοϊκό αυξητικό περιβάλλον για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Σχήμα 1.6). Επιπροσθέτως, τα κύτταρα του όγκου έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών από το υποκείμενο στρώμα ή τους ινοβλάστες. Η οικογένεια των καλλικρεϊνών συμμετέχει στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, η πρωτεόλυση, διείσδυση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων αναπτύσσεται πιο αναλυτικά στην ενότητα 3.1.

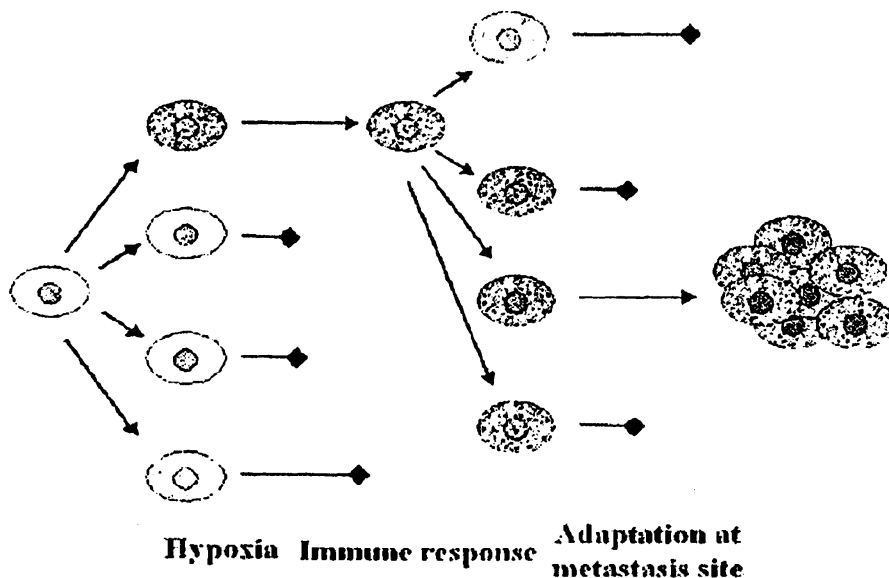


Σχήμα 1.6: Μεταστατική διαδικασία. Μεμονωμένα κύτταρα του πρωτογενούς όγκου αυξάνουν την παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεολυτικών ενζύμων, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του εξωκυττάρου στρώματος ή της βασικής μεμβράνης. Τα κύτταρα τότε δραπέτεύουν από τον όγκο και μεταναστεύουν, διηθώντας το συνδετικό ιστό. Αφού διαπεράσουν τα αγγειακά τοιχώματα, εισέρχονται στο αγγειακό σύστημα, από όπου και μεταφέρονται σε άλλες περιοχές του σώματος. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, τα μεταστατικά κύτταρα σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους.

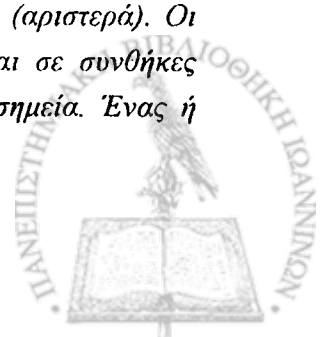
Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό γίνεται όταν απωλεσθεί η ικανότητα ρύθμισης των παραπάνω λειτουργιών. Η απώλεια ρύθμισης συμβαίνει όταν συσσωρεύονται μεταλλάξεις σε δύο ευρείες οικογένειες γονιδίων, τα ογκογονίδια, που λειτουργούν ως θετικά σήματα για την κυτταρική αύξηση και τα όγκο-κατασταλτικά γονίδια, που λειτουργούν ως τροχοπέδη ή σημεία ελέγχου. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να προκληθούν από τα αίτια που αναφέρθηκαν στην §1.2. Αυτό αποτελεί το πρώτο στάδιο σε μία πολυσταδιακή διαδικασία που μπορεί τελικά να καταλήξει σε έναν επιθετικό, μεταστατικό καρκίνο. Απαιτούνται περισσότερες από μία βλάβες προκειμένου ένα συσσωμάτωμα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων να εξελιχθεί σε καρκίνο (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7: Ανάπτυξη καρκινικού φαινοτύπου. Όταν ένα κύτταρο αποκτήσει μετάλλαξη σε ένα πρωτογονίδιο (που απεικονίζεται ως το γκρι χρωμόσωμα), η μετάλλαξη μεταφέρεται στις επόμενες γενεές. Ωστόσο, τα θυγατρικά αυτά κύτταρα παραμένουν φαινοτυπικά φυσιολογικά. Ο κυτταρικός μετασχηματισμός πραγματοποιείται με τη συσσώρευση επιπλέον μεταλλάξεων σε άλλα ρυθμιστικά, π.χ. ογκο-κατασταλτικά, γονίδια (που απεικονίζονται ως σκούρο γκρι χρωμόσωμα). Τώρα, το κύτταρο που έχει συσσωρεύσει αυτές τις μεταλλάξεις επιδεικνύει νεοπλασματική ανάπτυξη.



Σχήμα 1.8: Μοντέλο κλωνικής επιλογής στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η γενετική αστάθεια των καρκινικών κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό νέων κλώνων από τον αρχικό όγκο (αριστερά). Οι κλώνοι αυτοί επιλέγονται ανάλογα με την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται σε συνθήκες υποξίας και ανοσολογικής αντίδρασης, και να προσαρμόζονται σε μεταστατικά σημεία. Ένας ή περισσότεροι κλώνοι μπορεί να το πετύχουν (δεξιά).



1.4 Σταδιοποίηση του καρκίνου

Η εκδήλωση του καρκίνου μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα στάδια:

➤ **Φάση πρόκλησης.** Για τις περισσότερες μορφές καρκίνου το στάδιο αυτό διαρκεί 15-30 χρόνια, μέρος της διάρκειας των οποίων το άτομο εκτίθεται σε συγκεκριμένα καρκινογόνα ή υπόκειται σε τυχαίες μεταλλάξεις. Πρέπει να τονιστεί ότι η ευαισθησία στην επίδραση των καρκινογόνων διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό, ενώ επίδραση στην εξέλιξη της νόσου έχει ο βαθμός και η διάρκεια της έκθεσης. Η φάση πρόκλησης διαρκεί λιγότερο στις ακτινογενείς λευχαιμίες (2 χρόνια) και στους γενετικά καθορισμένους καρκίνους της βρεφικής ηλικίας.

➤ **In situ (τοπική) φάση.** Πρόκειται για στάδιο που διαρκεί 5-10 χρόνια, κατά το οποίο προκαρκινικές αλλοιώσεις επηρεάζουν τους ιστούς. Οι περισσότερες έρευνες για τις τοπικές αυτές αλλοιώσεις έχουν γίνει σε επιθηλιακούς ιστούς. Οι περισσότεροι από τους ενδοεπιθηλιακούς καρκίνους εξελίσσονται σε διηθητικούς, ενώ υπάρχει και ένα πολύ μικρό ποσοστό υποστροφής.

➤ **Φάση διήθησης.** Κατά το στάδιο αυτό τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται σε βαθύτερους ιστούς φτάνοντας ως τα λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία. Η διήθηση μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη πίεση που ασκεί ο όγκος, στη μεγαλύτερη αμοιβαδοειδή κίνηση των κυττάρων του και στη μικρότερη συνάφεια μεταξύ τους, στην απουσία μεσοκυτταρικών γεφυρών, καθώς και στην παραγωγή κυτταρολυτικών ουσιών από τα καρκινικά κύτταρα. Τελευταία δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι το σημαντικότερο ρόλο στη διήθηση παίζουν διάφορες πρωτεάσες που εκλύουν τα καρκινικά κύτταρα. Η φάση διήθησης μπορεί να διαρκέσει από 1 έως 5 χρόνια.

➤ **Φάση διασποράς.** Είναι το στάδιο κατά το οποίο δημιουργούνται μεταστάσεις σε άλλους ιστούς. Η διασπορά μπορεί να γίνει είτε μέσω του λεμφικού συστήματος (λεμφογενής διασπορά) είτε μέσω του κυκλοφορικού συστήματος (αιματογενής διασπορά).

Τόσο στην κλινική πρακτική, όσο και στην έρευνα, απαιτείται η ακριβής περιγραφή της κατάστασης του όγκου. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί συστήματα περιγραφής των φάσεων του καρκίνου, με βάση διάφορα χαρακτηριστικά αυτού.

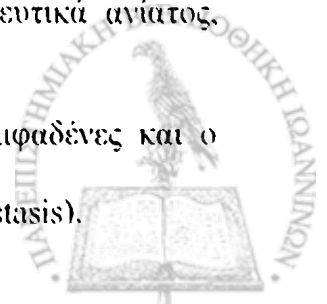
Ανάλογα με την επέκταση του όγκου, γίνεται η σταδιοποίηση (Staging). Η γενική κλινική σταδιοποίηση της νόσου περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Στάδιο 0: Καρκίνος in situ.
- Στάδιο I: Τοπική διήθηση χωρίς μεταστάσεις.
- Στάδιο II: Τοπική επέκταση του όγκου ή περιορισμένη διασπορά στους γειτονικούς λεμφαδένες.
- Στάδιο III: Εκτεταμένη τοπική επέκταση ή εκτεταμένη λεμφαδενική διασπορά.
- Στάδιο IV: Απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Αυτό το σύστημα χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια και είναι πολύτιμο για την εκτίμηση της πρόγνωσης και την αξιολόγηση της θεραπείας. Επειδή, όμως, δεν υπήρχε ομοφωνία όσον αφορά στη σταδιοποίηση των περισσότερων καρκίνων, προτάθηκε από μια ομάδα ειδικών ένα διεθνές σύστημα ταξινόμησης για διάφορους καρκίνους, το σύστημα TNM.

Καθώς ο όγκος αυξάνεται, ελεγκτείται και γίνεται προοδευτικά ανιάτος, υπάρχουν τρεις σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να υπολογιστούν:

- Η έκταση του όγκου (Tumor).
- Η παρουσία ή απουσία μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες και ο βαθμός συμμετοχής τους (Nodes).
- Η παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (Metastasis).



Το σύστημα TNM καθορίστηκε από τη Διεθνή Ένωση Κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer – UICC). Η έκταση της τοπικής νόσου (T) υποδεικνύεται με αριθμούς. Το T_{is} δείχνει καρκίνωμα in situ. Τα T₁, T₂, T₃, T₄ δείχνουν αυξανόμενη έκταση του όγκου. Παρομοίως, το N₀ δείχνει ότι δεν συμμετέχουν λεμφαδένες, ενώ τα N₁, N₂ αντιπροσωπεύουν αυξανόμενους βαθμούς συμμετοχής. Το M₀ δείχνει ότι δεν υπάρχει καμία μετάσταση, ενώ το M₁ υπογραμμίζει την παρουσία μεταστάσεων (Schulz, 2005, Allgayer *et al*, 2003).

Σήμερα πλέον έχει γίνει σταδιοποίηση όλων των καρκίνων με αυτό το σύστημα. Αν και αυτή η ταξινόμηση είναι κλινική και λιγότερο ακριβής από την παθολογoανατομική εξέταση των λεμφαδένων και άλλων ιστών, είναι ικανοποιητική σε διεθνές επίπεδο.

Ένας άλλος τρόπος περιγραφής των όγκων πραγματοποιείται με την ιστολογική και κυτταρολογική τους εξέταση. Η ιστολογική διαβάθμιση (Grading) καταγράφει το βαθμό κυτταρικής και πυρηνικής ατυπίας και το βαθμό οργάνωσης των ιστών του όγκου. Το κύριο σύστημα διαβάθμισης είναι το G:

- G0: όγκοι με κανονική διαφοροποίηση, χωρίς κυτταρική ατυπία
- G1-G3: όγκοι καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης, αντίστοιχα
- G4: όγκοι με κυτταρική μορφολογία εντελώς διαφορετική από τον υγιή ιστό, με έντονη ατυπία κυττάρων και πυρήνων και πλήρης απώλεια διαφοροποίησης



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ

ΚΑΡΚΙΝΟΙ



Γυναικολογικοί καρκίνοι είναι οι κακοήθεις όγκοι που αναπτύσσονται στα γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Αποτελούν περίπου το 13% όλων των καρκίνων των γυναικών, ενώ ευθύνονται για το 10% των θανάτων.

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από τις ωοθήκες, τη μήτρα, τον τράχηλο της μήτρας, τον κόλπο και το αιδοίο. Το σύστημα αυτό δίνει στη γυναίκα την ικανότητα της σύλληψης του εμβρύου, της εγκυμοσύνης, της προστασίας και θρέψης του αγέννητου βρέφους και της γέννησης.

Επειδή τα αναπαραγωγικά όργανα συνδέονται μεταξύ τους, η εξάπλωση του καρκίνου μεταξύ τους είναι πολύ συχνή. Ο καρκίνος φέρει το όνομα όπου αναπτύχθηκε πρωτογενώς. Οι πιο συχνοί γυναικολογικοί καρκίνοι είναι των ωοθηκών (30% των κρουσμάτων, 53% των θανάτων) και του ενδομητρίου (46% των κρουσμάτων). Ακολουθούν ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (17%), του κόλπου (3%) και του αιδοίου (4%) (American Cancer Society, 2006).

2.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί μία σημαντική κλινική πρόκληση για την γυναικολογική ογκολογία. Καθώς οι περισσότερες ασθενείς είναι ασυμπτωματικές ως ότου η ασθένεια έχει κάνει μεταστάσεις, τα δύο τρίτα των περιπτώσεων διαγιγνώσκονται με προχωρημένο στάδιο (stage). Για το λόγο αυτό, ο καρκίνος των ωοθηκών παρουσιάζει το μεγαλύτερο λόγο θνησιμότητας προς αριθμό περιπτώσεων από όλους τους γυναικολογικούς καρκίνους.

2.1.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος των ωοθηκών εμφανίζεται συχνότερα στις ΗΠΑ και το Ισραήλ, και σπανιότερα στην Ιαπωνία και τις αναπτυσσόμενες χώρες (Holschneider and Berek, 2000). Αποτελεί την 4^η αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες στις ΗΠΑ (American Cancer Society, 2005). Περισσότερες γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνο των ωοθηκών από ότι από όλους τους υπόλοιπους τύπους γυναικολογικών καρκίνων.

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί κατεξοχήν περι- και μετα-εμμηνοπαυσιακή ασθένεια, καθώς το 80-90% των κρουσμάτων εμφανίζεται μετά την ηλικία των 40 ετών. Λιγότερο από 1% των επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών εμφανίζεται πριν την ηλικία των 20 ετών. Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου των ωοθηκών κορυφώνεται στην ηλικία των 60 ετών (Greenlee *et al.*, 2000). Οι κληρονομικές μορφές του καρκίνου εμφανίζονται ~10 χρόνια νωρίτερα.

Η πλειονότητα των όγκων των ωοθηκών είναι σποραδικοί. Μόνο 5-10% των όγκων είναι οικογενείς. Στις γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών οι πιθανότητες να εμφανίσουν ίδιο τύπο καρκίνου ανέρχεται σε 9.4%.



2.1.2 Παράγοντες προδιάθεσης και προστασίας

Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών αυξάνει με την ηλικία και κορυφώνεται μετά τα 75 έτη. Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο είναι το οικογενειακό ιστορικό, παράγοντες που σχετίζονται με την αναπαραγωγική δραστηριότητα της γυναίκας και περιβαλλοντικοί-διατροφικοί παράγοντες.

Ο σημαντικότερος επιβαρυντικός παράγοντας για τον καρκίνο των ωοθηκών είναι το οικογενειακό ιστορικό της νόσου (Πίνακας 2.1). Ο κίνδυνος εξαρτάται από τον αριθμό των συγγενών πρώτου και δευτέρου βαθμού συγγένειας (μητρικής και πατρικής προέλευσης) που έχουν εμφανίσει καρκίνο των ωοθηκών ή του μαστού, αλλά και από την ηλικία αυτών κατά τη διάγνωση. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο ομάδες γυναικών με κληρονομική προδιάθεση για εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών για τις οποίες αναλύσεις γενετικών δένδρων υποδηλώνουν αυτοσωμική επικρατούσα μεταφορά με ποικίλη διείσδυση, εκείνες που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2. Επίσης, μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA μπορούν να οδηγήσουν σε ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών, σαν μέρος του συνδρόμου Lynch II ή κληρονομικού συνδρόμου μη πολυποδικού καρκίνου του κολον (HNPCC, Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer). Τέλος, είναι πιθανό να υπάρχουν και άλλα, άγνωστα ως τώρα, γονίδια που προδιαθέτουν σε οικογενή καρκίνο των ωοθηκών.

Η πλειονότητα των κληρονομικών κρουσμάτων καρκίνου των ωοθηκών φαίνεται να οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA, κυρίως του BRCA1, στο χρωμόσωμα 17q, και λιγότερο του BRCA2, στο χρωμόσωμα 13. Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών των δύο γονιδίων είναι 40% και 25% αντίστοιχα στις γυναίκες με κληρονομικό καρκίνο των ωοθηκών, αλλά μόλις 8 ως 10% στο σύνολο των περιπτώσεων (Szabo and King, 1997). Μία γυναίκα που φέρει μεταλλαγμένο BRCA1 γονίδιο, διατρέχει 30-40% κίνδυνο να αναπτύξει καρκίνο των ωοθηκών σε όλη τη διάρκεια της ζωής της και έως 87% κίνδυνο για καρκίνο του μαστού έως την ηλικία των 70 ετών (Holschneider and Berek, 2000). Για το γονίδιο BRCA2 τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 27% και 84%. Η παρουσία μεταλλαγών στο BRCA1 επίσης αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του κόλον και του προστάτη. Το γεγονός ότι δεν εμφανίζουν καρκίνο των ωοθηκών όλες οι γυναίκες με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια, αποδίδεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως ο τύπος των συγκεκριμένων μεταλλάξεων, η κατάσταση άλλων γονιδίων, επιγενετικά φαινόμενα και αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος.

Το σύνδρομο Lynch II (HNPCC) συνδυάζει τον οικογενή καρκίνο του κόλον με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών και του ενδομητρίου, καθώς και με άλλες κακοήθειες νόσους του γαστρεντερικού και του γεννητικού συστήματος. Συνδέεται στενά με μεταλλάξεις των επιδιορθωτικών γονιδίων του DNA MSH2, MLH1, PMS1 και PMS2 (Lynch and Smyrk, 1996).

Η μητρότητα σε νεαρή ηλικία θεωρείται επιβαρυντικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών, αυτό όμως δεν επιβεβαιώνεται από νεώτερες μελέτες. Η καθυστερημένη εμμηνόπαυση λιγότερο και η ατοκία περισσότερο, συνδέονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Αντίθετα, η φαρμακευτική



αγωγή που χορηγείται για την αύξηση της γονιμότητας δεν φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών (Bristow and Karlan, 1996, Rossing *et al.*, 1994, Cramer *et al.*, 1999).

	Πιθανότητα (%)	Σχετική πιθανότητα
Γενικός πληθυσμός	1,4-1,8	1
Παράγοντες επιβάρυνσης		
Οικογενειακό ιστορικό	9,4	5-7
Μετάλλαξη BRCA1	30-40	18-29
Μετάλλαξη BRCA2	27	16-19
LynchII/HNPCC ^a	10	6-7
Στείρωση		2-5
Ατοκία		2-3
Καθυστερημένη εμμηνόπαυση		1,5-2
Πρώιμη μητρότητα		1-1,5
Προστατευτικοί παράγοντες		
Πολυτεκνία		0,4-0,6
Χρήση αντισυλληπτικών		
x 4 χρόνια		0,6
x 8 χρόνια		0,5
x 12 χρόνια		0,4
Υστερεκτομή ή (TUBAL LIGATION)		0,4-0,6

Πίνακας 2.1: Παράγοντες που επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. HNPCC^a, Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer

Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες με αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών (π.χ. η χρήση ταλκ για την καθαριότητα των γεννητικών οργάνων, το κάπνισμα, η έκθεση σε ακτινοβολία, η έντονη φυσική δραστηριότητα, τα ψυχοτρόπα φάρμακα, αλλά και διατροφικοί παράγοντες, όπως η υπερκατανάλωση λακτόζης, γαλακτόζης και καφεΐνης) (Holschneider and Berek, 2000). Λήψη οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση, ιστορικό φλεγμονόδους ασθένειας στην πυελική περιοχή, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και ενδομητρίωση έχουν επίσης συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών (Purdie *et al.*, 1995, Schildkraut *et al.*, 1996, Brinton *et al.*, 1997).

Παράγοντες που μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών θεωρούνται η μητρότητα, φαρμακολογικοί παράγοντες και η υστερεκτομή.

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει τη σημασία της μητρότητας στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Υπολογίζεται ότι κάθε γέννα προκαλεί μείωση του κινδύνου κατά 16 με 22%, ανεξάρτητα από την ηλικία της πρώτης εγκυμοσύνης. Οι πολύτεκνες γυναίκες έχουν 40 με 60% μικρότερο κίνδυνο από τις άτεκνες. Ο θηλασμός επίσης προκαλεί μικρή μείωση του κινδύνου.

ενώ οι εγκυμοσύνες που καταλήγουν σε αποβολή ή έκτρωση δε φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση.

Έχει αποδειχτεί ότι η στοματική χρήση αντισυλληπτικών προστατεύει σημαντικά από τον καρκίνο των ωοθηκών. Ο κίνδυνος φαίνεται να μειώνεται περισσότερο, όσο πιο μακροχρόνια είναι η χρήση αυτής της μεθόδου αντισύλληψης (Πίνακας 2.1). Άτεκνες γυναίκες που χρησιμοποιούν αντισυλληπτικά επί 5 χρόνια ή περισσότερο, μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών όσο και γυναίκες που δεν έχουν κάνει χρήση τέτοιων ουσιών. Η αθροιστική δράση της χρήσης αντισυλληπτικών και της μητρότητας μειώνει ακόμα περισσότερο τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Δύο άλλοι φαρμακολογικοί παράγοντες που πιθανώς μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών είναι η ακεταμινοφένη και το συνθετικό ρετινοειδές φενρετινίδη (Holschneider and Berek, 2000).

Αρκετές μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η σαλπινγική περιέδεση και η υστερεκτομή συσχετίζονται με σημαντική και μακροχρόνια μείωση του κινδύνου για καρκίνο των ωοθηκών.

2.1.3 Δείκτες διάγνωσης και πρόγνωσης

Σήμερα δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμη αρκετά ακριβείς διαγνωστικές μέθοδοι για έλεγχο ρουτίνας του γενικού πληθυσμού. Οι πιο γνωστοί διαγνωστικοί δείκτες για τον καρκίνο των ωοθηκών είναι η εηέταση πυέλου, το κοιλικό υπερηχογράφημα, το CA125 και συνδυασμός τους (Sato *et al.*, 2000, Jacobs *et al.*, 1999). Οι υπάρχοντες δείκτες ωστόσο δεν αρκούν για την αποτελεσματική διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Τα επίπεδα του CA125 στο αίμα είναι υψηλά μόνο στο 50-60% των ασθενών. Μεγαλύτερη ευαισθησία ίσως να επιτευχθεί με παράλληλη χρήση διάφορων δεικτών. Πολλά μόρια (ογκο-εμβρυικά αντιγόνα, ένζυμα, συνένζυμα, αναστολείς ενζύμων, υποδοχείς, κυτταροκίνες, ορμόνες, φωσφολιπίδια) μελετώνται ως πιθανοί δείκτες.

Δείκτες πρόγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών είναι το στάδιο του όγκου, ο βαθμός του (grade), τα χαρακτηριστικά του ασθενή (π.χ. ηλικία), η παραμένουσα ασθένεια μετά το χειρουργείο, η απόκριση στη χημειοθεραπεία, αλλά και βιολογικοί δείκτες.

Ένας από τους πιο σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες είναι το στάδιο του όγκου. Μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες δείχνουν ότι η πενταετής επιβίωση ασθενών σταδίου I, II, III και IV ανέρχεται σε 92%, 67%, 39% και 12% αντίστοιχα (Nguyen *et al.*, 1993), αλλά σήμερα τα ποσοστά αυτά είναι υψηλότερα (Holschneider and Berek, 2000).

Αρκετά βιολογικά χαρακτηριστικά του όγκου σχετίζονται με την πρόγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Οι διπλοειδείς όγκοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση από τους ανευπλοειδείς. Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου HER-2/neu σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Για τα γονίδια p53 και BRCA1 δεν έχει ακόμη αποδειχτεί κάποιος προγνωστικός ρόλος.



2.1.4 Θεραπεία

Η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και, εκάστοτε, η ακτινοθεραπεία αποτελούν τις θεραπευτικές επιλογές. Η χειρουργική επέμβαση συνήθως περιλαμβάνει την αφαίρεση της μήτρας (υστερεκτομή), μίας ή δύο ωοθηκών και των σαλπίγγων (salpingo-oophorectomy). Σε περιπτώσεις πολύ πρώιμων όγκων, ιδιαίτερα σε νέες γυναίκες που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, αφαιρείται μόνο η μία ωοθήκη. Όταν η νόσος είναι σε πολύ προχωρημένο στάδιο, αφαιρούνται όλες οι κοιλιακές μεταστάσεις, προκειμένου να βελτιωθεί το αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας.

2.1.5 Βιολογία του καρκίνου των ωοθηκών

Ιστοπαθολογία

Περίπου το 90% όλων των καρκίνων των ωοθηκών είναι επιθηλιακοί, δηλαδή προέρχονται από σχετικά πολυδύναμα κύτταρα του celomic επιθηλίου ή τροποποιημένου μεσοθηλίου (modified mesothelium). Αυτά τα κύτταρα κατάγονται από το αρχέγονο μεσόδερμα και μπορούν να υποστούν μεταπλασία. Ο νεοπλαστικός μετασχηματισμός είναι το προϊόν συσσώρευσης γενετικών συμβάντων, όπως η γενετική προδιάθεση ή έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες, που οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Περίπου το 10% έως 20% των επιθηλιακών νεοπλασιών των ωοθηκών είναι οριακής ή χαμηλής κακοήθειας όγκοι, που χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού χωρίς διήθηση του στρώματος. Από τους διηθητικούς επιθηλιακούς καρκίνους, περίπου 75-80% είναι ορώδεις, 10% είναι βλεννώδεις και 10% είναι ενδομητριάδεις. Λιγότερο κοινοί τύποι περιλαμβάνουν clear cell, Brenner, μικροκυτταρικά και μη διαφοροποιημένα καρκινώματα. Πολλοί από αυτούς τους ιστολογικούς υποτύπους παρουσιάζουν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά του κατώτερου γενετικού συστήματος (π.χ. οι θηλώδεις ορώδεις όγκοι μοιάζουν με το αδενικό επιθηλιακό στρώμα του φαλλοπιανού αγωγού, οι βλεννώδεις όγκοι περιέχουν κύτταρα που μοιάζουν με τους ενδοτραχηλικούς αδένες). Οι μη επιθηλιακοί τύποι καρκίνου των ωοθηκών περιλαμβάνουν τους sex-cord stromal όγκους (6% του συνόλου), όγκους αρχέγονων κυττάρων (3%) και ακαθόριστους όγκους (1%) (Scully *et al.*, 1998).

Μοντέλα καρκινογένεσης στις ωοθήκες

Η αιτιολογία του καρκίνου των ωοθηκών είναι πολυπαραγοντική, με γενετικούς, περιβαλλοντικούς και ενδοκρινολογικούς παράγοντες να σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την καρκινογένεση. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεωρίες για την αιτιολογία του καρκίνου, οι οποίες δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενες. Η παρατήρηση ότι η ατοκία και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση αυξάνουν τον κίνδυνο του συγκεκριμένου καρκίνου, ενώ η εγκυμοσύνη, η γαλακτογονία και η χρήση αντισυλληπτικών τον μειώνουν, ενισχύει τη θεωρία Fathalla, σύμφωνα με την οποία η αδιάκοπη ωογονία, με την επαναλαμβανόμενη καταστροφή και αναγέννηση του επιθηλιακού στρώματος των ωοθηκών, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη πιθανότητα αυθορμητών μεταλλάξεων και, επομένως, σε υψηλότερο κίνδυνο για

καρκίνο των ωοθηκών. Φαίνεται να υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των κύκλων ωογονίας και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Ωστόσο, το μοντέλο αυτό δε μπορεί να εξηγήσει γιατί η υπογονιμότητα, που συχνά οφείλεται σε μειωμένη ή παντελώς ελλιπή ωογονία, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. Αυτό οδήγησε στη θεωρία ότι η υπερβολική διέγερση των ωοθηκών από γοναδοτροπίνες συνεισφέρει στον κίνδυνο καρκίνου. Πρόσφατες έρευνες, όμως, δείχνουν ότι τα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων (ιδιαίτερα της ανδροστενδιόνης και διυδροεπιανδροστερόνης/DHEA), και όχι γοναδοτροπινών, συνδέονται με υψηλότερο κίνδυνο. Η παρατήρηση ότι η χρήση ταλκ στην υγιεινή των γεννητικών οργάνων αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών, ενώ η περίδεση σαλπίνγων έχει αντίθετη δράση, ενισχύουν την υπόθεση ότι οι επιθηλιακοί όγκοι των ωοθηκών μπορεί να προέρχονται από μετασχηματισμό του επιφανειακού επιθηλίου των ωοθηκών εξαιτίας έκθεσης σε καρκινογόνες και μολυσματικές ουσίες από το περιβάλλον. Επίσης, παρατηρήσεις σε ωοθήκες που αφαιρούνται προφυλακτικά από γυναίκες υψηλού κινδύνου, δείχνουν διάφορες ιστολογικές αλλοιώσεις (π.χ. ψευδογράμμωση του επιθηλιακού στρώματος και όγκους επιθηλιακού ιστού/θηλωματώσεις, βαθιές φλοιώδεις εγκολπώσεις και έγκλειστες κύστες), που θεωρούνται από αρκετούς ερευνητές ως προ-κακοήθης φαινότυπος (Holschneider and Berek, 2000).

Ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι γενικά μία μονοκλωνική ασθένεια που ξεκινά από την ωοθήκη, ενώ τα θηλώδη ορώδη καρκινώματα που αναπτύσσονται στο περιτόναιο φορέων μετάλλαξης του BRCA1 μπορεί να είναι πολυκλωνικά. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί του κακοήθους μετασχηματισμού στον καρκίνο παραμένουν άγνωστοι, περιλαμβάνουν μάλλον μία πολυσταδιακή διαδικασία που οδηγεί σε συσσώρευση γενετικών αλλαγών σε γονίδια διαφόρων τάξεων. Η απορύθμιση ογκογονιδίων, που μπορεί να οφείλεται σε ένθεση υποκινητή, πολλαπλασιασμό γονιδίων, χρωμοσωμική μετάθεση ή σημειακή μετάλλαξη, προκαλεί ενεργοποίηση ή υπερέκφραση αυτών των συνήθως κυρίαρχων γονιδίων. Τα ογκογονίδια που έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται σε μεγάλο ποσοστό των κρουσμάτων καρκίνου των ωοθηκών είναι το K-ras και το HER-2/neu (Holschneider and Berek, 2000). Οι όγκοι των ωοθηκών επιδεικνύουν διαφορετική απόκριση σε πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο EGF (epidermal growth factor), ο TGF (transforming growth factor) και η ιντερλευκίνη-6. Η αδρανοποίηση ογκο-κατασταλτικών γονιδίων εξαιτίας μετάλλαξης, απαλοιφής ή επιγενετικής καταστολής, παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών. Το BRCA1, που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA είναι μεταλλαγμένο στο 30% των κληρονομικών και στο 10% των μη κληρονομικών κρουσμάτων (Scully *et al.*, 1997). Το p53, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, επίσης παρουσιάζει μεταλλάξεις στο 30% των περιπτώσεων. Μια άλλη τάξη γονιδίων, τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair genes) είναι υπεύθυνα



για τα περισσότερα κρούσματα συνδρόμου Lynch II, και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου των ωθηκών (Lynch and Smyrk, 1996).



2.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Ο καρκίνος του ενδομητρίου προκύπτει όταν τα κύτταρα που σχηματίζουν την εσωτερική επίστρωση της μήτρας (ενδομήτριο) αρχίζουν να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα. Ο τύπος αυτός καρκίνου είναι ο τέταρτος συνηθέστερος στις γυναίκες και ο πιο συχνός από τους γυναικολογικούς καρκίνους. Αν και εμφανίζεται γενικά στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, σε ηλικία >45 ετών, περίπου 30% των περιπτώσεων εμφανίζονται πριν την ηλικία των 40 ετών. Περισσότερο από 95% των καρκίνων της μήτρας εμφανίζονται στο ενδομήτριο, συνήθως ως αδενοκαρκίνωμα. Αυτό ξεκινά με τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου (άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία) και αποτελείται από ώριμα, καλά διαφοροποιημένα κύτταρα. Σπανιότερα, ο καρκίνος του ενδομητρίου ξεκινά χωρίς προηγηθείσα υπερπλασία και τότε σχηματίζεται από κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης. Σε αυτήν την περίπτωση, εμφανίζεται συνήθως ως θηλώδες, ορώδες και clear cell καρκίνωμα και χαρακτηρίζεται από χειρότερη πρόγνωση για την ασθενή.

2.2.1 Επιδημιολογία

Ο υψηλότερος ρυθμός εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου στις ΗΠΑ εμφανίζεται στις Καυκάσιες, Αφρο-αμερικανίδες και Ιαπωνέζες και ο χαμηλότερος στις Ινδιάνες, Κορεάτισσες και Βιετναμέζες (Schulz, 2005). Αν και εμφανίζεται γενικά στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, σε ηλικία >45 ετών, περίπου 30% των περιπτώσεων εμφανίζονται πριν την ηλικία των 40 ετών. Συνήθως, ο όγκος εκδηλώνεται σε πρώιμο στάδιο και είναι ιάσιμος με 5ετή επιβίωση όλων των ασθενών κατά 90% στο στάδιο I και κατά 30-50% στο στάδιο II. Μετά τη χειρουργική επέμβαση περίπου 40% των ασθενών αναπτύσσουν μετάσταση (Cecil, 2003). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι σποραδικός, αλλά στο 10% των περιπτώσεων είναι κληρονομικός (Salvesen and Woolley, 2002).

2.2.2 Προδιαθεσικοί Παράγοντες - Διάγνωση-Θεραπεία

Η ακριβής αιτία του καρκίνου του ενδομητρίου παραμένει άγνωστη, είναι όμως ξεκάθαρο ότι τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, όταν δεν ισορροπούν με την προγεστερόνη, μπορούν να προκαλέσουν αφύσικη ανάπτυξη του ενδομητρίου. Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του ενδομητρίου είναι αρκετοί.

Η ηλικία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, καθώς ο κίνδυνος αυξάνει σημαντικά σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και την ηλικία των 50 ετών. Η παχυσαρκία, επίσης, καθώς ο λιπώδης ιστός μπορεί να προκαλέσει τη μετατροπή άλλων χημικών του σώματος σε οιστρογόνα. Ο διαβήτης αλλά και η υπέρταση, αυξάνουν επίσης τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου, για λόγους που δεν έχουν ακόμη σαφώς διευκρινισθεί.

Εξαιρετικά σημαντικός είναι ο ρόλος διαφόρων παραμέτρων που σχετίζονται με το ορμονικό σύστημα. Οι γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία αντικατάστασης οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση έχουν ως 12 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του ενδομητρίου, εφόσον δε λαμβάνουν παράλληλα και προγεστερόνη.



Επίσης, σε γυναίκες με ακανόνιστο εμμηνορροϊκό κύκλο, που εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις οιστρογόνων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, διαταράσσεται η ισορροπία της αλληλεπίδρασης οιστρογόνων και προγεστερόνης, με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του ενδομητρίου. Η πρόωμη εμμηνορροια, η καθυστερημένη εμμηνόπαυση, η στειρότητα, το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και η ατοκία ή ο μικρός αριθμός γεννών προκαλούν μεγαλύτερη ή μικρότερη αύξηση του κινδύνου. Τα υψηλά επίπεδα προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχουν προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου του ενδομητρίου. Η λήψη ταμοξιφένης από γυναίκες που εμφάνισαν καρκίνο του μαστού αποτελεί επίσης επιβαρυντικό παράγοντα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως, η ωφέλεια από τη δράση του φαρμάκου στον καρκίνο του μαστού είναι πολύ σημαντικότερη από την αύξηση του κινδύνου που προκαλεί για ανάπτυξη καρκίνου του ενδομητρίου.

Οι περισσότεροι καρκίνοι του ενδομητρίου είναι αδενοκαρκινώματα. Το οικογενειακό ή ατομικό ιστορικό γυναικολογικών καρκίνων ή καρκίνου του εντέρου αποτελεί ισχυρή ένδειξη αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη κακοήθειας και στο ενδομήτριο. Γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2, ή το γονίδιο NPCC (non-polyposis colorectal cancer) ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου (Bristow, 1999).

Το καρκίνωμα του ενδομητρίου παρατηρείται χαρακτηριστικά σε περιεμμηνοπαυσιακές ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τα συνηθέστερα συμπτώματα του καρκίνου του ενδομητρίου είναι η κοιλιακή ανομοιορφία και αιμορραγία. Μετά την εμμηνόπαυση ακόμη και η ελάχιστη αιμορραγία πρέπει να οδηγεί σε διερεύνηση αναζήτησης καρκίνου του ενδομητρίου. Αντίθετα με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ο ενδομητριάκος καρκίνος μπορεί να εξαπλωθεί απευθείας στους παρα-αορτικούς λεμφαδένες, παρακάμπτοντας τους πνευλικούς λεμφαδένες. Οι ασθενείς με προχωρημένη νόσο μπορεί να έχουν συμπτώματα από το ουροποιητικό ή πόνο στην οσφύ ή στην πύελο ή ακόμη μπορεί να αναπτύξουν αιματογενείς πνευμονικές μεταστάσεις. Όταν υπάρχει υποψία για το συγκεκριμένο καρκίνο, η διάγνωση μπορεί να γίνει με βιοψία ενδομητρίου ή διαστολή και απόξεση (D&C). Κολπικός υπέρηχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μέτρηση του πάχους του ενδομητρίου. Σπανιότερα μπορεί να εφαρμοστεί ηχοϋστερογραφία ή υστεροσκοπία. Αν διαγνωσθεί καρκίνος, η θεραπεία καθορίζεται ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο αυτού.

Με βάση το σύστημα σταδιοποίησης που έχει θεσπίσει η Διεθνής Ομοσπονδία Γυναικολογίας και Μαιευτικής (FIGO), ο καρκίνος του ενδομητρίου χωρίζεται σε 4 στάδια:

- Στάδιο I: ο όγκος περιορίζεται στη μήτρα
- Στάδιο II: ο όγκος βρίσκεται και στον τράχηλο της μήτρας
- Στάδιο III: ο όγκος έχει εξαπλωθεί εκτός της μήτρας, αλλά περιορίζεται στην περιοχή της λεκάνης
- Στάδιο IV: ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στην ουροδόχο κύστη, το έντερο ή άλλα σημεία του σώματος



Το 70% των καρκίνων του ενδομητρίου που αφαιρούνται χειρουργικά χαρακτηρίζονται ως σταδίου I και 10-15% ως σταδίου II. Ο καρκίνος επίσης διαβαθμίζεται (Grade 1-3), με βάση τη μικροσκοπική ανάλυση της επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων. Η θεραπεία του καρκίνου του ενδομητρίου εξαρτάται από το μέγεθος, το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησής του.

Ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης για τα περισσότερα στάδια του καρκίνου του ενδομητρίου είναι η χειρουργική αφαίρεση. Ανάλογα με την επέκταση του όγκου, μπορεί να πραγματοποιηθεί διακοιλιακή υστερεκτομή και σαλπινγο-ωοθηκεκτομή ή ολική υστερεκτομή (Rubin, 2002). Ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία αποτελούν συμπληρωματικές θεραπείες, σε ασθενείς σταδίου II ή μεγαλύτερου (Cecil, 2003).

Η δυνατότητα διάγνωσης του καρκίνου του ενδομητρίου σε πρώιμο στάδιο παρέχει τη δυνατότητα έγκαιρης αντιμετώπισης με αποτέλεσμα να αυξάνουν σημαντικά οι πιθανότητες θεραπείας. Η πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης για ασθενείς σταδίου I και II (~85% του συνόλου των περιπτώσεων) είναι 90% και 60%, αντίστοιχα. Τα όργανα όπου συνήθως εξαπλώνεται ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι οι πνεύμονες, το συκώτι, τα οστά, ο εγκέφαλος, ο κόλπος και οι λεμφαδένες (Laurie, 2000).

2.2.3 Βιολογία του καρκίνου του ενδομητρίου

Το μοντέλο των δυο παθογενετικών τύπων καρκίνου του ενδομητρίου

Έχουν ανακαλυφθεί δυο διαφορετικά μονοπάτια καρκινογένεσης του σποραδικού καρκινώματος του ενδομητρίου: ένα οιστρογονο- εξαρτώμενο (τύπου I) και ένα οιστρογονο – ανεξάρτητο (τύπου II). Τα δυο αυτά μονοπάτια οδηγούν στην εμφάνιση όγκων με διαφορετικό φαινότυπο και διαφορετική βιολογική συμπεριφορά (Lax, 2004).

Η πλειοψηφία των σποραδικών καρκίνων του ενδομητρίου (τουλάχιστον 70-80%) είναι τύπου I. Φαίνεται ότι η ανάπτυξή τους στηρίζεται σε οιστρογονική διέγερση (Potischman *et al*, 1996), αφού αποτελούν εξέλιξη υπερπλασίας του ενδομητρίου, στην οποία εκφράζονται ορμονικοί υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) (Lax *et al*, 1998) και εμφανίζονται υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό (Sherman *et al*, 1997). Ιστολογικά, οι όγκοι τύπου I παρουσιάζουν ενδομητριώδη διαφοροποίηση, είναι χαμηλού βαθμού κακοήθειας και έχουν μικρή τάση για διήθηση.

Η κύρια αιτία υπεροιστρογονισμού είναι η ενδογενής υπερπαραγωγή οιστρογόνων, λόγω παχυσαρκίας και ανωορρηκτικών κύκλων κατά τη διάρκεια της περιεμμηνοπαυσιακής και μετεμμηνοπαυσιακής περιόδου. Τα οιστρογόνα δρουν απερίσπαστα, λόγω της έλλειψης προγεστινών από τη μειωμένη παραγωγή ωαρίων. Επίσης, υπεροιστρογονισμός μπορεί να προκληθεί μετά από ορμονοθεραπεία μόνο με οιστρογόνα (Weiderpass *et al*, 1999) και λιγότερο από το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ή από νεοπλασμάτα που παράγουν οιστρογόνα, όπως οι όγκοι κοκκιωδών κυττάρων.



Η ασυνήθης μορφή του βλεννώδους αδενοκαρκινώματος θεωρείται τύπου I, επειδή εκφράζει συνήθως υποδοχείς ER και/ή PR και είναι χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Κλινικά, τα καρκινώματα τύπου I χαρακτηρίζονται από καλή βιολογική συμπεριφορά.

Περίπου 10-20% των καρκινωμάτων του ενδομητρίου είναι τύπου II, ακολουθούν το οιστρογόνο – ανεξάρτητο μονοπάτι και αναπτύσσονται σε ατροφικό ενδομήτριο (Sherman *et al*, 1995). Αυτοί οι όγκοι, συνήθως, εμφανίζονται σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας, περίπου 5-10 χρόνια μεγαλύτερες από αυτές που εμφανίζουν όγκο τύπου I. Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό κακοήθειας, μη ενδομητριώδη διαφοροποίηση και οδηγούν συχνά σε μεταστάσεις. Συνήθως, είναι ορώδη ή clear cell καρκινώματα. Η έκφραση των υποδοχέων ER και PR είναι τις περισσότερες φορές αρνητική ή ελάχιστα θετική και τα επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό είναι φυσιολογικά. Το ορώδες καρκίνωμα συνδέεται με το ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα του ενδομητρίου, το οποίο θεωρείται πιθανός πρόδρομός του. Τα καρκινώματα τύπου II: ορώδες και clear cell, έχουν επιθετική κλινική συμπεριφορά και κακή πρόγνωση. Συγκεκριμένα, το ορώδες καρκίνωμα έχει κακή πρόγνωση και συνήθως εξαπλώνεται εκτός μήτρας (Lax, 2004).

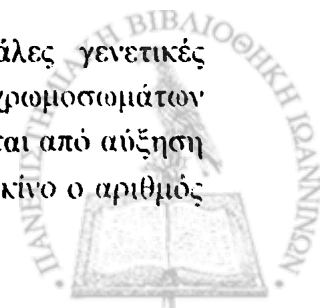
Ωστόσο, δεν είναι δυνατόν όλα τα καρκινώματα του ενδομητρίου να ταξινομηθούν σε έναν από τους δυο τύπους. Υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις, όπως μια ομάδα ενδομητριακών καρκινωμάτων υψηλού βαθμού κακοήθειας που δεν εντάσσονται στα καρκινώματα τύπου II. Το γεγονός ότι αυτά τα υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκινώματα εκφράζουν τουλάχιστον σε μικρό βαθμό υποδοχείς ER και/ή PR και περιέχουν εστίες καλά διαφοροποιημένων κυττάρων υποστηρίζει την οιστρογόνο – εξαρτώμενη ανάπτυξή τους (Lax *et al*, 1998). Μια άλλη ομάδα καρκινωμάτων του ενδομητρίου χαμηλού βαθμού κακοήθειας που εκφράζουν υποδοχείς ER και PR και που θεωρητικά ανήκουν στον τύπο I, είναι οιστρογόνο – ανεξάρτητα και εμφανίζονται σε ατροφικό ενδομήτριο.

Το μοντέλο των δυο τύπων καρκινογένεσης στο ενδομήτριο δημιουργήθηκε από τον J. Bokhman (Bokhman, 1983), βασιζόμενο αποκλειστικά σε κλινικές παρατηρήσεις και κλινικο – παθολογικά χαρακτηριστικά. Αργότερα, ενισχύθηκε με μοριακά και γενετικά δεδομένα (Sherman *et al*, 1995, Catusus *et al*, 1998, Lax *et al*, 2000, Matias-Guiu *et al*, 2001).

Μοριακή βάση του καρκίνου του ενδομητρίου

Η ανάπτυξη του καρκίνου συνοδεύεται από συσσώρευση διαφόρων μεταλλάγων, κυρίως στα ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια και από αυξημένη γενετική αστάθεια. Η γενετική αστάθεια μπορεί να είναι χρωμοσωμική (Chromosome Instability, CIN) ή μικροδορυφορική (Microsatellite Instability, MIN) (Kinzler *et al*, 1996).

Η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) χαρακτηρίζεται από μεγάλες γενετικές αλλαγές, όπως η απώλεια ή απόκτηση βραχιόνων ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων (Lengauer *et al*, 1997). Η CIN εξελίσσεται σταδιακά και χαρακτηρίζεται από αύξηση των ανώμαλων χρωμοσωμικών σχηματισμών. Στον προχωρημένο καρκίνο ο αριθμός



των χρωμοσωμικών ανωμαλιών παραμένει σταθερός σε κάθε καρκινικό κύτταρο, διότι πλέον σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα έχουν αποκτήσει τον «ιδανικό» γονότυπο που χρειάζονται για τον συνεχή πολλαπλασιασμό, την αύξηση και την εξάπλωσή τους.

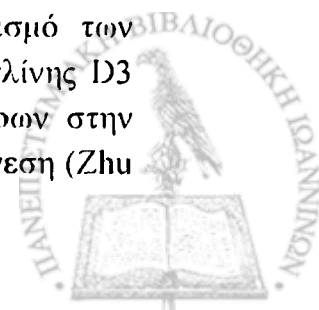
Η μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) χαρακτηρίζεται από μικρές γενετικές αλλοιώσεις, όπως πλαισιοτροποποιητικές μεταλλαγές στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδιώματος, τις μικρο- και μινι-δορυφορικές αλληλουχίες (Perucho, 1996). Συνήθως, οι μεταλλαγές στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες επιδιορθώνονται από ένα σύστημα πρωτεϊνών (mismatch repair system) που απομακρύνει και αντικαθιστά τις λάθος ζευγαρωμένες βάσεις του DNA (Risinger *et al.*, 1996). Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες αυτού του συστήματος είναι οι MLH1, MSH2 και MSH6.

Τα ενδομητριάκα καρκινώματα τύπου I και II διαφέρουν ως προς τη γενετική αστάθεια και τις μοριακές αλλοιώσεις, από τις οποίες προκύπτουν.

Γονίδιο	Λειτουργία	Καρκινώματα τύπου I	Καρκινώματα τύπου II
hMLH1, hMSH2, hMSH6	επιδιορθωτικά γονίδια του DNA	20-40%	0-5%
K-ras	ογκογονίδιο	15-30%	0-5%
p53	ογκοκατασταλτικό	10-20%	90%
PTEN	ογκοκατασταλτικό	35-50%	10%
β-κατενίνη	ρυθμιστικό γονίδιο	25-40%	0-5%
p16 ^{INK4a}	ογκοκατασταλτικό	10%	40%
ε-καντερίνη	ρυθμιστικό γονίδιο	10-20%	80-90%
Bcl-2	αντι-αποπτωτικό γονίδιο	30%	10%

Πίνακας 2.2: Σύγκριση των μοριακών αλλοιώσεων σε κάθε τύπο καρκίνου του ενδομητρίου (Lax, 2004).

Το ενδομητριάδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από ποικιλία γενετικών αλλοιώσεων, που αφορούν κυρίως στις πρωτεΐνες που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και ευθύνονται για την κυτταρική προσκόλληση και μεταγωγή σήματος. Το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο στο ενδομητριάδες καρκίνωμα είναι το ογκοκατασταλτικό PTEN, το οποίο εδράζεται στην περιοχή 10q23 του χρωμοσώματος (Salvesen *et al.*, 2002) και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που έχει λειτουργία παρόμοια με την κινάση της τυροσίνης (Mutter, 2001). Η πρωτεΐνη PTEN είναι μια φωσφατάση που αναστέλλει τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω αναστολής της έκφρασης του γονιδίου p27 (μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην εκκριτική φάση του κύκλου) και μέσω επαγωγής της κυκλίνης D3 (ενεργοποιείται από οιστρογόνα και επάγει πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην παραγωγική φάση), γεγονότα που μπορεί να συνεισφέρουν στην καρκινογένεση (Zhu



et al, 2001). Το 83% των ενδομητριοδών καρκινωμάτων παρουσιάζουν αλλοιωμένο γονίδιο PTEN και απώλεια έκφρασής του. Το μοριακό γεγονός στις περιπτώσεις απώλειας έκφρασης του PTEN είναι, συνήθως, μια σημειακή μεταλλαγή του και λιγότερο συχνά η απώλεια ετεροζυγωτίας του (Mutter *et al*, 2000).

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) είναι, επίσης, μια σημαντική γενετική αλλοίωση στα ενδομητριοδή καρκινώματα και αφορά 20-45% των καρκίνων (McDonald *et al*, 2000). Η συχνότερη αιτία MIN στα σποραδικά ενδομητριοδή καρκινώματα είναι η απενεργοποίηση του γονιδίου MLH1, λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή του, η οποία ακολουθείται από απώλεια έκφρασης των γονιδίων MSH2 και MSH6 (Simpkins *et al*, 1999; Staebler *et al*, 2000). Αντιθέτως, στα ορώδη καρκινώματα η MIN είναι σπάνια (Lax, 2004).

Μια από τις πρώτες αλλοιώσεις που περιγράφηκαν στον ενδομητριοδή καρκίνο είναι οι μεταλλαγές ενεργοποίησης του πρωτο – ογκογονιδίου K-ras (Caduff *et al*, 1995) που εμφανίζονται στο 20-30% των περιπτώσεων. Εντοπίζονται κυρίως στο εξόνιο 1 και σπάνια στο εξόνιο 2 του γονιδίου. Μεταλλαγές του K-ras και του PTEN δεν φαίνεται να συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο (Semczuk *et al*, 2001). Μεταλλαγές των PTEN και K-ras σπάνια εμφανίζονται στον ορώδη τύπο καρκινώματος (Lax, 2004).

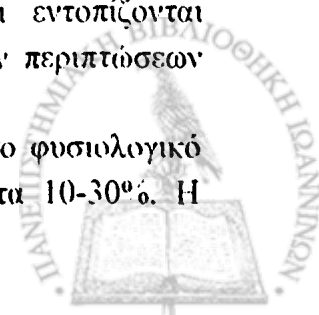
Μεταλλαγές της β-κατενίνης έχουν βρεθεί σε περίπου 20% των ενδομητριοδών καρκινωμάτων. Η β-κατενίνη μαζί με την ε-καντερίνη σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνο για την κυτταρική προσκόλληση. Επιπλέον, όταν η β-κατενίνη απελευθερωθεί από το σύμπλεγμα με την ε-καντερίνη μπορεί να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής γονιδίων που εμπλέκονται στην αύξηση και στην ανάπτυξη. Το μονοπάτι της β-κατενίνης ενεργοποιείται από μεταλλαγές ενεργοποίησης της β-κατενίνης ή από μεταλλαγές απενεργοποίησης της ε-καντερίνης. Ορισμένοι ερευνητές εντόπισαν μεταλλαγή της β-κατενίνης στο 50% των καρκινωμάτων υψηλού βαθμού κακοήθειας (Schlosshauer *et al*, 2002).

Απώλεια έκφρασης ή πολύ μειωμένη έκφραση της ε-καντερίνης, λόγω απώλειας ετεροζυγωτίας, εμφανίστηκε στο 62% και στο 87% αντίστοιχα των περιπτώσεων ορώδους καρκινώματος (Holcomb *et al*, 2002), ενώ δεν βρέθηκαν μεταλλαγές ενεργοποίησης στη β-κατενίνη.

Μεταλλαγές του p53 βρέθηκαν στο 10-20% των ενδομητριοδών καρκινωμάτων, κυρίως υψηλού βαθμού κακοήθειας. Στα καρκινώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας και στην άτυπη υπερπλασία δεν βρέθηκαν μεταλλαγές του p53, ενώ στους όγκους grade 2 οι μεταλλαγές του p53 είναι σπάνιες (Lax *et al*, 2000). Οι μεταλλαγές στο p53 σχετίζονται σχεδόν πάντα με ανευπλοειδία και δεν φαίνεται να συνυπάρχουν με μεταλλαγές του PTEN στον ίδιο όγκο (Koul *et al*, 2002).

Στο ορώδες και στο clear cell καρκίνωμα, όμως, απαντάται κατά κανόνα σημαντική χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) και ανευπλοειδία και εντοπίζονται μεταλλαγές του p53 που οδηγούν σε υπερέκφραση, στο 90% των περιπτώσεων (Nordstrom *et al*, 1996; Tashiro *et al*, 1997).

Η αντι – αποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται περιοδικά στο φυσιολογικό ενδομήτριο αλλά και στα ενδομητριοκά καρκινώματα με συχνότητα 10-30%. Η



έκφραση του *hcl-2* δεν σχετίζεται με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ή με το στάδιο της νόσου και μάλλον δεν έχει προγνωστική αξία για τον καρκίνο του ενδομητρίου. Η *hcl-2* εκφράζεται συχνότερα σε ενδομητριώδη από ότι σε ορώδη καρκινώματα.

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR εκφράζεται στο 50% των καρκίνων του ενδομητρίου, κυρίως στους μη ενδομητριώδεις τύπους. Η έκφρασή του σχετίζεται με την παρουσία μεταστάσεων την περίοδο της διάγνωσης και με μειωμένη επιβίωση του ασθενούς.

Η πρωτεΐνη *c-erbB-2* είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη – υποδοχέας αυξητικού παράγοντα που παρουσιάζει ομολογία με τον EGFR. Υπερέκφραση του *c-erbB-2* εντοπίζεται στο 10-85% των καρκίνων ενδομητρίου και σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας, διήθηση του μυομητρίου και των λεμφαγγείων. Άρα, φαίνεται να είναι δείκτης μειωμένης επιβίωσης. Υπερέκφραση και επέκταση του γονιδίου σχετίζονται με υψηλού βαθμού κακοήθεια σε ορώδη και *clear cell* καρκινώματα (Sivridis & Giatromanolaki, 2001).

Η σημασία της πρωτεΐνης – ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου *p16* στον καρκίνο του ενδομητρίου είναι ακόμη αμφιλεγόμενη, αφού η αλλοιώσεις του διαφέρουν πολύ στις σχετικές μελέτες. Σε μια μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη βρέθηκε απώλεια έκφρασης του γονιδίου *p16^{INK4a}* σε λιγότερο από 10% των περιπτώσεων ενδομητριώδους καρκινώματος (Milde-Langosch *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 1999). Η απώλεια έκφρασης του *p16^{INK4a}* παρατηρείται συχνότερα στο ορώδες (45% των περιπτώσεων) παρά στο ενδομητριώδες καρκίνωμα (Halperin *et al.*, 2001).

Για το *clear cell* καρκίνωμα του ενδομητρίου δεν έχουν υπάρξουν ακόμη δημοσιεύσεις που να αφορούν ικανό αριθμό δειγμάτων, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα. Εικάζεται ότι το *clear cell* καρκίνωμα μοιάζει με το ορώδες σε μοριακό επίπεδο, αφού έχουν παρόμοια κλινική συμπεριφορά και ιστολογία (Lax, 2004).

Οι περισσότερες γενετικές αλλοιώσεις που παρουσιάζονται στο ενδομητριώδες καρκίνωμα συμβαίνουν πολύ νωρίς κατά την καρκινογένεση, αν και δεν είναι σαφές ποιες από αυτές σχετίζονται άμεσα με τον κακοήγη μετασχηματισμό. Στην άτυπη υπερπλασία εντοπίζονται μεταλλαγές στα γονίδια *PTEN*, *β-κατενίνη*, *K-ras*, καθώς και μικροδορυφορική αστάθεια. Ωστόσο, οι μεταλλαγές των *PTEN* και *K-ras* συμβαίνουν νωρίτερα, αφού έχουν εντοπιστεί στο στάδιο της απλής υπερπλασίας. Η έκφραση της *ε-καντερίνης* στην απλή υπερπλασία είναι φυσιολογική, ενώ στο 40% των περιπτώσεων άτυπης υπερπλασίας δεν είναι φυσιολογική, χωρίς όμως να είναι μεθυλιωμένος ο υποκινητής της (Moreno-Bueno *et al.*, 2003). Πιθανόν, η μεταλλαγή και η μεθυλίωση της *ε-καντερίνης* να συμβαίνουν κατά την μετατροπή της άτυπης υπερπλασίας σε ενδομητριώδες καρκίνωμα.

Στο ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα του ενδομητρίου, τον πρόδρομο του ορώδους καρκινώματος, εντοπίζονται μεταλλαγές στο 80% των περιπτώσεων. Έτσι, πιθανότατα συμβαίνει μεταλλαγή σε ένα από τα αλληλόμορφα του *p53* νωρίς κατά την ανάπτυξη του ενδοεπιθηλιακού καρκινώματος και κατόπιν, η απώλεια του φυσιολογικού δεύτερου αλληλόμορφου οδηγεί σε περαιτέρω εξαλλαγή σε ορώδες καρκίνωμα (Tashiro *et al.*, 1997).



2.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία από τις πρώτες αιτίες θανάτου από καρκίνο του γυναικείου πληθυσμού. Στις χώρες του δυτικού κόσμου ο κίνδυνος ανάπτυξης αυτού του καρκίνου στη διάρκεια της ζωής ανέρχεται σε 10%. Αποτελεί σε μεγάλο βαθμό κληρονομικό καρκίνο, ενώ πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή του παίζουν τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη. Όπως και στον καρκίνο των ωοθηκών, τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 θεωρούνται τα βασικά ογκο-κατασταλτικά γονίδια που επηρεάζονται στον καρκίνο του μαστού.

2.3.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερα εμφανιζόμενη κακοήθεια στις γυναίκες και τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα. Η ευρεία χρήση της μαστογραφίας ως διαγνωστικής μεθόδου τα τελευταία χρόνια έχει αυξήσει τον αριθμό των κρουσμάτων παγκοσμίως. Ωστόσο, το ποσοστό θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού μειώνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα καλύτερης ενημέρωσης των γυναικών, έγκαιρης διάγνωσης και πιο αποτελεσματικής θεραπείας (American Cancer Society, 2006).

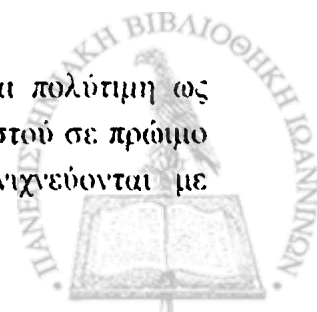
2.3.2 Παράγοντες προδιάθεσης

Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνει με την ηλικία. Οι πρωταρχικοί παράγοντες που προδιαθέτουν για τη συγκεκριμένη κακοήθεια περιλαμβάνουν κάποιες κληρονομούμενες γενετικές μεταλλάξεις (BRCA1 και BRCA2), προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, υψηλή πυκνότητα του μαστικού ιστού και υπερπλασία επιβεβαιωμένη με βιοψία (ιδιαίτερα ατυπική υπερπλασία). Άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες είναι το μακρύ εμμηνορροϊκό ιστορικό, η έκθεση σε ιοντική ακτινοβολία, η πλούσια σε λιπαρά διαίτα και η παχυσαρκία μετά την εμμηνόπαυση, η στοματική χρήση αντισυλληπτικών, η μετα-εμμηνοπαυσιακή ορμονοθεραπεία (ιδιαίτερα η συνδυασμένη θεραπεία με οιστρογόνα και προγεστίνη), η ατοκία ή γέννηση του πρώτου παιδιού μετά την ηλικία των 30 ετών και η συχνή κατανάλωση αλκοόλ.

Αντίθετα, ο θηλασμός, η μέτρια ή έντονη σωματική δραστηριότητα και η διατήρηση του κανονικού βάρους, σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Η ταμοξιφένη και, πιθανώς, η ραλοξιφένη επίσης μειώνουν τον κίνδυνο σε γυναίκες που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Η προληπτική μαστεκτομή σε φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο, παρόλο που δεν θα ανέπτυσαν καρκίνο του μαστού όλες οι γυναίκες που κάνουν αυτή την επιλογή (Schulz, 2005, Tavassoli *et al.*, 2003).

2.3.3 Διάγνωση και Θεραπεία

Η μαστογραφία, αν και έχει ορισμένους περιορισμούς, είναι πολύτιμη ως διαγνωστικό εργαλείο, καθώς μπορεί να αναγνωρίσει όγκους του μαστού σε πρώιμο στάδιο, πριν από την ανάπτυξη φυσικών συμπτωμάτων που ανιχνεύονται με



ψηλάφηση. Η έγκαιρη διάγνωση σώζει ζωές και αυξάνει τις θεραπευτικές επιλογές. Όταν ο καρκίνος έχει μεγαλώσει αρκετά, μπορεί να ανιχνευθεί από φυσικά σημάδια και συμπτώματα, που περιλαμβάνουν όγκο, πάχυνση, πρήξιμο, στρεβλωση ή ευαισθησία στο μαστό, ερεθισμό του δέρματος, πόνο στη θηλή, εξέλκωση, φολιδωση, συστολή. Πόνος στο μαστό είναι συνήθης σε καλοήθεις όγκους και δεν αποτελεί το πρώτο σύμπτωμα το καρκίνου. Γυναίκες υψηλού κινδύνου δύνανται να κάνουν επιπρόσθετες εξετάσεις, όπως υπέρηχο μαστού, MRI και γενετικά τεστ.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού. Ανάλογα με το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά του όγκου και τις επιλογές της ασθενούς, μπορεί να γίνει λυμφεκτομή (τοπική απομάκρυνση του όγκου), ολική ή ριζική μαστεκτομή (χειρουργική αφαίρεση του μαστού), ολική ή επιλεκτική απομάκρυνση των βοηθητικών λεμφαδένων (κάτω από τη μασχάλη), ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία (με κυκλοφωσφαμίδιο, μεθοτρεξάτη, φλουορακίλη, δοξορουβικίνη, επιρουβικίνη, ταξόλη κ.α.) ή ορμονοθεραπεία (με ταμοξιφένη ή αναστολείς της αρωματάσης). Συχνά γίνεται συνδυασμός των παραπάνω προσεγγίσεων. Ανοσοθεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα (trastuzumab/Herceptin) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν ο όγκος είναι θετικός για HER2/neu ή δεν αντιμετωπίζεται με τη χημειοθεραπεία. Εάν ο όγκος δεν έχει πραγματοποιήσει μεταστάσεις σε άλλα όργανα, η λυμφεκτομή είναι εξίσου αποτελεσματική με την μαστεκτομή. Στις περιπτώσεις *in situ* ductal καρκινώματος (DCIS) συνίσταται επίσης λυμφεκτομή ή μαστεκτομή, συνδυασμό με ακτινοθεραπεία (American Cancer Society, 2006).

Η πενταετής επιβίωση για ασθενείς με καρκίνο του μαστού που δεν έχει επεκταθεί στους λεμφαδένες ή άλλες περιοχές του σώματος, ανέρχεται σήμερα στο 98% από 80% τη δεκαετία του 1950. Όταν όμως ο καρκίνος έχει επεκταθεί στο μαστό το ποσοστό είναι 80%, ενώ όταν υπάρχουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα, μόλις 26%. Η 5ετής επιβίωση για όλα τα στάδια του καρκίνου είναι 88%, και η 10ετής 77%.

2.3.4 Βιολογία του καρκίνου του μαστού

Έχουν βρεθεί τουλάχιστον επτά ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπου κληρονομούμενες μεταλλάξεις στο ένα αλληλόμορφο οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού (πίνακας 2.3). Από αυτά, τα BRCA1 και BRCA2 ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό των κρουσμάτων.

Το PTEN κωδικοποιεί για μία φωσφολιπιδική και πρωτεϊνική φωσφατάση που ελέγχει το μονοπάτι PI3K. Το γονίδιο αυτό ευθύνεται για το σύνδρομο του Cowden, το οποίο συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Το p53 έχει πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της γενομικής σταθερότητας του κυττάρου και μεταλλάξεις σε αυτό ευθύνονται για πολλούς τύπους καρκίνου. Τα γονίδια MLH1 και MSH2 συμμετέχουν στην διόρθωση των αταίριαστων ζευγών βάσεων. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια προκαλούν το σύνδρομο HNPCC, αλλά αυξάνουν και τον κίνδυνο διαφόρων καρκίνων. Το γονίδιο LKB1 κωδικοποιεί για μία κινάση σερίνης/θρεωνίνης, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της μίτωσης. Μεταλλάξεις σε αυτό προκαλούν κυρίως καρκίνους του εντέρου και του κόλον, αλλά αυξάνουν και τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού.



Γονίδιο	Θέση	Λειτουργία	Εμπλοκή σε άλλους καρκίνους
BRCA1	17q21	Διόρθωση DNA / έλεγχος ομόλογου ανασυνδυασμού	ωοθηκών
BRCA2	13q12	Διόρθωση DNA / έλεγχος ομόλογου ανασυνδυασμού	ωοθηκών
PTEN	10q23.1	Ρύθμιση μονοπατιού PI3K	αρκετοί
p53	17p13.1	Έλεγχος γενωμικής ακεραιότητας & διόρθωση DNA	πολλοί
MLH1, MSH2	3p21, 2p15-	Διόρθωση mismatch DNA	αρκετοί
LKB1	1619p13.3	Μιτωτικός έλεγχος	εντέρου

Πίνακας 2.3: ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 ευθύνονται για περίπου 50% των κληρονομικών καρκίνων. Οι μεταλλάξεις αυτές προδιαθέτουν σχεδόν αποκλειστικά για καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών. Για το λόγο αυτό ονομάστηκαν BRCA (BREast CAncer).

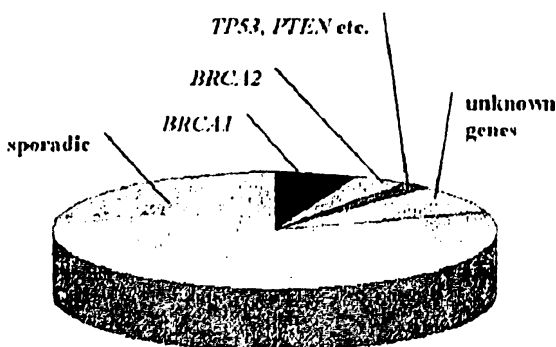
Οι μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA εκτείνονται σε όλο σχεδόν το μήκος τους. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις στο ένα αλληλόμορφο (που κληρονομούνται στους απογόνους) είναι μικρές ελλείψεις ή ενθέσεις, που προκαλούν μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης (frameshift), μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense) που δίνουν κολοβωμένες πρωτεΐνες, αλλά και δυσυνθετικές (missense) μεταλλάξεις. Δηλαδή συμβάντα που αναστέλουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Στις περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, και το δεύτερο αλληλόμορφο αδρανοποιείται από απαλοιφή, ανασυνδυασμό ή σημειακή μετάλλαξη. Σε περιπτώσεις σποραδικών καρκίνων, αντίθετα, δεν παρατηρούνται ποτά μεταλλάξεις ή απαλοιφές, αλλά η αδρανοποίηση των γονιδίων σχετίζεται με αυξημένη μεθυλίωση των ρυθμιστικών τους αλληλουχιών.

Οι πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2 εκφράζονται σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, την προστασία από χρωμοσωμικά σπασίματα και την μεταγωγή σημάτων. Έλλειψη οποιασδήποτε από τις δύο πρωτεΐνες οδηγεί σε αύξηση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Οι ανωμαλίες αυτές συναντώνται σε καρκίνους μαστού που φέρουν μεταλλάξεις στα δύο γονίδια και οφείλονται κυρίως σε ελλειμματική επιδιόρθωση ομόλογου ανασυνδυασμού και δευτερευόντως στην μη ενεργοποίηση κυτταρικών μηνυμάτων. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι τα γονίδια BRCA, αν και εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, προκαλούν σχεδόν αποκλειστικά καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών και σε πολύ μικρότερο βαθμό άλλων οργάνων. Μία εξήγηση για αυτό φαίνεται να είναι ότι οι πολλαπλοί κύκλοι ανάπτυξης και γήρανσης στα κύτταρα του μαστού και των ωοθηκών αυξάνουν την πιθανότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών, εκτός αν το κυτταρικό σύστημα επιδιόρθωσης των

βλαβών λειτουργεί πλήρως. Επίσης, τα BRCA1 και p53 αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα οιστρογόνων. Έτσι, μια δεύτερη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι οι πρωτεΐνες αυτές περιορίζουν την αναπτυξιακή και αντι-αποπτωτική δράση του ενεργοποιημένου υποδοχέα σε επιθηλιακούς ιστούς.

Γυναίκες που έχουν κληρονομήσει μεταλλάξεις στα BRCA1 και BRCA2 διατρέχουν κίνδυνο 40-80% να εμφανίσουν καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους, σε σχέση με το 10% του γενικού πληθυσμού. Ο κίνδυνος για καρκίνο των ωοθηκών αυξάνεται ως και 20 φορές. Η ακριβής αύξηση του κινδύνου εξαρτάται από το είδος της μετάλλαξης αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Εκτός αυτού, η κακοήθεια εμφανίζεται σε μικρότερη ηλικία, ενώ παράλληλα αυξάνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης ανεξάρτητου καρκίνου και στους δύο μαστούς ή στα δύο όργανα (μαστό και ωοθήκες).

Υπολογίζεται ότι περίπου 10% των καρκίνων των μαστού οφείλονται σε μεταλλάξεις σε κάποια από τα γονίδια υψηλού κινδύνου (σχήμα 2.1). Τα γονίδια BRCA ευθύνονται για το ήμισυ των κρουσμάτων αυτής της ομάδας, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια του πίνακα 2.3 για ένα άλλο 10%. Επομένως, ένα 40% των οικογενών περιπτώσεων οφείλονται σε άγνωστα μέχρι σήμερα γονίδια. Θεωρείται ότι τα γονίδια αυτά δεν θα έχουν τη σημασία των BRCA, αλλά ότι θα πρόκειται για πολλά γονίδια «χαμηλής επιβάρυνσης», καθένα εκ των οποίων αυξάνει σε μέτριο βαθμό τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Όταν όμως σε ορισμένες οικογένειες συσσωρεύονται μεταλλάξεις σε αρκετά από αυτά τα γονίδια, αυξάνεται κατά πολύ ο κίνδυνος κακοήθειας. Προφανώς ταχύτερη συσσώρευση τέτοιων μεταλλάξεων στη διάρκεια ζωής ενός ατόμου θα ευθύνεται για την ανάπτυξη καρκίνου στις περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται ως σποραδικά κρούσματα. Θεωρείται δηλαδή ότι υπάρχει μία πολύγονιδιακή διαδικασία βαθμιαίας ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού.



Σχήμα 2.1: Συνεισφορά των μεταλλάξεων των γονιδίων υψηλού κινδύνου στον καρκίνο του μαστού.

Υποδοχείς οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της ανάπτυξης στον υγιή μαστό, μαζί με μία σειρά άλλων ορμονών που δρουν μέσω πυρηνικών ή μεμβρανικών υποδοχέων. Επίσης, συνεργάζονται με αυξητικούς παράγοντες της οικογένειας EGF, που ενεργοποιούν κινάσες του υποδοχέα της τυροσίνης της οικογένειας ERBB, προκειμένου να ρυθμίσουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών ιστών.



2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο βιολογικός καρκινικός δείκτης είναι ένα χαρακτηριστικό (π.χ. DNA, mRNA, πρωτεΐνες) που μπορεί να μετρηθεί και να αξιολογηθεί αντικειμενικά, ως ένδειξη φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθολογικών διαδικασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μία θεραπευτική αγωγή. Αυτό το χαρακτηριστικό/βιοδείκτης παράγεται είτε από τον όγκο είτε από το σώμα ως απόκριση στον καρκίνο. Η μέτρησή του μπορεί να γίνει με γενετικές ή πρωτεωμικές μεθόδους, ή με κυτταρικές ή μοριακές ουσίες που βρίσκονται σε υψηλότερα από το κανονικό επίπεδα στα υγρά ή τους ιστούς του σώματος του ασθενούς με καρκίνο. Ο βιοδείκτης είναι μετρήσιμος και αξιόπιστος δείκτης ανίχνευσης της κακοήθειας, αξιολόγησης του καρκινικού κινδύνου, αξιολόγησης της εξέλιξης της νόσου, πρόγνωσης, ελέγχου της απόκρισης στη θεραπεία και είναι πολύ σημαντικός για τη βελτίωση της αντιμετώπισης των ασθενών και της εξέλιξης της νόσου (Atkinson *et al.*, 2001).

Αρκετοί τύποι μορίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί δείκτες, όπως:

- **Ένζυμα:** Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο (Prostate Specific Antigen, PSA), Όξινη Προστατική Φωσφατάση (Prostatic Acid Phosphatase, PAP), ισοένζυμα της αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, ALP) και ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactic Dehydrogenase, LDH).
- **Ορμόνες:** Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη (Human Chorionic Gonadotropin, hCG).
- **Αντιγόνα καρκινικών κυττάρων:** Καρκινικά Αντιγόνα (Cancer Antigens), όπως CA125, CA 19-9, CA15-3.
- **Αντιγόνα που αντιστοιχούν στο εμβρυϊκό στάδιο της εξέλιξης:** Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόνο (Carcinoembryonic Antigen, CEA), α - Εμβρυϊκή Πρωτεΐνη (Alpha - Fetoprotein, AFP).
- **Υποδοχείς ορμονών:** Υποδοχείς Οιστραδιόλης (Estrogen Receptors, ER) και Προγεστερόνης (Progesterone Receptors, PR) στο μαστό.
- **Ογκογονίδια:** HRAS, MYC, C-ERBB2, TP53.

Με βάση τη χρησιμότητά τους, οι βιοδείκτες μπορούν να διακριθούν σε διάφορες κατηγορίες:

- 1) Πρώιμης ανίχνευσης, όταν χρησιμοποιούνται για την εξέταση του πληθυσμού με στόχο την έγκαιρη ανίχνευση της κακοήθειας
- 2) Διαγνωστικοί, όταν χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή απουσίας καρκίνου
- 3) Πρόγνωσης, όταν μπορούν να δώσουν εκτίμηση της πιθανότητας επιβίωσης του ασθενούς ή να ανιχνεύσουν την επιθετικότητα του φαινοτύπου και να προβλέψουν τη συμπεριφορά του καρκίνου
- 4) Πρόβλεψης, όταν μπορούν να προδιαγράψουν ή να παρακολουθούν την αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής ή άλλων αγωγών



5) Στόχευσης, όταν χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των μοριακών στόχων των νέων θεραπειών και των μοριακών δεικτών των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από τη θεραπεία

Για να μπορέσει ένας καρκινικός δείκτης να ανταποκριθεί στις παραπάνω εφαρμογές θα πρέπει να μπορεί να συνδυάζει μια σειρά κριτηρίων. Έτσι, ένας ιδεατός καρκινικός δείκτης θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από:

1. Υψηλή αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία, ώστε αφενός να ανιχνεύονται μικρές ποσότητες της συγκεκριμένης ουσίας που αντιστοιχεί στα αρχικά στάδια της νόσου και αφετέρου να ανιχνεύονται όλοι οι ασθενείς αυτών των σταδίων.
2. Υψηλή αναλυτική και διαγνωστική ειδικότητα, ώστε να αποκλείει τους υγιείς.
3. Υψηλή διαγνωστική ή προγνωστική αξία του θετικού αποτελέσματος.
4. Υψηλή αποτελεσματικότητα.
5. Αντιστοιχία των μεταβολών του στα βιολογικά υγρά με το μέγεθος όγκου, το βαθμό κακοήθειας, την πορεία της νόσου και την παρουσία μεταστάσεων.
6. Ικανότητα διαφορικής διάγνωσης και ιδιαίτερα με τις καλοήθειες υπερπλασίες.
7. Σταθερότητα των επιπέδων του στα βιολογικά υγρά.
8. Φθινό και εύκολο προσδιορισμό στα βιολογικά υγρά και στους ιστούς

Η ερευνητική, ιατρική και φαρμακευτική κοινότητα έχει αναγνωρίσει την αξία των βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες μπορούν να μειώσουν το χρόνο και το κόστος της διάγνωσης της κακοήθειας, αλλά και να βελτιώσουν τα αποτελέσματα της θεραπείας τους (Manne *et al*, 2005).

Μοριακή ανίχνευση, παρακολούθηση και θεραπεία

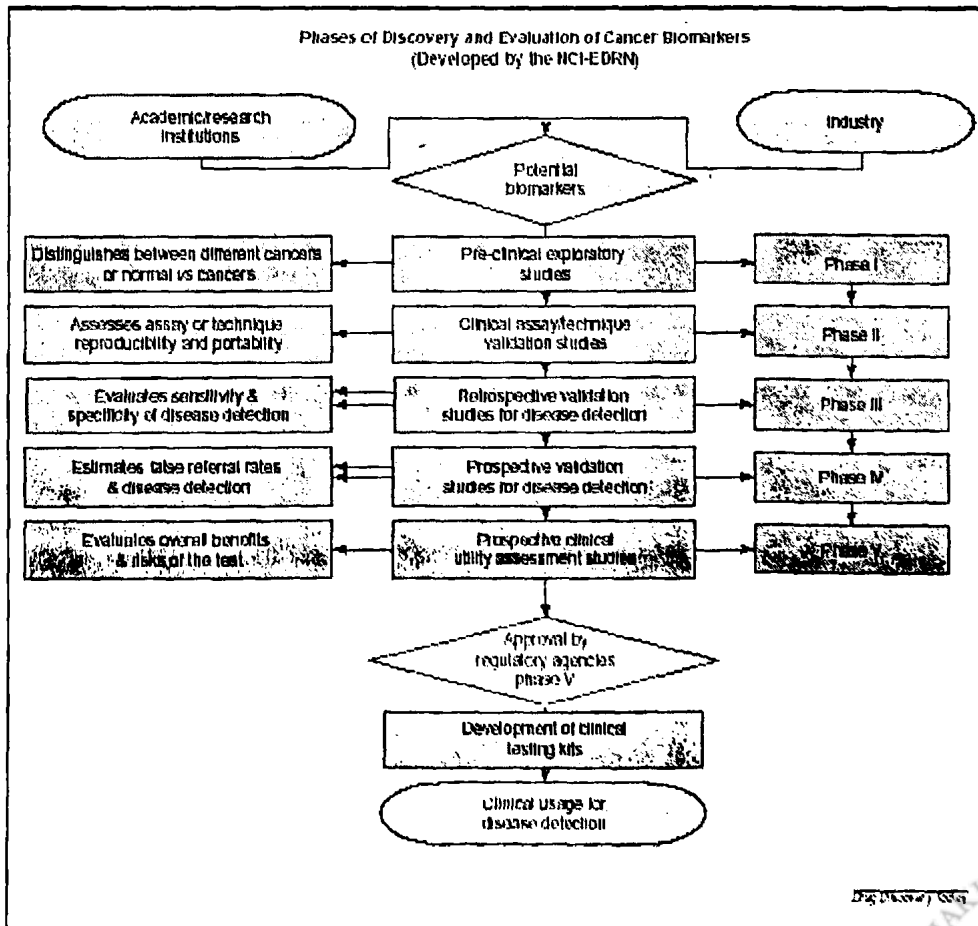
Η ανάπτυξη βιοδεικτών για ανίχνευση, διάγνωση, και θεραπεία του καρκίνου εμπεριέχει βιολογικές αλλά και οικονομικές προκλήσεις. Οι περισσότερες μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται σήμερα αναγνωρίζουν τον πλήρως ανεπτυγμένο καρκίνο και όχι τα προ-κακοήθη ή πρώιμα στάδια αυτού, των οποίων η αφαίρεση και θεραπεία είναι ευκολότερη. Ακόμη και αν ένα τεστ πρώιμης ανίχνευσης μπορεί να αναγνωρίζει τον όγκο σε προ-κλινικό επίπεδο, δε μπορεί να κάνει το ίδιο με τις μικρο-μεταστάσεις και, έτσι, περιορίζεται η ωφέλεια από την πρώιμη ανίχνευση (Pollak and Foulkes, 2003). Ένα άλλο πρόβλημα είναι ότι σε πολλά όργανα, όπως στον προστάτη ή το έντερο, οι προ-νεοπλασματικές αλλοιώσεις είναι πολύ συχνότερες από τους επιθετικούς καρκίνους και μόνο 10% ή λιγότερο των πρώτων καταλήγουν σε κακοήθεις όγκους (Neugei, *et al*, 1997). Έτσι, η μελέτη για ανακάλυψη καρκινικών βιοδεικτών πρέπει να εστιάζεται σε παράγοντες που μπορούν όχι μόνο να ανιχνεύουν τις πρώιμες αλλοιώσεις, αλλά και να ανιχνεύουν τη συμπεριφορά του όγκου, επιτρέποντας την ανίχνευση της υπο-ομάδας που είναι περισσότερο πιθανό να οδηγήσει σε κλινικά σημαντικό καρκίνο.



Ο καρκίνος είναι ετερογενής νόσος, δηλαδή αποτελείται από πολλούς, βιολογικά διαφορετικούς, φαινοτύπους που παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση στις διαγνωστικές και θεραπευτικές παρεμβάσεις. Κάθε μακροσκοπικά συμπαγής όγκος μπορεί να περιέχει αρκετούς τύπους κλωνικών πληθυσμών, καθένας εκ των οποίων χαρακτηρίζεται από διαφορετικές ομάδες μεταλλάξεων και φαινοτυπικών αλλαγών. Η ετερογένεια αυτή προφανώς περιπλέκει την ανάπτυξη βιοδεικτών και πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν.

Βιολογικοί δείκτες στην ανίχνευση, διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου

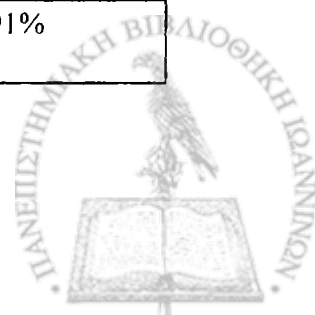
Μερικοί από τους πιο αποτελεσματικούς δείκτες παρουσιάζονται στον πίνακα 2.4. Ο κάθε δείκτης πρέπει να αξιολογείται για συγκεκριμένη χρήση: ανίχνευση, διάγνωση ή πρόγνωση για ασθενείς με καρκίνο. Ωστόσο, κανένας βιολογικός δείκτης σήμερα δε μπορεί να παρουσιάζει 100% επιτυχείς θετικές και αρνητικές προβλέψεις για ένα συγκεκριμένο τύπο νεοπλασίας. Αντίθετα, ομάδες τέτοιων δεικτών φαίνεται να αποτελούν πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις για χρήση σε κλινικά εργαστήρια. Για παράδειγμα, αρκετές μελέτες έχουν γίνει για την αξιοποίηση των πρωτεϊνικών προτύπων με την τεχνική φασματομετρίας μάζας SELDI-TOF του ορού ασθενών με καρκίνο ωοθηκών (Pettricoïn *et al*, 2002), μαστού (Vlahou *et al*, 2003), προστάτη (Adam *et al*, 2002) και πνεύμονα (Xiao *et al*, 2003)



Σχήμα 2.2: Φάσεις ανάπτυξης και αξιολόγησης ενός βιολογικού δείκτη. Η έγκριση από τις ρυθμιστικές αρχές εξαρτάται από τους εθνικούς κανονισμούς κάθε χώρας και μπορεί να δοθεί μετά την ολοκλήρωση της φάσης III για περιορισμένη χρήση.

Δείκτης	Καρκινικός Τύπος	Παρατηρήσεις
CA 125 (MUC 16)	Ωοθηκών (ορός)	Ευαισθησία ανά στάδιο: I: 27-66% II: 65-100% III: 87-90% IV: 94% Ευαισθησία ανά ιστολογικό τύπο: Ορρώδης: 68-94,1% Βλεννώδης: 52-68% Ενδομητριώδης: 92% Clear cell: 61%
Καλλικρεΐνη 6 (Πρωτεάση Μ)	Ωοθηκών (ορός)	Ευαισθησία ανά στάδιο: I: 16% II: 27% III: 75% IV: 63% Ευαισθησία ανά ιστολογικό τύπο: Ορρώδης: 68% Ενδομητριώδης: 33% Βλεννώδης: 9% Σε συνδυασμό με CA 125: ευαισθησία=69% ειδικότητα=95%
Οστεοπιντίνη	Ωοθηκών (ορός)	Ευαισθησία ανά στάδιο: I/II: 80% III/IV: 85% Μέσο επίπεδο (ng/ml) και 95%CI: Υγιείς: 147 (8-641) Καλοήθεις: 254,4 (3-641) Καρκινικοί: 487 (315-751)
Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο (PSA, καλλικρεΐνη 3)	Προστάτη (ορός)	Ευαισθησία ~70% Ειδικότητα 59-97%
Alpha methyl CoA-racemase	Προστάτη (ιστός)	Ευαισθησία ~97% Ειδικότητα ~100%
Μεθυλίωση των υποκινητών γονιδίων	Προστάτη, εντέρου, πνεύμονα, γαστρικού	Ποικίλη ευαισθησία & ειδικότητα
Πρωτεϊνικό προφίλ	Προστάτη, εντέρου, πνεύμονα (ορός)	Ευαισθησία 90-98% Ειδικότητα 95-99%
APC	Εντέρου	Συσχέτιση μεταλλάξεων με καρκίνο
Μεταλλάξεις RCA1 και BRCA2	Μαστού (ιστός)	Δείκτης κινδύνου & προγνώσεως
Τρανσφεράση-1 της γλουταθιόνης S (GSTP-1)	Μαστού, προστάτη (ιστός)	Εκτίμηση κινδύνου, πρόγνωση Ανίχνευση μεθυλίωσης στον προστάτη με 75% ευαισθησία & 100% ειδικότητα
EGFR	Πνεύμονα	Πρόγνωση & θεραπεία
Απτοσφαιρίνη (Haptoglobin)	Πνεύμονα, εντέρου, μαστού (ορός)	Διάγνωση & απόκριση στη θεραπεία
CDKN ₂ A	Εντέρου	Ευαισθησία 16-54% Ειδικότητα 63-94%
Αλλοιώσεις μικροδορυφόρων	Ουροδόχου κύστης (δείγμα ούρων)	Ευαισθησία 83-90% Ειδικότητα 100%
Des-γ-καρβοξυλική προθρομβίνη (PCP)	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ορός)	Ευαισθησία 54-68% Ειδικότητα 87-98%
AFP	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ορός)	Ευαισθησία 39-64% Ειδικότητα 76-91%

Πίνακας 2.4: Οι σημαντικότεροι καρκινικοί δείκτες.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ

ΕΝΖΥΜΑ & ΚΑΡΚΙΝΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

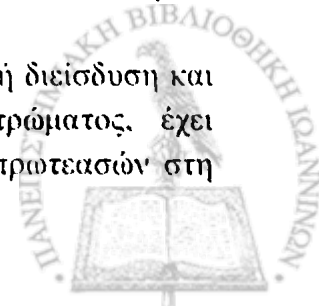
3.1 Πρωτεόλυση στη Διείσδυση και Μετάσταση των καρκινικών κυττάρων

Η πλειοψηφία των θανάτων από καρκίνο δεν προκαλούνται από την αύξηση του όγκου στην πρωτογενή του θέση. Η διήθηση των γειτονικών ιστών και η επακόλουθη μετάσταση ευθύνονται για περισσότερο από 90% των θανάτων (Hanahan and Weinberg, 2000). Οι πολύπλοκες και δυναμικές αυτές διαδικασίες εξαρτώνται από την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούν τον υγρή ιστό, ξεπερνώντας τους φυσιολογικούς φραγμούς, όπως η βασική μεμβράνη και το εξωκυττάριο στρώμα. Η πρωτεολυτική διάσπαση των συστατικών αυτών των φραγμών αποτελεί τον κύριο μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα επιτυγχάνουν αυτή τη διαδικασία, και φαίνεται ότι αποτελεί κοινό μονοπάτι σε όλες τις διεισδυτικές νεοπλασίες.

Μία από τις θεμελιώδεις ιδιότητες των λειτουργικά διαφοροποιημένων ιστών είναι η μοναδική τους τρισδιάστατη οργάνωση, που επιτρέπει στα κύτταρα να λειτουργούν με συντονισμένο τρόπο ώστε να επιτελούνται πολύπλοκες λειτουργίες. Η διαμόρφωση αυτής της τρισδιάστατης οργάνωσης των ιστών στους πολυκύτταρους οργανισμούς επιτυγχάνεται χάρη στην ανάπτυξη ενός πολύπλοκου δικτύου εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, το εξωκυττάριο στρώμα. Το δίκτυο αυτό δεν επιτελεί μόνο δομικό-υποστηρικτικό ρόλο στα κύτταρα, αλλά συμμετέχει στη ρύθμιση της οργάνωσης, μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, μορφογένεσης αλλά και απόπτωσης (Boudreau and Bissel, 1996). Από την άλλη, οι αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και γονιδιακή έκφραση επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των κυττάρων με το εξωκυττάριο στρώμα, με αποτέλεσμα την επίτευξη μιας «δυναμικής διαδραστικότητας». Στη διαδικασία της ογκογένεσης, χάνεται η αλληλεπίδραση αυτή, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μη μπορούν πλέον να επιτύχουν και να διατηρήσουν μία λειτουργική διαφοροποιημένη κατάσταση.

Το εξωκυττάριο στρώμα σχηματίζεται από μεγάλα μόρια γλυκοπρωτεϊνών. Οι κυριότερες από αυτές είναι η λαμινίνη, το κολλαγόνο, η ινωδονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη, η τενασκίνη κ.α. Μία άλλη τάξη συνιστούν οι πρωτεογλυκάνες, που σχηματίζονται από σφαιρικές πρωτεΐνες που προσδένονται στην κυτταρική μεμβράνη και περιέχουν εξειδικευμένες αλυσίδες υδρογονανθράκων, τις γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) (Barnfield *et al.*, 1999). Οι πρωτεΐνες αυτές συνθέτονται από μεγάλη ποικιλία υπομονάδων, που συνδυάζονται μεταξύ τους με ιστο-ειδικό τρόπο και μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να δρουν ως δεξαμενή μιτογόνων ή μορφογόνων μορίων (Vu *et al.*, 1998). Η πολυπλοκότητα μορίων και αλληλεπιδράσεων δημιουργεί μεγάλη ποικιλία στη σύνθεση του εξωκυτταρίου στρώματος. Ανάλογα με τη σύστασή του, το εξωκυττάριο στρώμα άλλοτε προκαλεί αναστολή της αύξησης, διαφοροποίηση και ιστο-ειδική έκφραση γονιδίων και άλλοτε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κινητικότητα.

Η συνεισφορά της εξωκυτταρίας πρωτεόλυσης στην καρκινική διείσδυση και μετάσταση, δια μέσου της αποδόμησης του εξωκυτταρίου στρώματος, έχει αναγνωρισθεί από πολύ νωρίς. Όμως, ο ρόλος των εξωκυτταρίων πρωτεασών στη

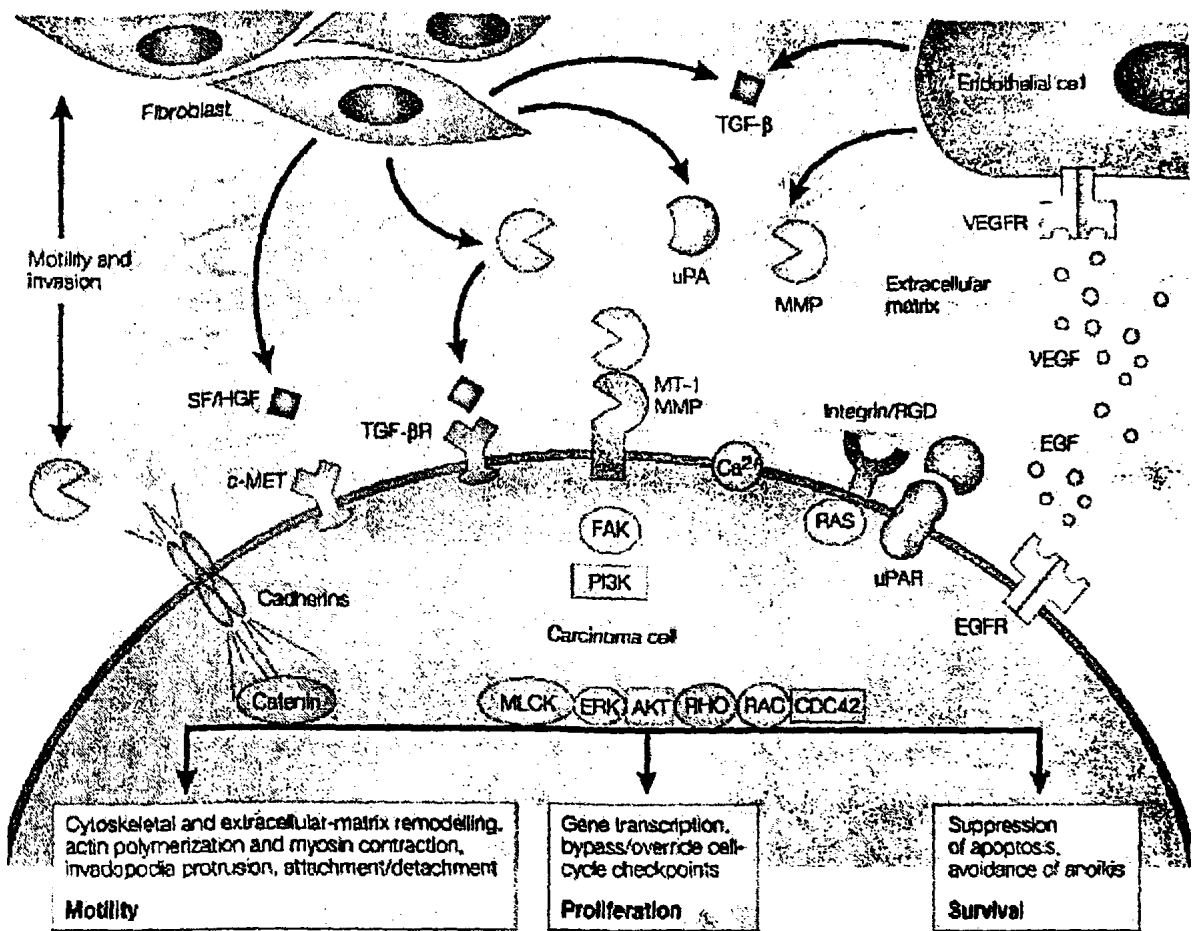


διαδικασία αυτή έχει εξελιχθεί και επεκταθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, καθώς έχει γίνει αντιληπτό ότι τα εξωκυττάρια στρώματα δεν αποτελούν απλώς εμπόδια για την καρκινική μετάσταση. Είναι πλέον προφανές ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένου του εξωκυττάριου στρώματος και των κυττάρων του συνδετικού ιστού, δρά ως κρίσιμος ρυθμιστής της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων (Liotta *et al*, 2001). Το εξωκυττάριο στρώμα αποτελεί δεξαμενή αυξητικών παραγόντων και ρυθμιστικών μορίων. Έτσι, οι πρωτεάσες του εξωκυττάριου μέσου, μέσω της μη αναστρέψιμης πέψης των συστατικών του, ρυθμίζουν και τροποποιούν άμεσα το μικροπεριβάλλον του όγκου και επηρεάζουν έμμεσα την ανάπτυξη ή απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, την αγγειογένεση, τη διείσδυση και τη μετάσταση. Η πέψη αυτή πιθανόν αναδεικνύει μυστικές θέσεις δέσμευσης στο εσωτερικό των μορίων του εξωκυττάριου στρώματος και με αυτόν τον τρόπο τροποποιεί τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ τους ή με το εξωκυττάριο στρώμα, παράγει βιολογικά δραστικά μόρια και επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα και ενεργότητα των προσδεδεμένων αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους. Επομένως, η πρωτεόλυση στον εξωκυττάριο χώρο που επάγεται από τον καρκίνο είναι πολύ πιο πολύπλοκη από ότι αρχικά αναμενόταν και τελικά καταλήγει σε ογκο-επαγωγικές ή ογκο-κατασταλτικές επιδράσεις (Σχήμα 3.1)

Με βάση τους καταλυτικούς μηχανισμούς των πρωτεασών, αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κύριες τάξεις : πρωτεάσες που έχουν ένα ενεργοποιημένο κατάλοιπο κυστεΐνης (πρωτεάσες κυστεΐνης), ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος (πρωτεάσες ασπαραγινικού), ένα μεταλλικό ιόν (μεταλλοπρωτεάσες), ένα κατάλοιπο θρεονίνης (πρωτεάσες θρεονίνης) και πρωτεάσες με μια ενεργή σερίνη (πρωτεάσες σερίνης). Σύμφωνα με την πιο κατανοητή και ευρέως χρησιμοποιούμενη βάση δεδομένων για πρωτεάσες, τα ένζυμα κάθε καταλυτικού τύπου είναι ταξινομημένα σε εξελικτικά διακριτές “φυλές” και κάθε φυλή υποδιαιρείται σε “οικογένειες”. με βάση την ομολογία αλληλουχίας και τη σειρά της καταλυτικής τριάδας. (Rawlings *et al.*, 1993).

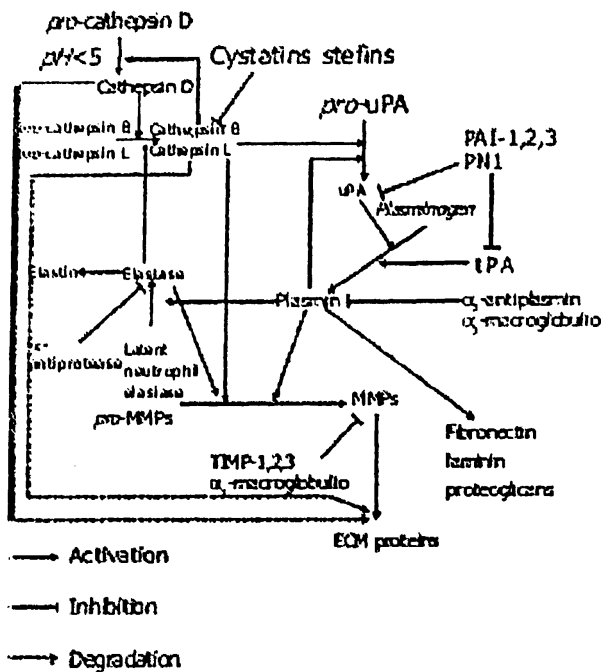
Η πρωτεολυτική τροποποίηση του εξωκυττάριου στρώματος θεωρείται απαραίτητη διαδικασία της διείσδυσης (Liotta *et al*, 1980), τόσο στο φυσιολογικό ιστό, όσο και στην κακοήθεια. Τα κύρια ένζυμα που αποικοδομούν το στρώμα είναι: 1) οι μεταλλοπρωτεάσες στρώματος (MMPs), μία οικογένεια εκκρινόμενων και συνδεδεμένων με τη μεμβράνη ενζύμων, 2) οι πρωτεάσες κυστεΐνης, που περιλαμβάνουν τις καθεψίνες και την παπαΐνη, 3) οι μεταλλοπρωτεάσες του τύπου της μορφογενετικής πρωτεΐνης I των οστών και 4) οι πρωτεάσες σερίνης, που περιλαμβάνουν τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (uPA), την ουροκινάση, τη θρομβίνη και την πλασμίνη (Werb, 1997). Τα κύρια συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος που αποτελούν υπόστρωμα των πρωτεολυτικών ενζύμων είναι οι περισσότεροι τύποι κολλαγόνου, οι πρωτεογλυκάνες, η λαμινίνη, η ινωδονεκτίνη και η βιτρονεκτίνη. Όλες οι τάξεις πρωτεολυτικών ενζύμων συμμετέχουν ή/και ενεργοποιούν η μία την άλλη κατά τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων (Σχήμα 3.2). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι ακόμη και ενδοκυτταρικές πρωτεάσες συμμετέχουν στη διαδικασία (Koblinski *et al*, 2000).





Σχήμα 3.1: Μικροοικολογία στο μέτωπο διήθησης. Παρουσιάζονται παραδείγματα διαμεσολαβητών. Η κινητικότητα και η διήθηση είναι αμφίδρομες διαδικασίες. Οι ινοβλάστες παράγουν χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως τον SF/HGF (Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor) που διεγείρει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων κατόπιν πρόσδεσης στον υποδοχέα cMET. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως VEGF και bFGF, οι οποίοι προσδένονται σε υποδοχείς αγγειακών κυττάρων του στρώματος και προκαλούν αύξηση της διαπερατότητας, του ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και διήθησης. Οι ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα του στρώματος απελευθερώνουν λανθάνοντα ένζυμα, όπως τις μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου της ουροκινάσης (uPA) τα οποία αγκυροδένονται στη διηθητική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, όπου ενεργοποιούνται και αποικοδομούν το εξωκυττάριο στρώμα. Η διαδικασία αυτή προκαλεί την απελευθέρωση δεσμευμένων αυξητικών παραγόντων, όπως TGF-β και EGF, οι οποίοι προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς τους στα καρκινικά κύτταρα. Η διάσπωση των πρωτεϊνών του εξωκυττάριου στρώματος αποκαλύπτει επίσης αλληλουχίες RGD (αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ), οι οποίες αναγνωρίζονται από τις ιντεγκρίνες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μονοπατιών σηματοδότησης εντός των καρκινικών κυττάρων συνδέουν την κινητικότητα, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των τελευταίων.





Σχήμα 3.2 Ρύθμιση της πρωτεόλυσης του εξωκυττάριου στρώματος.

3.2 Λυσοσωμικές Πρωτεάσες –Πρωτεάσες Κυστεΐνης

Η ενεργοποίηση καταρράκτη πρωτεασών που συμμετέχουν στην αποδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος συνήθως επάγεται από όξινες πρωτεΐνες που ονομάζονται καθεψίνες και συγκεντρώνονται κυρίως στα λυσοσωμάτια. Στα φυσιολογικά κύτταρα, μόνο ένα μικρό ποσοστό (5-10%) των καθεψινών βρίσκεται στο κυτοσόλιο (Gabrijelcic *et al*, 1992). Η καρκινική ανάπτυξη, όμως, συνδέεται με διαφοροποιήσεις στη μετα-μεταφραστική γλυκοζυλίωση και φωσφορλίωση των προενζύμων στο δίκτυο Golgi που εμποδίζουν την μεταφορά τους στα λυσοσωμάτια. Κατά συνέπεια, το μεγαλύτερο μέρος των καθεψινών στα καρκινικά κύτταρα εντοπίζεται στο κυτταροδιάλυμα. Η βιολογική λειτουργία των ενζύμων αυτών είναι διπλή, αφού διασπούν τόσο κυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές πρωτεΐνες. Μέσα στο κύτταρο, ενεργοποιούν προ-ένζυμα και προ-ορμόνες. Στο εξωκυττάριο στρώμα, αποικοδομούν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δομή του τελευταίου. Η ασπαρτυλική πρωτεάση καθεψίνη D και πολλές πρωτεάσες κυστεΐνης συμμετέχουν στην καρκινική ανάπτυξη (Skrzydowska *et al*, 2005).

Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν αυξημένες ποσότητες καθεψίνης D. Η ανενεργός προ-καθεψίνη D μπορεί να αυτοενεργοποιηθεί σε όξινο περιβάλλον ή να ενεργοποιηθεί από την πρωτεολυτική δράση άλλων ενζύμων (Larsen *et al*, 1993). Η ενεργοποίησή της μπορεί να συμβεί εντός ή εκτός κυττάρου. Δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην σύσταση και την αμινοξική αλληλουχία της καθεψίνης D μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων. Υπάρχουν όμως διαφορές στη δομή του ενζύμου, εξαιτίας της μετα-μεταφραστικής ωρίμανσης (Garcia *et al*, 1996). Η καθεψίνη D έχει πολλές δράσεις εντός και εκτός κυττάρου. Μπορεί να ενεργοποιεί τις προ-καθεψίνες B και L, αλλά και να απενεργοποιεί τις δραστικές μορφές τους (van der Starpen *et al*, 1996). Επίσης, αδρανοποιεί τις συστατίνες, που είναι αναστολείς των πρωτεασών κυστεΐνης. Μπορεί να δράσει



άμεσα ή έμμεσα ως μιτογόνο παράγοντα στα καρκινικά κύτταρα, αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση, ανεξάρτητα από την καταλυτική της ενεργότητα (Bercham *et al*, 2002). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη διαδικασία της απόπτωσης που επάγεται από διάφορους παράγοντες, όπως INF- γ , Fas/APO, FNF- α και οξειδωτικό στρες (Deiss *et al*, 1996, Kagedal *et al*, 2001). Σημαντική αύξηση στην έκφραση της καθεψίνης D έχει παρατηρηθεί σε καρκίνο πολλών οργάνων, κυρίως του μαστού, της μήτρας, των ωοθηκών, του πνεύμονα και άλλων (Skrzydowska *et al*, 2005). Η αύξηση αυτή είναι ανιχνεύσιμη τόσο στον καρκινικό ιστό, όσο και στον ορό των ασθενών.

Το δεύτερο βήμα στον πρωτεολυτικό καταρράκτη περιλαμβάνει τη δράση διαφόρων λυσοσωμικών πρωτεασών κυστεΐνης, όπως των καθεψινών B, L, H, C, S, F, K, O, V, W και X στη βασική μεμβράνη και το ενδιάμεσο στρώμα (Turk *et al*, 2000). Στα φυσιολογικά κύτταρα, οι καθεψίνες υπόκεινται σε ρύθμιση σε κάθε στάδιο της βιοσύνθεσής τους, δηλαδή μεταγραφή, μετα-μεταγραφική ωρίμανση, μετάφραση, μετα-μεταφραστική ωρίμανση και κυκλοφορία, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της φυσιολογικής τους λειτουργίας στο μεταβολισμό. Στα καρκινικά κύτταρα, αντίθετα, απορύθμιση των καθεψινών σε κάποιο από αυτά τα στάδια οδηγεί σε αυξημένη έκφραση και διαφορετική ενδοκυτταρική κατανομή (Krepela, 2001). Περισσότερο από τις άλλες καθεψίνες έχει μελετηθεί ο ρόλος της καθεψίνης B στην καρκινική ανάπτυξη, διείσδυση και μετάσταση.

Σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων, ιδιαίτερα κυττάρων με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση και έκκριση της καθεψίνης B, σε συνδιασμό με συσχέτισή της με την κυτταρική επιφάνεια. Αύξηση της καθεψίνης αυτής έχει παρατηρηθεί επίσης σε αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους, όπως του μαστού, των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας, του εντέρου, του στομάχου, του πνεύμονα και του θυρεοειδή (Berquin *et al*, 1996, Yan *et al*, 1998). Παράλληλα, τα οργανίδια που περιέχουν την καθεψίνη B μετακινούνται από την περι-πυρηνική περιοχή προς την κυτταρική μεμβράνη (Hazen *et al*, 2000). Η αυξημένη έκκριση της καθεψίνης B που παρατηρείται στην περιοχή αυτή, που συμπίπτει χρονικά με την αποικοδόμηση της υποκείμενης βασικής μεμβράνης, αποτελούν σημαντικές ενδείξεις της σημασίας της στην τοπική πρωτεόλυση. Η καθεψίνη B, όπως και άλλες καθεψίνες, συντίθεται ως προένζυμο και ενεργοποιείται στα προ-λυσοσωμικά, όξινα κυστίδια, από ένζυμα όπως καθεψίνη D ή G, ελαστάση, uPA, tPA (wan der Stappen *et al*, 1996). Έτσι, βρίσκεται στην ενεργή της μορφή όταν εκκρίνεται, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και έκκριση του προ-ενζύμου (Skrzydowska *et al*, 2005).

Η συμμετοχή της καθεψίνης B στην αποικοδόμηση του εξωκυττάρου συνδετικού στρώματος γίνεται είτε άμεσα, με πρωτεολυτική αποικοδόμηση των συστατικών του, είτε έμμεσα, με την ενεργοποίηση άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων. Η καθεψίνη αυτή δρα στα σημεία επαφής των καρκινικών κυττάρων με τη βασική μεμβράνη ή το ενδιάμεσο στρώμα. Οι περιοχές αυτές έχουν συχνά όξινο pH, το οποίο ευνοεί την πρωτεολυτική δράση των ενζύμων. Έτσι, η καθεψίνη B μπορεί να προκαλέσει λύση πρωτεΐνων του στρώματος, όπως η λαμίνη, η φιβρονεκτίνη, η

ελαστική και διάφοροι τύποι κολλαγόνου (Buck *et al*, 1992). Η διάσπαση της φιβρονεκτίνης έχει οδηγήσει σε αποκάλυψη της αλληλουχίας CS-1, η οποία αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα ιντεγκρίνης $\alpha_4\beta_1$ (Ugarova *et al*, 1996). Με τον τρόπο αυτό, η καθεψίνη Β φαίνεται ότι συνδέεται επίσης με γεγονότα μεταγωγής κυτταρικών σημάτων. Η καθεψίνη Β ενισχύει και έμμεσα την πρωτεολυτική διαδικασία, αφού μπορεί να ενεργοποιήσει το προ-πλασμινογόνο του τύπου της ουροκινάσης. Επίσης, μπορεί να αλλάξει το ισοζύγιο των MMPs με τους αναστολείς τους, ενεργοποιώντας τις πρώτες (προκολλαγενάση/proMMP-3 και προστρομελυσίνη-1/pro-MMP-2) ή προκαλώντας λύση και απενεργοποίηση στους τελευταίους (TIMP-1 και TIMP-2) (Nagase, 1997, Kostoulas *et al*, 1999). Τέλος, κατά την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του εξωκυττάρου στρώματος, φαίνεται να απελευθερώνονται αυξητικοί παράγοντες (όπως bFGF, EGF, TGF- β , IGF-I, VEGF) οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη των καρκινικών ή φυσιολογικών κυττάρων που εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς.

Μία άλλη καθεψίνη, η L, έχει παρόμοιες πρωτεολυτικές ιδιότητες με την Β. Η έκφρασή της είναι αυξημένη στους περισσότερους καρκινικούς τύπους και σε καρκινικές σειρές υψηλής κακοήθειας (Kirschke, 1997). Το γονίδιο της ενεργοποιείται από πολλούς αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια. Η προκαθεψίνη L διαθέτει πρωτεολυτική ενεργότητα (διασπά την φιβρονεκτίνη και τη λαμινίνη), ενώ μπορεί να δράσει ως αυξητικός παράγοντας και παράγοντας διαφοροποίησης. Το ενεργό ένζυμο διασπά τα κολλαγόνα τύπου I και IV, την φιβρονεκτίνη και τη λαμινίνη (Ishidori *et al*, 1998).

Άλλες καθεψίνες, όπως η Η και η Κ, συμμετέχουν επίσης στην καρκινογένεση. Η καθεψίνη Η διαφέρει από άλλες ενδοσωμικές πρωτεάσες κυστεΐνης, εξαιτίας της μοναδικής ενεργότητας αμινοπεπτιδάσης που διαθέτει. Η έκφρασή της αυξάνει σε αρκετούς τύπους καρκίνου, ωστόσο δε συσχετίζεται ισχυρά με την κακοήθεια των όγκων και καρκινικών σειρών, ενώ μειώνεται σημαντικά στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Ο ρόλος της καθεψίνης Η δεν έχει ξεκαθαριστεί, αν και μπορεί να διασπά το φιβρινογόνο και τη φιβρονεκτίνη. Η καθεψίνη Κ έχει ισχυρή ενεργότητα διάσπασης κολλαγόνου και ελαστίνης και, ως εκ τούτου, μπορεί να έχει μεγάλη συμμετοχή στην αποικοδόμηση του εξωκυττάρου στρώματος (Skrzydowska *et al*, 2005, Lah and Kos, 1998).

Η ενεργότητα των πρωτεασών κυστεΐνης ελέγχεται από αναστολείς που βρίσκονται στους ιστούς, το πλάσμα του αίματος και άλλα σωματικά υγρά. Τέτοιοι αναστολείς είναι οι συστατίνες, οι στεφίνες, το κινινογόνο και η α_2 -μακροσφαιρίνη (Turk *et al*, 1997). Οι καθεψίνες Β και L αναστέλλονται από τις συστατίνες C, E/M, F και τις στεφίνες Α και Β. Η συστατίνη C αναστέλλει επίσης τις καθεψίνες Κ και Η (Schick *et al*, 1998). Η κατανομή των παραπάνω αναστολέων στο σώμα δεν είναι ίδια. Έχει βρεθεί ότι οι συστατίνες μπορούν να εμποδίσουν τη διείσδυση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Boike *et al*, 1992). Όμως, η ενεργότητα και η συγκέντρωσή τους μεταβάλλονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Μείωση της συγκέντρωσης των συστατινών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών και την ενίσχυση της



παθολογικής διαδικασίας. Φαινόμενα αναστολής καθεψινών έχουν παρατηρηθεί επίσης από την κυστεΐνη (σε περιοχές του όγκου με ήπιο όξινο pH) και από ουδέτερο ή ελαφρώς βασικό περιβάλλον (οπότε προκαλείται μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση).

3.3 Μεταλλοπρωτεάσες

Οι μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) είναι οικογένεια εκκρινόμενων ή μεμβρανικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διάσπαση των συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος και της βασικής μεμβράνης. Ανάλογα με τη δομή και την ειδικότητά τους, ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες. Οι κολλαγενάσες, που διασπούν το ινώδες κολλαγόνο, οι ζελατινάσες που διασπούν το μη ινώδες και αποδιαταγμένο κολλαγόνο, οι στρομελυσίνες που προτιμούν τις πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες ως υπόστρωμα, οι MMPs της μεμβράνης (MT-MMPs) και άλλες. Όλες έχουν το μοτίβο HEXGH στην καταλυτική περιοχή τους, που είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση ψευδαργύρου. Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την καταλυτική δράση των MMPs. Χαρακτηρίζονται επίσης από την αλληλουχία PRCGVPD στην περιοχή ενεργοποίησης, όπου γίνεται η διάσπαση του λανθάνοντος μορίου, παράγοντας το ενεργό ένζυμο. Οι MMPs διαφέρουν μεταξύ τους δομικά από την παρουσία ή απουσία άλλων αλληλουχιών, τα οποία συνεισφέρουν σε λειτουργίες, όπως η ειδικότητα υποστρώματος, η δέσμευση των αναστολέων, η δέσμευση του υποστρώματος και η πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη (Kanayama, 2001).

Οι MMPs παράγονται γενικά σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Όμως, όταν οι φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες επιβάλλουν αναδιάταξη του εξωκυττάριου στρώματος, προκαλείται αύξηση της παραγωγής τους. Η ρύθμιση της έκφρασης και της ενεργότητας των MMPs γίνεται σε διάφορα επίπεδα. Ένα ρυθμιστικό στοιχείο AP-1 στην περιοχή του εγγύς υποκινητή παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταγραφικό έλεγχο των γονιδίων της οικογένειας. Η μεταγραφή των γονιδίων επάγεται από διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα, όπως κυτοκίνες (IL-4 και IL-10), αυξητικοί παράγοντες (TGF- α , bFGF, TGF- β) και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριου στρώματος (Fini *et al*, 1998, Skrzydlewska *et al*, 2005). Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν μια αλυσίδα ενδοκυτταρικών αντιδράσεων, στις οποίες συμμετέχουν τουλάχιστον τρεις διαφορετικές τάξεις κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs): ERK, SAPK/JNK και p38 (Reddy *et al*, 1999, Westermarck *et al*, 1999). Τελικά, ενεργοποιείται ένας AP-1 μεταγραφικός παράγοντας, που προσδένεται στο AP-1 στοιχείο και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του αντίστοιχου γονιδίου. Η έκφραση των MMPs αυξάνει σε διάφορους τύπους καρκίνου (πνεύμονα, εντέρου, μαστού, παγκρέατος κ.α.). Η παραγωγή τους στην περίπτωση αυτή δεν περιορίζεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα, αλλά γίνεται και από ινοβλάστες του στρώματος και φλεγμονώδη κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά πιθανώς παράγουν κυτοκίνες και πρωτεΐνες που προκαλούν την παραγωγή των MMPs σε γειτονικά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα εξωκυτταρικό δίκτυο έκκρισης και ενεργοποίησης των MMPs. Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφρασή τους είναι αυξημένη και στους μεταστατικούς όγκους, υποδεικνύοντας ότι παίζουν κάποιο ρόλο στη

μεταστατική διαδικασία (Sutinen *et al*, 1998), ενώ έχουν συσχετιστεί και με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο.

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η ενεργότητα των MMPs ρυθμίζεται αυστηρά από τη δράση ενεργοποιητών ή προενζύμων και αναστολέων. Γενικά, εκκρίνονται ως μη ενεργά προένζυμα, τα περισσότερα εκ των οποίων ενεργοποιούνται στον εξωκυττάριο χώρο. Μπορεί όμως η ενεργοποίηση να πραγματοποιηθεί και ενδοκυτταρικά. Η διαδικασία ενεργοποίησης λειτουργεί ως στοιχείο ρύθμισης των MMPs και περιλαμβάνει διάφορα στάδια, είναι δε γνωστή ως «διακόπτης κυστεΐνης». Ένα συντηρημένο, μη δεσμευμένο κατάλοιπο κυστεΐνης στην περιοχή ενεργοποίησης σχηματίζει ετεροπολικό δεσμό με το ιόν ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο. Διάσπαση της περιοχής ενεργοποίησης προκαλεί διάσπαση αυτού του δεσμού, απελευθερώνοντας το ενεργό κέντρο (Bergar *et al*, 2003). Για τις περισσότερες MMPs, η ενεργοποίηση γίνεται από πρωτεάσες σερίνης, όπως πλασμίνη και uPA, από την ουδετερόφιλη ελαστάση ή από άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας, όπως MMP-2, MMP-13 και MT-MMP (Sharipo, 1998). Ενεργοποίηση των MMPs μπορεί επίσης να επαχθεί από μη πρωτεολυτικά στοιχεία, όπως η γλουταθειώνη, ενώ χρήζει περισσότερης μελέτης ο ρόλος άλλων παραγόντων, όπως άλλων MMPs, κυτοκινών, πρωτεασών σερίνης, δραστικών ριζών οξυγόνου, της θρυψίνης, της ελαστάσης των λευκοκυττάρων και της υποξίας (Skrzydewska *et al*, 2005). Οι MT-MMPs, η MMP-11 και η MMP-23 ενεργοποιούνται στο σύμπλεγμα Golgi από μία ομάδα Ca^{++} -εξαρτώμενων διαμεμβρανικών πρωτεασών σερίνης (furin/PACE/kex-2).

Οι MT-MMPs έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται σε εξειδικευμένες περιοχές των καρκινικών κυττάρων, όπου παρατηρείται έντονη δράση αποικοδόμησης του εξωκυτταρίου στρώματος (Deryugina *et al*, 2001). Οι μη μεμβρανικές MMPs σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω ιντεγκρινών ή άλλων υποδοχέων, ή προσδένονται στα συστατικά του εξωκυτταρίου στρώματος, όπως οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης ή κάποιοι τύποι κολλαγόνου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται απόθεμα λανθάνοντος ενζύμου και εστιάζεται η πρωτεολυτική δράση (Yu and Stamenkovits, 2000, Yu and and Woessner, 2000)

Οι ενεργές MMPs αναστέλλονται από διάφορους μη ειδικούς αναστολείς πρωτεασών (όπως η α_2 -μακροσφαιρίνη και η α_1 -αντιπρωτεάση) και μία οικογένεια ειδικών ιστικών αναστολέων, τους TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας νέος μεμβρανικός αναστολέας, ο RECK (Oh *et al*, 2001). Σήμερα έχουν βρεθεί 4 TIMPs, με αρκετές δομικές ομοιότητες μεταξύ τους, όπως η αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης των MMPs και 12 κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς εντός της συντηρημένης περιοχής. Οι αναστολείς αυτοί προσδένονται σε προ-MMPs ή ενεργά ένζυμα, με ομοιοπολικούς δεσμούς, εμποδίζοντας τη δράση τους (Kahari *et al*, 1999, Koong *et al*, 2000). Η ισορροπία μεταξύ TIMPs και ενεργών MMPs είναι κρίσιμη για τη δράση των τελευταίων και την αποικοδόμηση του εξωκυτταρίου στρώματος. Έτσι, είναι λογικό ότι η έκφραση των TIMPs συσχετισθεί με λιγότερο επιθετικούς όγκους και καλύτερη πρόγνωση για τους ασθενείς. Ωστόσο, ο ρόλος αυτών των αναστολέων φαίνεται ότι



είναι πιο πολύπλοκος και δεν περιορίζεται στην αναστολή της αποικοδόμησης του εξωκυττάριου στρώματος (Hayakawa *et al*, 1992). Έτσι, το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την έκφραση των MMPs ενώ παράλληλα μειώνουν αυτήν των TIMPS είναι μάλλον απλουστευτικό.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει εκτεταμένη έρευνα και βιβλιογραφία που υποστηρίζει την πιθανή αξία της αναστολής των MMPs ως στόχο για την καρκινική θεραπεία, οι κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με διάφορους αναστολείς τους (MMPi) δεν είχαν τα αναμενόμενα θεαματικά αποτελέσματα (Coussens *et al*, 2002). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μεθοδολογικούς ή τεχνικούς παράγοντες, και όχι απαραίτητα στην απουσία θεραπευτικής αξίας των MMPi. Για παράδειγμα, οι κλινικές μελέτες πραγματοποιούνται σε ασθενείς τελευταίου σταδίου, όπου έχουν ήδη εμφανιστεί μεταστάσεις, οπότε είναι πολύ αργά για την προστατευτική δράση της αναστολής της πρωτεόλυσης. Πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι η θεραπεία με MMPi είναι πολύ αποτελεσματικότερη σε πρώιμα στάδια καρκίνου (Bergers *et al*, 1999). Παράλληλα, δεν έχουν αναπτυχθεί αξιόπιστες τεχνικές και παράμετροι αξιολόγησης της δραστηριότητας των MMPi *in vivo*. Έτσι, δεν μπορεί να βρεθεί η επαρκής δόση ώστε να στοχευθεί η τοπική πρωτεολυτική δραστηριότητα *in situ*. Ορολογικοί παράγοντες, όπως η δραστηριότητα ζελατινάσης στον ορό έχουν αποδειχθεί αναξιόπιστοι. Συνεπώς, πρέπει να αναπτυχθούν λειτουργικές μέθοδοι ελέγχου της ενέργειας του φαρμάκου με τη μέτρηση της τοπικής πρωτεολυτικής δραστηριότητας και να επανασχεδιασθεί ο τρόπος διεξαγωγής των κλινικών ερευνών, πριν απορριφθεί η σημασία των αναστολέων των MMPs ως στόχων της καρκινικής θεραπείας (Ludwig, 2005)

3.4 Ειδικές πρωτεάσες των ουδετερόφιλων κυττάρων

Εκτός από τα παραπάνω πρωτεολυτικά συστήματα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας κατά την καρκινική ανάπτυξη, τα πρωτεολυτικά ένζυμα των ουδετερόφιλων μπορούν να παίζουν κάποιο ρόλο. Έχει παρατηρηθεί πως τα ουδετερόφιλα που συμμετέχουν σε χρόνιες φλεγμονές δημιουργούν ένα περιβάλλον που ευνοεί την προαγωγή του όγκου (Shamamian *et al*, 2001, Sun *et al*, 2004). Τα κοκκία τους περιέχουν περισσότερα από 20 ένζυμα, όπως μεταλλοπρωτεάσες, κολλαγενάση, ζελατινάση, ελαστάση και καθεψίνη G. Το εξωκυττάριο στρώμα προστατεύεται από αποικοδόμηση από τους κύριους αναστολείς πρωτεασών του πλάσματος (α_1 -αντιπρωτεάση, α_2 -μακροσφαιρίνη, αναστολείς λευκοπρωτεασών), οι οποίοι κανονικά διαμορφώνουν μία κρίσιμη ισορροπία με τα πρωτεολυτικά ένζυμα. Όμως, η ισορροπία αυτή επηρεάζεται άμεσα από τις δραστικές ομάδες οξυγόνου (ROS) που παράγονται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα. Είναι γνωστό ότι η φλεγμονώδης αντίδραση, αλλά και διάφοροι καρκινογόνοι παράγοντες, διεγείρουν τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα), τα οποία αυξάνουν το μεταβολισμό τους παράγοντας δραστικές ουσίες, όπως ανιόντα υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, υποχλωρικό οξύ, OH^\cdot και $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Fitzpatrick, 2001, Babior, 2000). Οι ουσίες αυτές μπορούν να λειτουργήσουν ως μεταγωγείς σήματος, επηρεάζοντας τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων και

προκαλώντας μια σειρά αλλαγών στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση και την απόπτωση (Mantovani *et al*, 2003, Hsu *et al*, 2000). Έτσι, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων, άμεσα, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή τους, ή έμμεσα, τροποποιώντας την έκφραση πρωτεϊνών που ελέγχουν την παραγωγή τους (Okamoto *et al*, 1997).

3.5 Πρωτεάσες Σερίνης

Οι πρωτεάσες σερίνης είναι μια οικογένεια ενζύμων, η οποία χρησιμοποιεί ένα μοναδικά ενεργοποιημένο κατάλοιπο σερίνης στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, για να υδρολύσει καταλυτικά πεπτιδικούς δεσμούς (Schultz and Liebman, 1997). Αυτή η ενεργή θέση χαρακτηρίζεται από μη αντιστρεπτή αλληλεπίδραση με δισοπροπυλφθοροφωσφορικό (DFP). Από όλα τα κατάλοιπα σερίνης μέσα στην πρωτεΐνη, το DFP μπορεί να αντιδράσει μόνο με την ενεργό σερίνη για να σχηματίσει φωσφορικό εστέρα. Από τις 400-500 πρωτεάσες που υπολογίζεται ότι εντοπίζονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα, 32% προβλέπεται να είναι πρωτεάσες σερίνης (Southan, 2001). Αυτή η μεγάλη οικογένεια περιλαμβάνει τα πεπτικά ένζυμα (π.χ θρυψίνη, χυμοθρυψίνη), αυξητικούς παράγοντες που περιέχουν δομή τριπλής θηλειάς (π.χ ενεργοποιητής ιστικού πλασμινογόνου), μερικούς από τους παράγοντες πήξης του αίματος και τις καλλικρεΐνες. Οι πρωτεάσες σερίνης εμπλέκονται σε πολλές ζωτικές λειτουργίες όπως η πέψη, πήξη και ινωδόλυση, αναδόμηση του ιστού, ενεργοποίηση ορμονών και αυξητικών παραγόντων και η αποδόμηση των πρωτεϊνών του εξωκυτταρικού στρώματος. Ορισμένες από τις σερινοπρωτεάσες εκκρίνονται ως ανενεργά “ζυμογόνα”, τα οποία απαιτούν περιορισμένη πρωτεόλυση ώστε να απελευθερωθεί το ενεργό ένζυμο, ενώ άλλες είναι προσδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη.

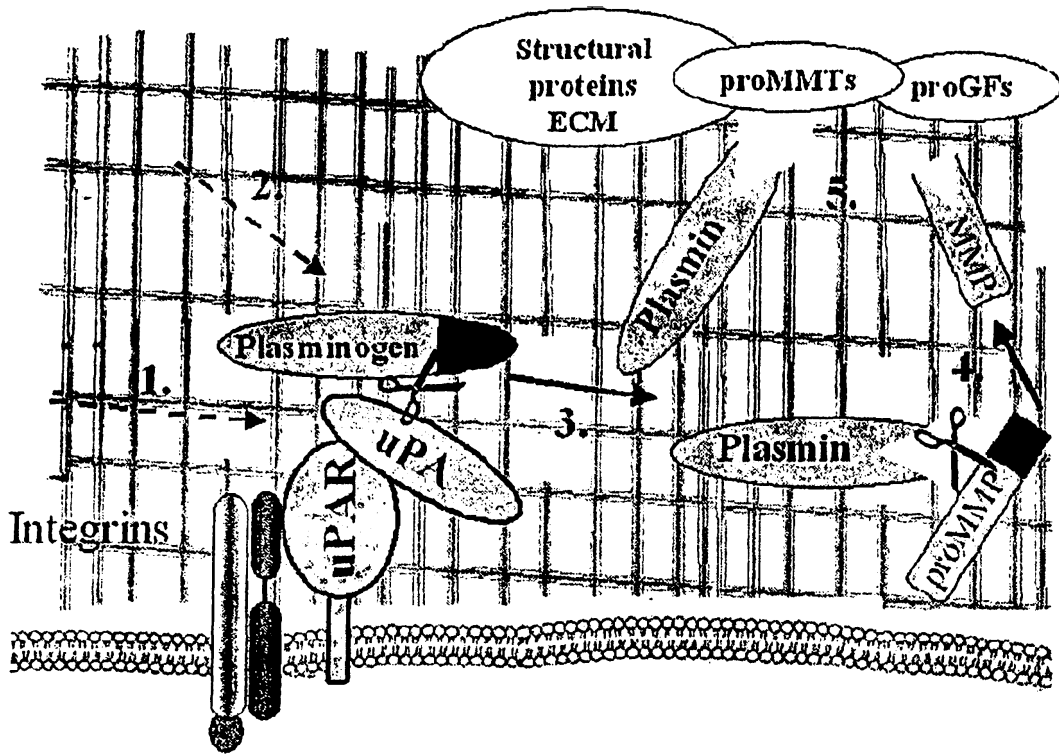
Η πρωτεϊνική ενεργοποίηση που καταλύεται από πρωτεάσες σερίνης είναι ένα παράδειγμα περιορισμένης κατάλυσης, διότι η πεπτιδική υδρόλυση περιορίζεται σε ένα ή δύο συγκεκριμένους πεπτιδικούς δεσμούς, από τους εκατοντάδες πεπτιδικούς δεσμούς σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα (Schultz and Liebman, 1997). Οι πρωτεάσες σερίνης εμφανίζουν προτίμηση για υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών παρακείμενων σε μια συγκεκριμένη κατηγορία αμινοξέων. Στην ομάδα των πρωτεασών με δράση θρυψίνης, η πρωτεάση διασπά πεπτιδικούς δεσμούς που ακολουθούν βασικά αμινοξέα, όπως η αργινίνη ή η λυσίνη, εφόσον όμως υπάρχει ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού (ή γλουταμινικού) οξέος στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, το οποίο μπορεί να σχηματίσει ισχυρό ηλεκτροστατικό δεσμό με τα βασικά αμινοξέα. Οι πρωτεάσες με δράση χυμοθρυψίνης, διαθέτουν μια μη πολική θέση πρόσδεσης του υποστρώματος με αποτέλεσμα να απαιτούν ένα αρωματικό ή ογκώδες μη πολικό αμινοξύ, όπως η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη, τυροσίνη ή λευκίνη. Αντίθετα, ένζυμα με δράση ελαστάσης έχουν ογκώδη αμινοξέα (βαλίνη, θρεονίνη) στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος και έτσι απαιτούν μικρά υδρόφοβα κατάλοιπα, όπως η αλανίνη (Lesk and Fordham, 1996).

Κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, ο σημαντικός ρόλος του εξωκυττάριου στρώματος, αποδόθηκε στο σύστημα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, το οποίο



αποτελείται από προ-ενεργοποιητές, το πλασμινογόνο, τους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς τους, τους αναστολείς ενεργοποίησης και τις αντιπλασμίνες. Υπάρχουν δύο τύποι ενεργοποιητή του πλασμινογόνου: ο τύπος της ουροκινάσης (uPA) και ο ιστικός τύπος (tPA), οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Και οι δύο μπορούν να καταλύουν τη μετατροπή του αδρανούς πλασμινογόνου στην ενεργή πρωτεάση πλασμίνη. Φαίνεται πως ο πρωταρχικός ρόλος του tPA είναι να παράγει πλασμίνη κατά τη θρομβόλυση, ενώ η δράση του uPA εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος. Συνεπώς, ο uPA συμμετέχει στην καρκινική διείδυση και μετάσταση (Dano *et al*, 1999). Ο uPA απελευθερώνεται από τα κύτταρα ως προ-uPA, ο οποίος μετατρέπεται σε ενεργό μορφή από την πλασμίνη, η οποία ανιχνεύεται σε πολύ μικρές ποσότητες στο εξωκυττάριο στρώμα. Η ελαστάση και η καθεψίνη Β επίσης ενεργοποιούν τον uPA (Schmitt *et al*, 1992). Ο μεμβρανικός υποδοχέας uPAR προσδένει με μεγάλη συγγένεια τον προ-uPA. Εκεί γίνεται η ενεργοποίηση από την πλασμίνη. Η ταυτόχρονη δέσμευση πλασμινογόνου και ελεύθερων ομάδων λυσίνης ενισχύει την ενεργοποίηση του πρώτου από την ουροκινάση. Η δεύτερη αντίδραση παράγει επιπλέον πλασμίνη και, έτσι, η ενεργοποίηση πραγματοποιείται ως αντίδραση κλειστού κύκλου. Δύο αναστολείς ελέγχουν κυρίως την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου, οι PAI-1 και PAI-2, ενώ η πλασμίνη αναστέλλεται από την α₂-αντιπλασμίνη (Andreasen *et al*, 1997). Οι αναστολείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των σερπινών (serpin: SERine Protease Inhibitor). Η ενεργός πλασμίνη συμμετέχει στην αποικοδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος, είτε διασπώντας τις περισσότερες πρωτεΐνες αυτού, όπως τη φιμπρονεκτίνη, τη βιτρονεκτίνη και τη φιμπρίνη, αλλά όχι το κολλαγόνο, είτε ενεργοποιώντας κάποιες μεταλλοπρωτεάσες (Σχήμα 3.3). Ενεργοποίηση της πρωτεόλυσης από το σύστημα του uPA έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους κακοήθειας και θεωρείται ότι συμμετέχει σημαντικά στην κινητικότητα και διείδυση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, έχει και άλλες δράσεις, όπως την ενεργοποίηση ορισμένων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (π.χ. προ-TGF-β) (Rifkin *et al*, 1999).





Σχήμα 3.3: Ο καταρράκτης του πλασμινογόνου. Τα διαδοχικά βήματα 1-5 του καταρράκτη προκαλούν εστιασμένη ενεργοποίηση της πλασμίνης και των μεταλλοπρωτεασών.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ

ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ

ΚΑΛΙΚΡΕΪΝΩΝ



Από τις ~500-600 πρωτεάσες που αποτελούν το ανθρώπινο πρωτεολυτικό σύστημα (Puentes *et al*, 2003), μόνο μία μικρή υποομάδα κατέχει κεντρική θέση στη σχετιζόμενη με τον καρκίνο εξωκυτάρια πρωτεόλυση (Werb, 1997). Το ισχύον δόγμα υποστηρίζει πως μία περικυτταρική αλυσίδα, που ξεκινά με το σύστημα πρωτεάσης σερίνης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου της ουροκινάσης (urokinase plasminogen activator, uPA), τον υποδοχέα του uPA (uPAR) και το πλασμινογόνο και καταλήγει στην ενεργοποίηση λανθανουσών μεταλοπρωτεασών του στρώματος (matrix metalloproteinases, MMPs), είναι κυρίως υπεύθυνη για την εξωκυτάρια πρωτεόλυση στον καρκίνο. Όμως, αυτό το πρωτεολυτικό δίκτυο καθίσταται συνεχώς πολυπλοκότερο και νέα μόρια εμπλέκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ανάμεσα στα μόρια αυτά βρίσκεται και η οικογένεια πρωτεασών σερίνης των ιστικών καλλικρεϊνών.

Η σημασία των ιστικών καλλικρεϊνών στην καρκινική πρωτεόλυση αποκαλύφθηκε μόλις πρόσφατα. Πολυάριθμες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση και η πρωτεολυτική τους δραστηριότητα απορρυθμίζεται σε όγκους, κυρίως αδενοκαρκινώματα, και συσχετίζεται με την πρόγνωση του ασθενή. Ως σήμερα, οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιαστεί στην κλινική σημασία των καλλικρεϊνών ως ορολογικών ή ιστικών καρκινικών δεικτών. Όμως, νέα δεδομένα αποδίδουν στις καλλικρεϊνες ρόλο στη νεοπλασματική πρόοδο. Οι επιδράσεις τους στον όγκο και το μικροπεριβάλλον του φαίνεται να είναι ποικίλες, μεταξύ των οποίων και η ενεργοποίηση μελών του μονοπατιού uPA-uPAR-MMP από αρκετές καλλικρεϊνες. Για το λόγο αυτό, η σχετιζόμενη με την οικογένεια των καλλικρεϊνών πρωτεόλυση ίσως αποτελεί ενδιαφέρον πεδίο μελέτης στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου.

4.1 Ιστορική επισκόπηση

Το πρώτο μέλος αυτής της υποομάδας πρωτεολυτικών ενζύμων ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1930, ως μία πρωτεΐνη που αφθονούσε στο παγκρεας. Από την αρχαιοελληνική ονομασία του τελευταίου «καλλικρέας» πήρε το όνομά της (Kraut *et al.*, 1930; Werle *et al.*, 1934). Τα ένζυμα καλλικρεϊνης διαχωρίζονται πλέον σε δυο κύριες κατηγορίες : τις καλλικρεϊνες πλάσματος και τις ιστικές καλλικρεϊνες (Fiedler, 1979, Monat, 1979). Αυτές οι δυο κατηγορίες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όσον αφορά το μοριακό τους βάρος, την εξειδίκευση υποστρώματος, τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά, τη δομή των γονιδίων και τον τύπο της κινίνης που απελευθερώνεται.

Η καλλικρεϊνή πλάσματος ή παράγοντας Fletcher κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, το οποίο εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 4q35 (Asakai *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1998). Το γονίδιο απαρτίζεται από 15 εξόνια και κωδικοποιεί για ένα ένζυμο, το οποίο απελευθερώνει το βιοενεργό πεπτιδίο βραδυκινίνη, από ένα πρόδρομο μόριο μεγάλου μοριακού βάρους που παράγεται από το ήπαρ. Η καλλικρεϊνή πλάσματος εκφράζεται αποκλειστικά από κύτταρα του ήπατος. Η λειτουργία της καλλικρεϊνης πλάσματος περιλαμβάνει τη συμμετοχή της στη

διαδικασία της πήξης του αίματος και της ινωδόλυσης, και διαμέσου της απελευθέρωσης της βραδυκίνης στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της φλεγμονώδους αντίδρασης (Bhoola *et al*, 1992).

Οι ιστικές καλλικρεΐνες αποτελούν οικογένεια από 15 εκκρινόμενες ενδοπεπτιδάσες σερίνης, που σχηματίζονται από μονές πεπτιδικές αλυσίδες των 25-30kDa. Σε τουλάχιστον 6 τάξεις θηλαστικών έχουν βρεθεί ορθόλογες πρωτεΐνες. Τη δεκαετία του 1970, η αναζήτηση ειδικών αντρικών αντιγόνων στο σπέρμα για εγκληματολογικούς λόγους, οδήγησε στην ανακάλυψη του ειδικού προστατικού αντιγόνου (prostate specific antigen, PSA), που σήμερα αποκαλείται καλλικρεΐνη 3 (Hara *et al*, 1971) και αποτελεί το πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας, καθώς και τον πολυτιμότερο βιοδείκτη στην κλινική ιατρική για τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη και την παρακολούθηση ομάδων υψηλού κινδύνου. Η κλωνοποίηση της ιστικής καλλικρεΐνης, του ειδικού προστατικού αντιγόνου και μιας επιπλέον καλλικρεΐνης, που αρχικά ονομάστηκε ανθρώπινη αδενική καλλικρεΐνη, και ο συν-εντοπισμός τους στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.4 πραγματοποιήθηκε αργότερα (Riegman *et al*, 1989). Κατά την προηγούμενη δεκαετία, 12 ακόμη γονίδια πρωτεασών σερίνης ανακαλύφθηκαν και εντάχθηκαν στην οικογένεια των καλλικρεΐνών, με βάση τον εντοπισμό τους στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή, αλλά και μία σειρά ομοιοτήτων στη αλληλουχία και τη δομή τους με τα 3 πρώτα γονίδια καλλικρεΐνών (Yousef *et al*, 2000, Harvey *et al*, 2000). Σήμερα έχει καθιερωθεί ονοματολογία, με βάση την οποία το γονίδιο και η πρωτεΐνη του κάθε μέλους της οικογένειας χαρακτηρίζεται με τη συντόμευση KLK και hK αντίστοιχα, ακολουθούμενη από τον αριθμό του μέλους (Diamandis *et al*, 2000).

Ο όρος καλλικρεΐνη συνήθως χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ένζυμο, το οποίο επιδρά σε ένα πρόδρομο μόριο (κινινογόνο) με στόχο την απελευθέρωση ενός βιοενεργού πεπτιδίου (κινίνη). Ένας άλλος όρος που συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει αυτά τα ένζυμα είναι “κινινογενάσες”. Ο όρος “κινινάση” χρησιμοποιείται για να περιγράψει άλλα ένζυμα, τα οποία απενεργοποιούν τις κινίνες. Ανάμεσα στις γνωστές ανθρώπινες και ζωικές καλλικρεΐνες, μόνο ένα ένζυμο έχει την ικανότητα να απελευθερώνει ικανοποιητικά μια βιοενεργή κινίνη από ένα κινινογόνο. Στους ανθρώπους, αυτό το ένζυμο είναι γνωστό ως παγκρεατική/νεφρική καλλικρεΐνη, ή σύμφωνα με τη νέα ονοματολογία ως KLK1 γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για την ανθρώπινη καλλικρεΐνη 1 (hK1 πρωτεΐνη). Το ένζυμο αυτό επιδρά σε ένα κινινογόνο προερχόμενο από το ήπαρ, έτσι ώστε να απελευθερωθεί λυσυλ-βραδυκίνη (γνωστή και ως καλλιδίνη), η οποία ενέχεται στον έλεγχο της πίεσης του αίματος, της ισορροπίας ηλεκτρολυτών, της φλεγμονής και άλλων φυσιολογικών διαδικασιών. Η ιστική καλλικρεΐνη 1 (hK1) μπορεί επιπλέον να πέψει ενζυματικά και άλλα υποστρώματα, όπως αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και κυτοκινίνες.



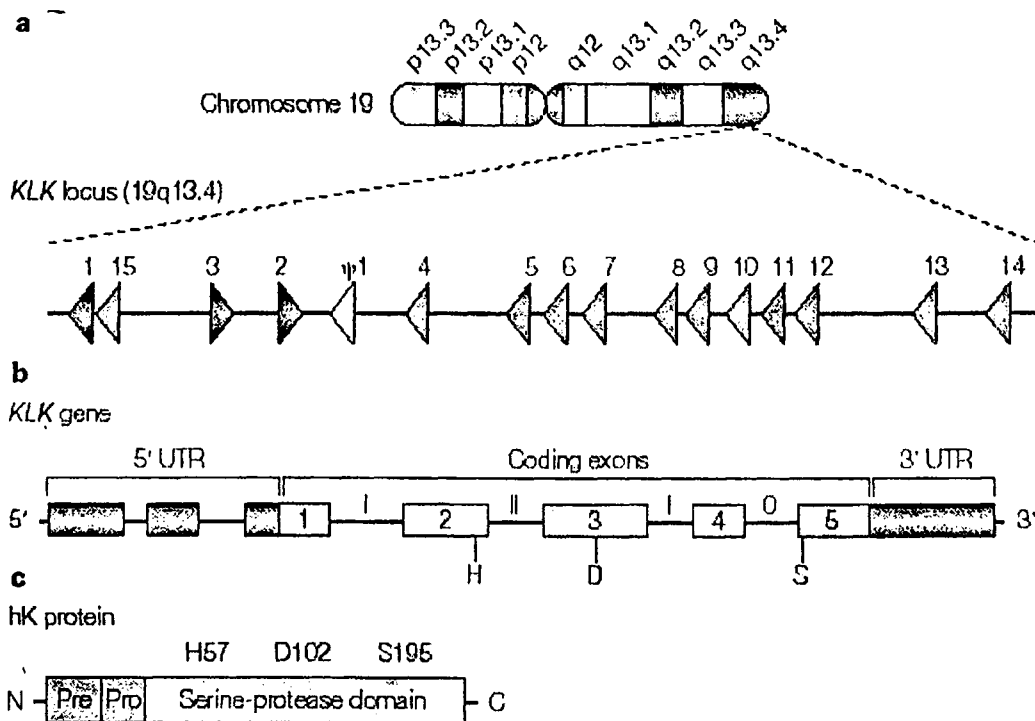
4.2 Γονιδιακή οικογένεια των ιστικών καλλικρεϊνών – γενικά χαρακτηριστικά

Τα 15 γονίδια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών (συν ένα ψευδογονίδιο) εδράζονται στην περιοχή 19q13.4 του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος 19. Η αλληλουχία που καλύπτει την οικογένεια εκτείνεται σε ~300Kb (Σχήμα 4.1) και σήμερα θεωρούνται ως το μεγαλύτερο σύμπλεγμα γονιδίων πρωτεασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Puenta *et al*, 2003). Μεταξύ των γονιδίων των καλλικρεϊνών δεν παρεμβάλλονται άλλα γονίδια. Τα 15 γονίδια των καλλικρεϊνών παρουσιάζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά σε επίπεδο γονιδιακής οργάνωσης και πρωτεϊνικής δομής (Yousef and Diamandis, 2001). Η κατεύθυνση μεταγραφής είναι από το τελομερές προς το κεντρομερές, με εξαίρεση τις KLK2 και KLK3. Κάθε γονίδιο έχει μήκος 4,4-10,5 Kb και περιέχει 5 κωδικά εξώνια και ένα ή δύο μη κωδικά εξώνια στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Τα κωδικά εξώνια έχουν παρόμοιο μήκος σε όλα τα γονίδια. Η 3' αμετάφραστη περιοχή, όπως και τα 4 εσόνια που παρεμβάλλονται μεταξύ των κωδικών εξωνίων ποικίλουν σε μήκος μεταξύ των γονιδίων. Τα τελευταία παρουσιάζουν όμως πανομοιότυπο πρότυπο φάσης εσονίου (I, II, I, 0). Οι θέσεις όπου εδράζονται τα κωδικόνια για τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας (ιστιδίνη, ασπαρτικό οξύ και σερίνη) του ενεργού κέντρου των καλλικρεϊνών είναι πολύ συντηρημένες.

Άλλο κοινό χαρακτηριστικό των γονιδίων της οικογένειας των καλλικρεϊνών είναι η ύπαρξη πολλών εναλλακτικών προϊόντων μεταγραφής. Η πολυπλοκότητα αυτή είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής συρραφής των κωδικών και μη-εξονίων, διαφορετικών θέσεων έναρξης ή λήξης της μεταγραφής ή της μετάφρασης, ή συνδυασμού τους (Kurlender *et al*, 2005).

Οι καλλικρεΐνες παρουσιάζουν επίσης πολλές ομοιότητες σε επίπεδο πρωτεΐνης. Παρουσιάζουν ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία 40-80%, αλλά οι αλληλουχίες πέριξ των καταλυτικών καταλοίπων είναι πλήρως συντηρημένες. Όλες είναι μονής αλυσίδας, εκκρινόμενες πρωτεάσες. Συνθέτονται ως μη δραστικά προένζυμα με μήκος 248-293 αμινοξέων (Yousef and Diamandis, 2001). Αυτά περιέχουν μία άμινο-τελική αλληλουχία σηματοδότησης 16-57 αμινοξέων που τα που τα κατευθύνει προς το ενδοπλασματικό δίκτυο προς έκκριση, ένα πεπτίδιο ενεργοποίησης 4-9 αμινοξέων συνήθως, που καταλήγει σε λυσίνη ή αργινίνη, που τα διατηρεί σε αδρανή κατάσταση και την περιοχή της πρωτεάσης που είναι υπεύθυνη για την καταλυτική ενεργότητα. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα στις συντηρημένες θέσεις His57, Asp102 και Ser195. Η παρουσία Lys ή Arg στο τέλος του προπεπτιδίου δείχνει ότι τα ζυμογόνα αυτά ενεργοποιούνται από ένζυμα με δραστικότητα θρυψίνης. Κάθε καλλικρεΐνη περιέχει 10-12 κατάλοιπα κυστεΐνης, που σχηματίζουν 5 (στις hK1-hK3 και hK13) ή έξι (hK4-hK12 και hK15) δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της διαμόρφωσής της στο χώρο. Τα τυπικά ή ποικίλα σήματα πολυαδενυλίωσης υπολογίζεται πως βρίσκονται 10-20 βάσεις μακριά από την poly A ουρά σε όλες τις καλλικρεΐνες. Στο επίπεδο του ενζύμου, οι καλλικρεΐνες παρουσιάζουν την κλασική τεταρτοταγή δομή των πρωτεασών σερίνης της τάξης της χυμοθρυψίνης, που αποτελείται από 2 β-βαρέλια και 2 α-έλικες, με το ενεργό

κέντρο να γεφυρώνει τα βαρέλια (Bennett *et al*, 2002, Gomis-Ruth *et al*, 2002). Σε αυτού του τύπου τα ένζυμα, η ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα καθορίζεται από την αλληλεπίδραση P1-S1 και, κυρίως, από το αμινοξύ που καταλαμβάνει τη θέση 189 της περιοχής S1, 6 αμινοξέα πριν την Ser195 του ενεργού κέντρου. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζεται το αμινοξύ που καταλαμβάνει τη θέση αυτή στις 15 καλλικρεΐνες και η εκ τούτου προβλεπόμενη ειδικότητα τους. Δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις εκτός της S1 περιοχής, στους 6 επιφανειακούς βρόχους που περιβάλλουν το ενεργό κέντρο, προκαλούν μικρές διαφοροποιήσεις στην εξειδίκευση του υποστρώματος (Brillard-Bourdet *et al*, 1995, Oka *et al*, 2002).



Σχήμα 4.1: Χρωμοσωμική θέση καλλικρεΐνών και γενικά δομικά χαρακτηριστικά γονιδίου και πρωτεΐνης. α: Οι «κλασσικές» καλλικρεΐνες KLK1-3 παρουσιάζονται με κόκκινα βέλη, οι υπόλοιπες με μοβ και το ψευδογονίδιο ψKLK1 με κίτρινο. β: Τα γονίδια των ιστικών καλλικρεΐνών έχουν μήκος από 4 ως 10 kb και περιέχουν 5 κωδικά εξόνια και 4 παρεμβαλλόμενα εσόνια τα οποία χαρακτηρίζονται από συντηρημένο πρότυπο φάσης (I,II,I,0). Τα μήκη των κωδικών εξονίων (όχι όμως και των εσονίων) είναι παρόμοια στα μέλη της οικογένειας. H,D,S: ιστιδίνη, ασπαρτικό οξύ και σερίνη που σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα των καλλικρεΐνών. Οι θέσεις των κωδικονίων τους είναι πολύ συντηρημένες. Τα περισσότερα γονίδια περιέχουν επιπλέον ένα ή δύο μη κωδικά εξόνια στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Η 3' αμετάφραστη περιοχή ποικίλει σε μήκος. γ: Οι πρωτεΐνες των καλλικρεΐνών είναι μονής αλυσίδας, εκκρινόμενες πρωτεάσες σερίνης. Συνθέτονται ως ανενεργά προ-ένζυμα που περιέχουν μία αμινο-τελική αλληλουχία σηματοδότησης που τα κατευθύνει στο ενδοπλασματικό δίκτυο προς έκκριση, ένα προπεπτίδιο που τα διατηρεί σε ανενεργή κατάσταση και την περιοχή της σερινικής πρωτεάσης που συνεισφέρει την καταλυτική ενεργότητα.



Αμινοξύ 189 θέση S1	Καλλικρεΐνη	Ειδικότητα	Αμινοξύ στη θέση P1
Ασπαρτικό οξύ	1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14	Θρυψίνης	Αργινίνη/ Λυσίνη
Γλουταμινικό οξύ	15		
Σερίνη	3	Χυμοθρυψίνης	Τυροσίνη/ Φαινυλαλαίνη
Ασπαραγίνη	7		
Γλυκίνη	9		

Πίνακας 4.1: Αμινοξέα που αλληλεπιδρούν στις θέσεις S1-P1 και η ειδικότητα που προσδίδουν.

Οι καλλικρεΐνες παρουσιάζουν 30-50% ομολογία σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο. Η μεγαλύτερη ομοιότητα εμφανίζεται μεταξύ των «κλασσικών» καλλικρεΐνων hK1-hK3.

4.3. Ρύθμιση της έκφρασης και ενεργότητας των καλλικρεΐνών

Αρκετοί μεταγραφικοί και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση της έκφρασης και της πρωτεολυτικής ενεργότητας των καλλικρεΐνών. Η έκφραση τους ελέγχεται από διάφορους επαγωγικούς και ανασταλτικούς παράγοντες που συμμετέχουν σε πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Οι καλύτερα μελετημένοι ρυθμιστές της έκφρασης των KLKs είναι οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου. Οι ορμόνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών οργάνων αλλά και καρκίνων που σχετίζονται με το ενδοκρινές σύστημα. Οι KLK2 και KLK3 είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ρυθμιζόμενων από ανδρογόνα γονιδίων, που εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στον προστάτη. Σύμπλοκα ανδρογόνων και υποδοχέων τους προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης στα ανδρογόνα (androgen response elements, AREs) στην εγγύς περιοχή του υποκινητή και του ενισχυτή των KLK2 και KLK3 και επάγουν τη μεταγραφή τους (Cleutjens *et al*, 1996). Αντίθετα, άλλα γονίδια, όπως η KLK5 και η KLK6, ρυθμίζονται κυρίως από οιστρογόνα. Μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση όλων των καλλικρεΐνών επηρεάζεται από ανδρογόνα και/ή οιστρογόνα. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής δεν έχει διαλευκανθεί, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί αναλυτικός χαρακτηρισμός του υποκινητή των «νέων» καλλικρεΐνών. Η συχνά παράλληλη έκφραση ομάδων καλλικρεΐνών σε διάφορους ιστούς έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η μεταγραφή τους μπορεί να ελέγχεται συντονισμένα με ιστο-ειδικό τρόπο από *cis* ρυθμιστικές περιοχές, όπως έχει βρεθεί ότι γίνεται στην περίπτωση της έκφρασης της οικογένειας των καλλικρεΐνών στους σιελογόνους αδένες των αρουραίων (Smith *et al*, 1992). Επιπλέον ρυθμιστικά στοιχεία της έκφρασης των καλλικρεΐνών πιθανώς δρουν ανεξάρτητα από το μονοπάτι στεροειδών ορμονών και των υποδοχέων τους, ή επηρεάζουν αυτό.

Η δράση των πρωτεασών είναι πάντα μη αναστρέψιμη. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί που εμποδίζουν την ανεπιθύμητη πρωτεόλυση και διατηρούν την κυτταρική ακεραιότητα. Για τις καλλικρεΐνες, οι

μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν ενεργοποίηση ζυμογόνου, ενδογενείς αναστολές, αδρανοποίηση μέσω εσωτερικής διάσπασης και αλλοστερικό έλεγχο. Όπως και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, οι καλλικρεΐνες μεταφράζονται αρχικά ως αδρανή ή ελάχιστα ενεργά ζυμογόνα (προ-ένζυμα) και περιέχουν ένα άμινο-τελικό προπεπτιδίο 4-9 αμινοξέων που τα διατηρεί σε λανθάνουσα, μη ενεργή κατάσταση (Σχήμα 4.1). Η ενεργοποίηση των ζυμογόνων των καλλικρεΐνών επιτυγχάνεται με υδρόλυση του προπεπτιδίου, η οποία επάγει τροποποίηση της στερεοδομής του ενζύμου στο ενεργό κέντρο και την πτυχή δέσμευσης του υποστρώματος, καθιστώντας το ένζυμο ενεργό. Η ενεργοποίηση του προ-ενζύμου συνήθως απαιτεί ενεργότητα θρυψίνης για την απομάκρυνση του προπεπτιδίου, με εξαίρεση την hK4 που απαιτεί ενεργότητα χυμοθρυψίνης, και μπορεί να συμβεί ενδο- ή εξωκυττάρια. *In vitro* μελέτες δείχνουν ότι κάποιες καλλικρεΐνες αυτό-ενεργοποιούνται, όπως η hK2, η hK6 και η hK13 (Mikolajczyk *et al*, 1997, Magklara *et al*, 2003, Sotiropoulou *et al*, 2003) ή/και ενεργοποιούνται από άλλες καλλικρεΐνες. Η προ-hK2 μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις καλλικρεΐνες 2,4,15 (Lovgren *et al*, 1997, Takayama *et al*, 2001a, Takayama *et al*, 2001b) και άλλες πρωτεάσες σερίνης, όπως η θρυψίνη (Takayama *et al*, 1997), αλλά και οι μεταλοπρωτεΐνάσες (Takada *et al*, 1985).

Η ενεργοποίηση ζυμογόνου είναι μη αντιστρεπτή. Αφού ενεργοποιηθούν, οι καλλικρεΐνες ελέγχονται από ενδογενείς αναστολές, κυρίως τον ευρείας ειδικότητας αναστολέα α_2 -μακροσφαιρίνη (α_2M) και τις σερίνες στους ιστούς ή στον ορό. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα προσελκύονται σε μία προβάλλουσα πεπτιδική περιοχή (περιοχή «δόλωμα») της α_2M και τη διασπών, με αποτέλεσμα να προκαλείται σημαντική αλλαγή της στερεοδιάταξης του αναστολέα, που παγιδεύει την πρωτεάση σε ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο. Αυτό δεν αναστάλει την ενεργότητα του ενζύμου, αλλά εμποδίζει την αλληλεπίδραση των καλλικρεΐνών με μεγάλα υποστρώματα ή άλλους αναστολές με χωρική παρεμπόδιση. Όπως και άλλες πρωτεάσες σερίνης της οικογένειας S1, οι καλλικρεΐνες αλληλεπιδρούν με σερίνες μέσω της θηλειάς της δραστηκής περιοχής, με δύο μονοπάτια. Το πρώτο είναι το ανασταλτικό μονοπάτι, που καταλήγει στο σχηματισμό ομοιοπολικού συμπλόκου και επάγει αποδιάταξη και μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση της καλλικρεΐνης. Το δεύτερο είναι το μονοπάτι 'υποστρώματος', όπου το ένζυμο διασπά την σερίνη. Τελικά, τα σύμπλοκα της καλλικρεΐνης με την α_2M ή τη σερίνη απομακρύνονται από την κυκλοφορία είτε με δέσμευση σε ειδικούς υποδοχείς που οδηγούν σε ενδοκύτωση, είτε με αποικοδόμηση από άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα.

Η απενεργοποίηση των καλλικρεΐνών μπορεί επίσης να επιτευχθεί με εσωτερική διάσπαση από άλλες πρωτεάσες. Προϊόντα διάσπασης των hK2 και hK3 έχουν ανιχνευθεί στο σπερματικό πλάσμα και τον προστάτη (Rittenhouse *et al*, 1998), πιθανόν από ένζυμα με ειδικότητα θρυψίνης. Ο μηχανισμός της αυτοπρωτεόλυσης έχει επίσης προταθεί (Magklara *et al*, 2003, Bayes *et al*, 2004).

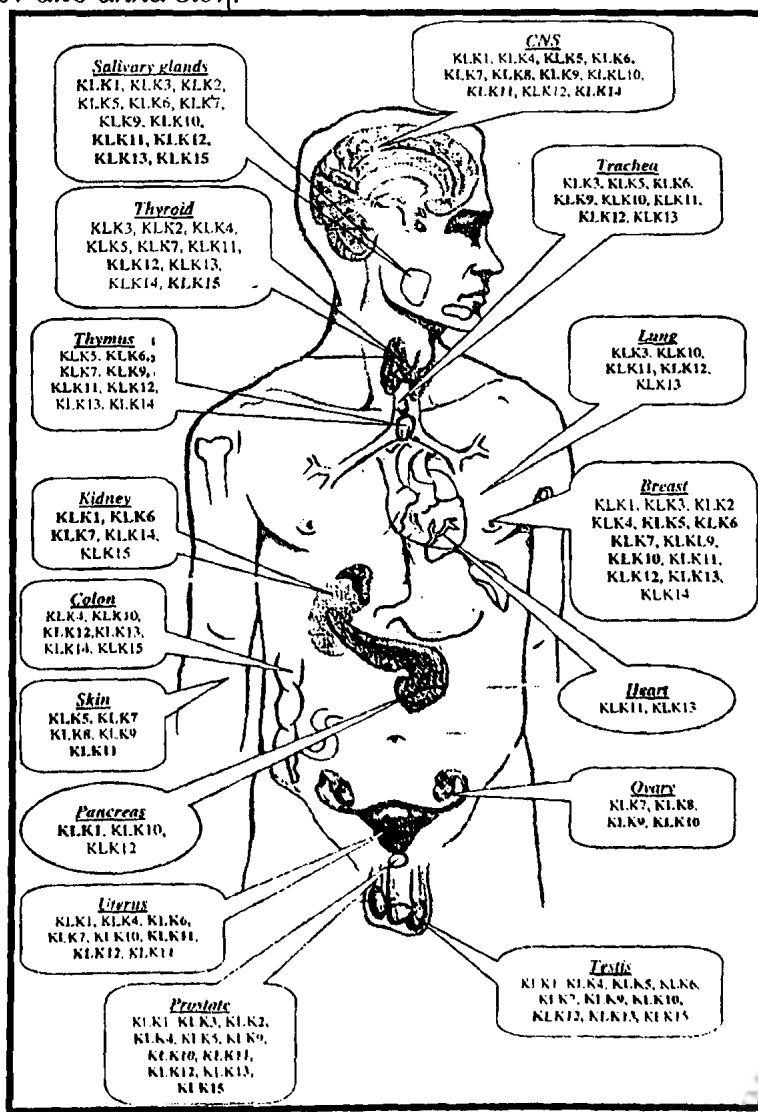
Δισθενή κατιόντα, κυρίως ψευδαργύρου, έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν αντιστρεπτά τις hK2 και hK3 μετά από δέσμευση σε δύο αλλοστερικές θέσεις (Lovgren *et al*, 1999). Αυτός ο ρυθμιστικός μηχανισμός πιστεύεται ότι συμβαίνει κυρίως στον προστάτη, όπου συσσωρεύονται τα υψηλότερα επίπεδα ψευδαργύρου



στο σώμα, και αναστρέφεται στο σπερματικό πλάσμα, όπου τα αντίστοιχα επίπεδα είναι πολύ χαμηλότερα. Η συγκέντρωση ψευδαργύρου είναι επίσης πολύ χαμηλή στον καρκίνο του προστάτη, γεγονός που πιθανώς εξηγεί την αυξημένη ενεργότητα των καλλικρεϊνών στους συγκεκριμένους όγκους.

4.4 Φυσιολογικός ρόλος των καλλικρεϊνών

Οι καλλικρεϊνες συνήθως εκφράζονται παράλληλα σε διάφορα όργανα όπως το δέρμα, ο μαστός, ο προστάτης, το πάγκρεας και ο εγκέφαλος, κυρίως από εκκριντικά επιθηλιακά κύτταρα (Σχήμα 4.2). Από εκεί, εισέρχονται στα υγρά του σώματος, όπως ο ιδρώτας, το γάλα, το σίελο, το σπερματικό πλάσμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στους περικυτταρικούς χώρους (Diamandis and Yousef, 2003). Έτσι, φαίνεται ότι συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες, είτε ανεξάρτητα, είτε ως μέρος αλυσιδωτών αντιδράσεων. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος και τα *in vivo* υποστρώματα των περισσότερων μελών της οικογένειας παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ασαφή (με εξαίρεση τις hK1 και hK3). Οι υποθέσεις που γίνονται σήμερα βασίζονται κυρίως σε *in vitro* μελέτες ή τη γνωστή δράση των ορθόλογων ενζύμων από άλλα είδη.



Σχήμα 4.2: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των ιστικών καλλικρεϊνών σε διάφορους ιστούς. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης αναπαρίστανται με τα έντονα γράμματα.

4.5 Οι καλλικρεΐνες ως μέρος ενός νέου πιθανού ενζυμικού καταρράκτη ή μονοπατιού

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σερινοπρωτεασών είναι συνήθεις και υποστρώματα των σερινοπρωτεασών είναι συνήθως άλλες πρωτεάσες σερίνης, οι οποίες ενεργοποιούνται από ένα ανενεργό πρόδρομο μόριο (Schultz and Liebman, 1997). Η ανάμειξη των σερινοπρωτεασών σε ενζυμικά μονοπάτια είναι καλά τεκμηριωμένη. Ένα σημαντικό παράδειγμα είναι ο καταρράκτης της πήξης του αίματος. Σ' αυτόν τον ενζυμικό καταρράκτη, η ενεργοποιημένη μορφή ενός παράγοντα καταλύει την ενεργοποίηση του επόμενου παράγοντα. Πολύ μικρές ποσότητες των αρχικών παραγόντων είναι επαρκείς ώστε να πυροδοτήσουν τον καταρράκτη εξαιτίας της καταλυτικής φύσης της διαδικασίας. Τα πολυάριθμα αυτά βήματα προκαλούν μεγάλη ενίσχυση, εξασφαλίζοντας γρήγορη και ενισχυμένη απάντηση στο τραύμα (Silverthorn, 1995). Ένας παρόμοιος μηχανισμός εμπλέκεται στη διάλυση των θρόμβων του αίματος, κατά τον οποίο η ενεργοποίηση των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου οδηγεί στην μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την διάσπαση του ινώδους θρόμβου. Ένα τρίτο σημαντικό παράδειγμα συντονισμένης δράσης των σερινοπρωτεασών περιλαμβάνει τα εντερικά πεπτικά ένζυμα. Η πέψη των πρωτεϊνών στο δωδεκαδάκτυλο απαιτεί τη σύγχρονη δράση διάφορων πρωτεολυτικών ενζύμων. Συντονισμένος έλεγχος επιτυγχάνεται με τη δράση της θρυψίνης, ως ένας κοινός ενεργοποιητής όλων των παγκρεατικών ζυμογόνων, θρυψινογόνο, χυμοθρυψινογόνο, προελαστάση και προκαρβοξυπεπτιδάση. Η θρυψίνη αρχικά ενεργοποιείται από το ένζυμο της εντεροπεπτιδάσης και μια μικρή ποσότητα της ενεργής θρυψίνης ενεργοποιεί περισσότερη θρυψίνη. Το μονοπάτι της απόπτωσης είναι ένα ακόμα σημαντικό παράδειγμα συντονισμένης δράσης των πρωτεασών.

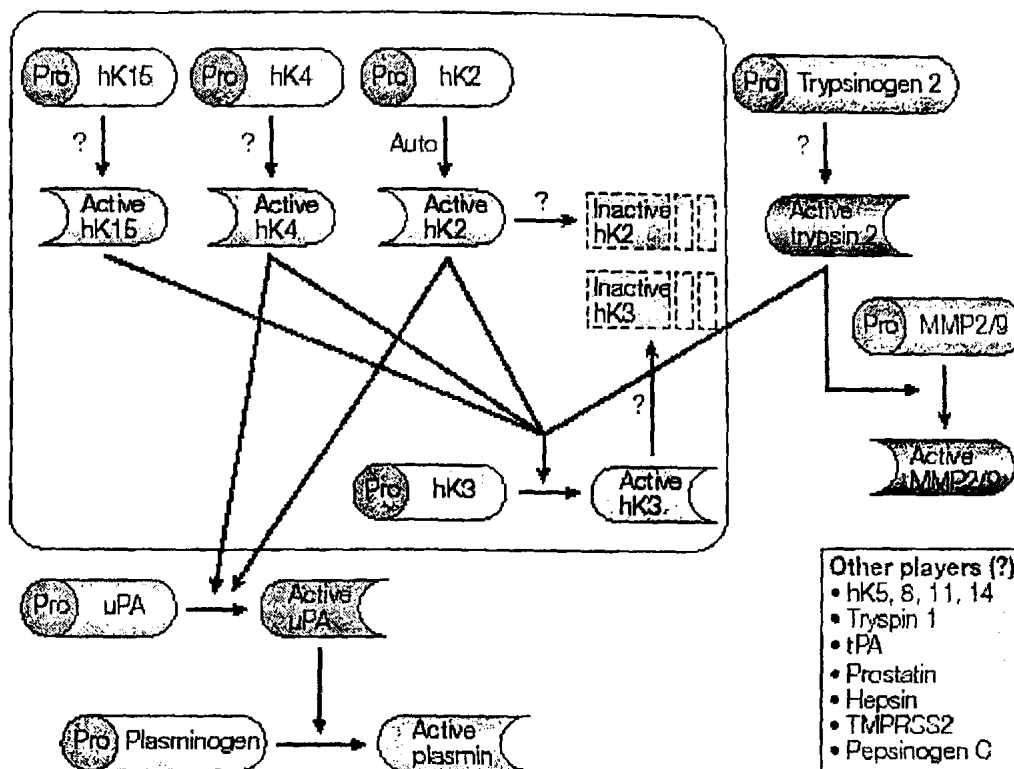
Αρκετές ενδείξεις υποδεικνύουν μία αλληλεπίδραση των καλλικρεϊνών, οδηγώντας στην υπόθεση ότι εμπλέκονται σ' ένα ενζυμικό μονοπάτι:

- Η ταυτόχρονη έκφραση πολλών καλλικρεϊνών στον ίδιο ιστό.
- Η ικανότητα ορισμένων καλλικρεϊνών να ενεργοποιούν η μία την άλλη.
- Η ικανότητα άλλων σερινοπρωτεασών να ενεργοποιούν καλλικρεΐνες.
- Τα κοινά πρότυπα ορμονικής ρύθμισης (από στεροειδή).
- Τα παράλληλα πρότυπα έκφρασης σε φυσιολογικούς ιστούς (π.χ. τα παρακείμενα γονίδια KLK2-5 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στον προστάτη).
- Τα παράλληλα πρότυπα διαφορικής έκφρασης πολλών καλλικρεϊνών σε διαφορετικές κακοήθειες.
- Οι σερινοπρωτεάσες συνήθως χρησιμοποιούν άλλες σερινοπρωτεάσες ως υποστρώματα.

Οι πιθανολογούμενοι ενζυμικοί καταρράκτες των καλλικρεϊνών ίσως συνεισφέρουν σε διάφορες λειτουργίες σε συγκεκριμένους ιστούς του σώματος. Ένα τέτοιο παράδειγμα παρουσιάζεται στο σχήμα 4.3 και αφορά στη ρύθμιση της διάλυσης του σπερματικού θρόμβου στο σπερματικό πλάσμα μετά την εκσπερμάτωση.



a Prostatic/seminal plasma cascade



Σχήμα 4.3: Προτεινόμενος μηχανισμός αλληλεπίδρασης μελών της οικογένειας των καλλικρεϊνών και άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων στη ρύθμιση της διάλυσης του σπερματικού θρόμβου στο σπερματικό πλάσμα μετά την εκσπερμάτωση.

4.6 Εξέλιξη της γονιδιακής οικογένειας των ιστικών καλλικρεϊνών

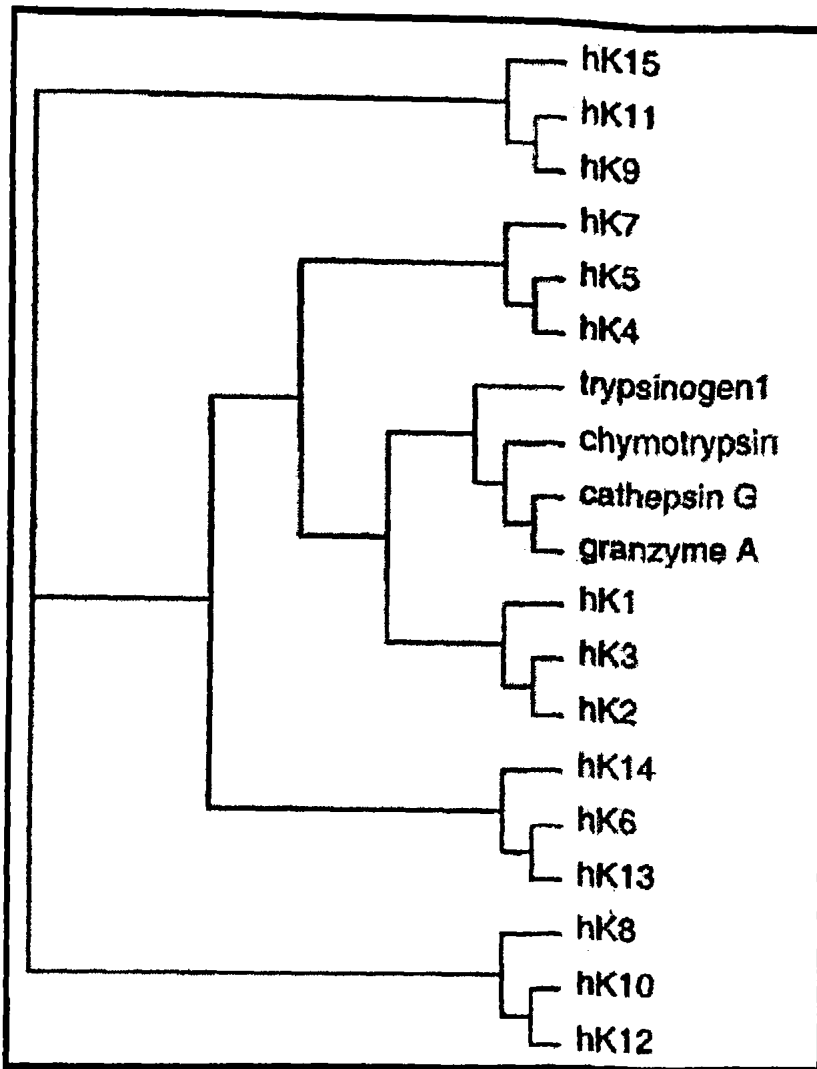
Αρκετές φυλογενετικές αναλύσεις έχουν εφαρμοστεί και για τις 15 καλλικρεϊνικές πρωτεΐνες παράλληλα με κάποιες καλλικρεΐνες ποντικού και αρουραίου και άλλες πρωτεάσες σερίνης. Οι καλλικρεϊνικές πρωτεΐνες βρέθηκαν να συγκροτούνται σε ένα κλαδί με σημαντική αξιοπιστία (Σχήμα 4.4). Συνεπώς, μπορεί να βρεθεί ο αρχικός πρόγονος αυτού του κλάδου χρησιμοποιώντας αλληλουχίες άλλων πρωτεασών ως εξωομάδα (outgroup) (Yousef *et al*, 2001, 2000). Όλες οι μέθοδοι έδειξαν ότι οι κλασικές καλλικρεΐνες (hK1-hK3) αποτελούν μια διακριτή μονοφυλετική ομάδα στην οικογένεια των καλλικρεϊνών, σύμφωνα και με άλλες αναφορές (Clements *et al*, 2001). Ο διαχωρισμός των κλασικών ανθρώπινων καλλικρεϊνών από τις «νέες» ανθρώπινες καλλικρεΐνες (hK4-hK15) επιβεβαιώνεται και από άλλα ευρήματα. Ο βαθμός ομοιότητας σε πρωτεϊνικό επίπεδο ανάμεσα στις κλασικές καλλικρεΐνες είναι περίπου 80%, ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από το ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στις κλασικές και νέες καλλικρεΐνες (30-50%). Επίσης, οι τρεις κλασικές καλλικρεΐνες έχουν έναν διακριτό «καλλικρεϊνικό βρόχο», ο οποίος δεν εντοπίζεται στις νέες καλλικρεΐνες, ενώ οι νέες καλλικρεΐνες έχουν έξι δισουλφιδικούς δεσμούς (εξαιρέση η hK13) σε αντίθεση με τους πέντε δεσμούς των κλασικών καλλικρεϊνών. Τέλος, οι δυο από τις τρεις κλασικές καλλικρεΐνες (KLK2, KLK3) δεν έχουν ορθόλογες πρωτεΐνες στα τρωκτικά, ενώ οι νέες καλλικρεΐνες έχουν (Mitsui *et al*, 2000). Μπορούμε να συμπεράνουμε, λοιπόν, ότι οι νέες καλλικρεΐνες πιθανόν έχουν αποκλίσει πριν από το διαχωρισμό τρωκτικών-πρωτευόντων, ο οποίος

χρονολογείται 65 με 85 εκατομμύρια χρόνια πριν (Lee, 1999) και επίσης ότι είτε οι κλασικές καλλικρεΐνες έχουν αποκλίσει από τις λεγόμενες «νέες» καλλικρεΐνες, είτε ότι οι δυο ομάδες είναι μονοφυλετικές και μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο. Εντός της οικογένειας των ανθρώπινων καλλικρεΐνών, είναι δύσκολο να καθοριστεί με ακρίβεια ο βαθμός απόκλισης των διαφορετικών κλάδων εξαιτίας του μικρού αριθμού κλάδων. Ωστόσο, τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα συμφωνούν στο ότι οι καλλικρεΐνες μπορούν να διαιρεθούν σε γενικές γραμμές σε πέντε κύριους κλάδους, χρησιμοποιώντας μεθόδους distance matrix. Συγκεκριμένα, οι καλλικρεΐνες hK1-hK3 ομαδοποιούνται σε έναν κλάδο, οι hK9, hK11, hK15 στον δεύτερο, οι hK6, hK13, hK14 στον τρίτο, οι hK8, hK10, hK12 στον τέταρτο και οι hK4, hK5, hK7 στον πέμπτο (Yousef *et al*, 2001; Harvey *et al*, 2000).

Η πιο αποδεκτή θεωρία είναι ότι αυτή η οικογένεια γονιδίων προέκυψε μέσω διπλασιασμού γονιδίων και ανακατάταξη εξωνίων (Yousef and Diamandis, 2000; Nelson *et al*, 1999). Ο μηχανισμός που πιθανότατα λαμβάνει χώρα, συμπεριλαμβάνει άνισο επιχιασμό των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια του μειωτικού ανασυνδυασμού. Πράγματι, ειδικοί μικροδορυφόροι για το χρωμόσωμα 19 έχουν ταυτοποιηθεί στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος, οι οποίοι μάλλον έχουν διευκολύνει τέτοιου είδους διπλασιασμό γονιδίων (Angata and Varki, 2000; Das *et al*, 1987; Yousef *et al*, 2001)

Τέλος, αξίζει να σημειώσουμε πως οι περισσότερες φυλογενετικές αναλύσεις και ο σχεδιασμός των αντίστοιχων δέντρων βασίζονται σε κατάλοιπα εκτεθειμένα στην επιφάνεια, τα οποία ελέγχουν την αναγνώριση υποστρώματος και προσδέτη (Krem and Di Cera, 2001).





Σχήμα 4.4: Δενδρόγραμμα του προβλεπόμενου φυλογενετικού δέντρου για τις 15 καλλικρεΐνες και κάποιες άλλες σχετικές πρωτεάσες σερίνης.

4.7 Καλλικρεΐνες και καρκίνος

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει απορύθμιση της έκφρασης των καλλικρεϊνών στον καρκίνο. Τα επίπεδα των μεταγράφων και των πρωτεϊνών των καλλικρεϊνών μεταβάλλονται ιδιαίτερα σε αδενοκαρκινώματα που προέρχονται από ιστούς που ρυθμίζονται από στεροειδείς ορμόνες του φύλλου (Πίνακας 4.2). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αύξηση της έκφρασης 12 γονιδίων της οικογένειας στον καρκίνο των ωοθηκών, σε επίπεδο μεταγράφων ή/και πρωτεϊνών, που έχει διαπιστωθεί από μελέτες σε ιστούς, κυτταρικές σειρές ή ορό και ασκτικό υγρό, με χρήση διαφόρων τεχνικών. Αντιθέτως, η έκφραση των περισσότερων γονιδίων φαίνεται να μειώνεται στους καρκίνους του μαστού, του προστάτη και των όρχεων. Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί διαφορετική έκφραση καλλικρεϊνών σε μη ορμονο-εξαρτώμενους τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο του πνεύμονα (Bhattacharjee *et al*, 2001), του παγκρέατος (Iacobuzio-Donahue *et al*, 2003), της κεφαλής και του τραχήλου (Chung *et al*, 2004), του παχέως εντέρου (Ogawa *et al*, 2005), του στομάχου (Nagahara *et al*, 2005) και λευχαιμία (Roman-Gomez *et al*, 2004) (Πίνακας 4.3).

ΚΑΡΚΙΝΟΣ	hK/ KLK	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΕΚΦΡΑΣΗ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
Μαστού	1	Καρκ.Κύτταρα	ΜΔ	ΜΔ
	3	Ορός,Κύτταρα	↓ στον κακοήθη όγκο	Ευνοϊκή πρόγνωση, Πρόβλεψη απόκρισης σε Ταμοξιφένη
	5	Ορός	↓ στον κακοήθη όγκο ↑ στον ορό ασθενών	Διάγνωση, Δυσοίωση πρόγνωση
	6	ΜΔ	↓ σε μεταστατικό & κακοήθη όγκο ↑ στον πρωτογενή όγκο	ΜΔ
	7	ΜΔ	ΜΔ	Δυσοίωση πρόγνωση
	8	ΜΔ	↓ στον κακοήθη όγκο	ΜΔ
	9	ΜΔ	ΜΔ	Ευνοϊκή πρόγνωση
	10	ΜΔ	↓ στον κακοήθη όγκο και σε κυτταρικές σειρές	Πρόβλεψη απόκρισης σε Ταμοξιφένη
	12	ΜΔ	↓ στον κακοήθη όγκο	ΜΔ
	13	ΜΔ	↓ στον κακοήθη όγκο και σε κυτταρικές σειρές	Ευνοϊκή πρόγνωση
	14	Ορός,Κύτταρα	↓ στον κακοήθη όγκο και σε κυτταρικές σειρές	Διάγνωση, Δυσοίωση πρόγνωση
	15	ΜΔ	ΜΔ	Ευνοϊκή πρόγνωση
	Τραχήλου της μήτρας	8	Καρκ.Κύτταρα	↑ καρκινικές κυτ. σειρές & Πρωτογενείς καλλιέργειες όγκων
Ωοθηκών	2.3	ΜΔ	↑ στον κακοήθη όγκο	ΜΔ
	4	Καρκ.Κύτταρα	↑ σε κακοήθη όγκο & κυτ. σειρές	Δυσοίωση πρόγνωση
	5		↑ σε κακοήθη όγκο & κυτ. σειρές ↑ σε ορό & ασκитικό υγρό	Διάγνωση, Δυσοίωση πρόγνωση
	6		↑ σε κακοήθη όγκο & ορό	Διάγνωση, Δυσοίωση πρόγνωση, παρακολούθηση
	7	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο & κυτ. σειρές	Δυσοίωση πρόγνωση
	8		↑ σε κακοήθη όγκο & ορό	Διάγνωση, Ευνοϊκή πρόγνωση, παρακολούθηση
	9	Καρκ.Κύτταρα	ΜΔ	Ευνοϊκή πρόγνωση
	10		↑ σε κακοήθη όγκο & ορό	Διάγνωση, Δυσοίωση πρόγνωση, παρακολούθηση
	11	Καρκ.Κύτταρα	↑ σε κακοήθη όγκο & ορό	Διάγνωση, Ευνοϊκή πρόγνωση Δυσοίωση πρόγνωση
	13		↑ σε κακοήθη όγκο ↓ σε ορό	Ευνοϊκή πρόγνωση
	14	Καρκ.Κύτταρα	↑ σε κακοήθη όγκο & ορό ↓ σε κακοήθη όγκο	Διάγνωση, Ευνοϊκή πρόγνωση
	15	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	Δυσοίωση πρόγνωση
	2	Καρκ.Κύτταρα	↓ σε κακοήθη όγκο	Διάγνωση



Προστάτη	3	Καρκ.Κύτταρα	↓ σε κακοήθη όγκο	Διάγνωση, πρόγνωση, παρακολούθηση
	4		↑ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
	5	ΜΔ	↓ σε κακοήθη όγκο	Ευνοϊκή πρόγνωση
	6	ΜΔ	↓ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
	10	ΜΔ	↓ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
	11	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο & ορό	Διάγνωση, Ευνοϊκή πρόγνωση
	13		↓ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
	14		↑ σε κακοήθη όγκο ↓ σε κακοήθη όγκο	Δυσοίωνη πρόγνωση
	15	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	Δυσοίωνη πρόγνωση
Όρχεων	5	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	Ευνοϊκή πρόγνωση
	10	Καρκ.Κύτταρα	↓ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
	14	ΜΔ	↓ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ

Πίνακας 4.2: Μεταβολή της έκφρασης των καλλικρεϊνών σε ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους και πιθανή κλινική σημασία. ΜΔ: μη διευκρινισμένο↑: αύξηση,↓: μείωση της έκφρασης (στοιχεία από Borgono and Diamandis, 2004).

ΚΑΡΚΙΝΟΣ	hK/ KLK	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΕΚΦΡΑΣΗ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ
ΟΛΛ	10	ΜΔ	↓ εξαιτίας της μεθυλίωσης στα κύτταρα	Δυσοίωνη πρόγνωση
Πνέυμονα	11	ΜΔ	↑ στην υποομάδα C2 νευροενδοκρινών όγκων	Δυσοίωνη πρόγνωση, κυρίως στην υποομάδα C2
Παγκρέατος	1	Καρκ. Κύττ. Ινοβλάστες Ουδετερόφιλα Λεμφοκύτταρα	ΜΔ	ΜΔ
	6	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
	10	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	ΜΔ
Στομάχου	6	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	Δυσοίωνη πρόγνωση
Παχέως εντέρου	6	ΜΔ	↑ σε κακοήθη όγκο	Δυσοίωνη πρόγνωση
Κεφαλής & τραχήλου	10	ΜΔ	↑ στον τύπο όγκων 1	Δυσοίωνη πρόγνωση, κυρίως στον τύπο όγκων 1

Πίνακας 4.3: Μεταβολή της έκφρασης των καλλικρεϊνών σε μη ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους και πιθανή κλινική σημασία. ΟΛΛ: οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. ΜΔ: μη διευκρινισμένο↑: αύξηση,↓: μείωση της έκφρασης (στοιχεία από Borgono and Diamandis, 2004).

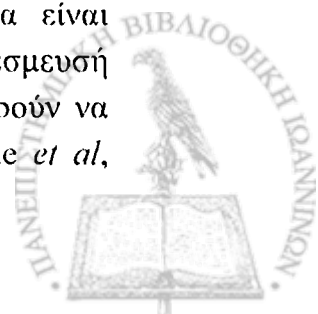
Η αύξηση της έκφρασης των καλλικρεϊνών που παρατηρείται σε πολλές μορφές καρκίνου δεν είναι γνωστό αν συνοδεύεται από αύξηση της πρωτεολυτικής τους ενεργότητας. Αυτό οφείλεται στην ετερογένεια των μορφών με τις οποίες μπορεί να εμφανίζονται οι πρωτεΐνες των καλλικρεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο (ενεργά ένζυμα, μη ενεργά προ-ένζυμα, ένζυμα προσδεδμεμένα σε σύμπλοκα αναστολής ή αδρανοποιημένα από εσωτερική διάσπαση, ή ακόμη διάφορες

ισομορφές των πρωτεϊνών που σχηματίζονται από προϊόντα εναλλακτικής μεταγραφής) και μεταξύ των οποίων δεν υπάρχει ακόμη η δυνατότητα διάκρισης. Η μοναδική μελέτη που υπάρχει δείχνει πως το μεγαλύτερο ποσοστό (80-90%) της hK3 στο ενδιάμεσο υγρό σε όγκους του προστάτη είναι ενζυματικά ενεργό (Denmeade *et al.*, 2001).-

4.8 Καλλικρεΐνες στη νεοπλασματική εξέλιξη

Η εκτεταμένη κλινική έρευνα που συσχετίζει την έκφραση των καλλικρεϊνών με την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο υποδεικνύει ότι τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στην καρκινική εξέλιξη. Αν και οι περισσότερες έρευνες συσχετίζουν την αυξημένη έκφραση των καλλικρεϊνών με δυσοίωνα πρόγνωση, κάποιες άλλες δείχνουν το αντίθετο. Το φαινομενικό αυτό παράδοξο ίσως οφείλεται στον διπλό ρόλο τους κατά την εξέλιξη του όγκου ως διεγερτικοί ή ανασταλτικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τα καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον τους διαφορετικά σε διάφορους ιστούς ή υπό τον έλεγχο διαφορετικών ορμονών. Πρόσφατες *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι η πρωτεολυτική δράση των καλλικρεϊνών στο εξωκυττάριο στρώμα παίζει κάποιο ρόλο σε πολλές πλευρές της καρκινικής εξέλιξης, όπως ρύθμιση της αύξησης των καρκινικών κυττάρων, αγγειογένεση, διείσδυση και μετάσταση. Ωστόσο, ο ακριβής τους ρόλος στην βιολογία του καρκίνου δεν έχει διευκρινιστεί.

Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι κάποιες hKs ίσως συμμετέχουν στην πρόωμη νεοπλασματική ανάπτυξη υποκινώντας ή αναστέλλοντας άμεσα ή έμμεσα τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Σχήμα 4.5α). Αναστολή της hK6, για παράδειγμα, μειώνει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων (Nagahara *et al.*, 2005). Οι hK2 και hK3 ίσως συμμετέχουν στη ρύθμιση του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (IGF) στον καρκίνο του προστάτη. Οι IGFs είναι μιτογόνα πεπτίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την εξαλλαγή. Για να δράσουν, πρέπει προηγουμένως να απελευθερωθούν από τις πρωτεΐνες που τις δεσμεύουν (IGF-binding proteins, IGFbps). Οι IGFbps είναι μία οικογένεια 6 πρωτεϊνών που ανταγωνίζονται τη δέσμευση των IGF στον υποδοχέα τους (IGF1R). Διαθέτουν ενδογενή βιοενεργότητα, ανεξάρτητη από τις IGF και IGF1R, ίσως δια μέσου κάποιου άλλου υποδοχέα, επάγοντας απόπτωση και αναστέλλοντας την αύξηση καρκινικών κυττάρων (Rajan *et al.*, 1997). Οι hK1, hK2 και hK3 αποικοδομούν τις IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4 και IGFBP5, με αποτέλεσμα να μειώνουν την έμφυτη ογκοκατασταλτική τους δράση και τη συγγενειά τους για τον IGF1, και οδηγούν σε αύξηση των φυσιολογικών, στρωματικών και καρκινικών κυττάρων του προστάτη *in vitro* (Cohen *et al.*, 1992, Rehault *et al.*, 2001, Sutkowski *et al.*, 1999). Επιπλέον, η hK3 μπορεί να διεγείρει την παραγωγή δραστικών ομάδων οξυγόνου σε καρκινικά κύτταρα προστάτη. Η δράση αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την πρωτεολυτική δράση του ενζύμου και ακολουθεί τη δέσμευσή του σε έναν μεμβρανικό υποδοχέα (Sun *et al.*, 2001). Οι hK2 και hK4 μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μονή αλυσίδα του uPA (Takayama *et al.*, 2001, Frenette *et al.*,



1997), ενώ η hK2 μπορεί να αδρανοποιήσει τον αναστολέα του, PAI1 (Mikolajczyk *et al*, 1999), προκαλώντας ενεργοποίηση του συστήματος του uPA. Με τους παραπάνω μηχανισμούς, οι καλλικρεΐνες μπορούν εμμέσως να εμπλέκονται στην καρκινική ανάπτυξη του προστατικού, ή πιθανώς και άλλων οργάνων, καρκίνου.

Οι καλλικρεΐνες όμως μπορούν να δρουν και αμέσως ως αυξητικοί παράγοντες, μέσω του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πρωτεάσες (Protease-Activated Receptor, PAR). Οι PARS είναι μια μικρή οικογένεια 4 υποδοχέων που αλληλεπιδρούν με τη G πρωτεΐνη και ενεργοποιούνται από τη διάσπαση ενός εξωκυτταρικού αμινοτελικού τμήματος από πρωτεάσες σερίνης, όπως θρομβίνη και θρυψίνη. Η διάσπαση αυτή αποκαλύπτει ένα κρυμμένο προσδεμένο μόριο, το οποίο αλληλεπιδρά με έναν εξωκυτταρικό βρόχο, διαβιβάζοντας ενδοκυτταρικά σήματα. Οι PARs εκφράζονται από πολλά καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος, των ενδοθηλιακών και μακροφάγων κυττάρων συμπεριλαμβανομένων (D'Andrea *et al*, 2001). Πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται στον όγκο, όπως η θρυψίνη, πιθανώς δρουν με αυτοκρινή τρόπο για να διεγείρουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων μέσω των PARs.

Κάποιες καλλικρεΐνες πιθανώς έχουν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η hK3 αναστέλλει την αύξηση κυτταρικών σειρών από καρκίνο του μαστού που εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, υποδεικνύοντας ότι αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή στα ορμόνο-εξαρτώμενα καρκινώματα του μαστού (Lai *et al*, 1996). Η υπόθεση αυτή συμβαδίζει με άλλες παρατηρήσεις ότι η έκφραση της είναι μειωμένη σε όγκους μαστού προχωρημένου σταδίου (Yu *et al*, 1996), ότι ασθενείς με hK3-θετικό όγκο του μαστού έχουν καλύτερη πρόγνωση (Yu *et al*, 1995) και ότι η hK3 μπορεί να ενεργοποιεί τον αυξητικό παράγοντα TGFβ, ο οποίος καταστέλλει την αύξηση και επάγει απόπτωση σε φυσιολογικά κύτταρα (Derjynck *et al*, 2001). Από την άλλη πλευρά, κάποιες μελέτες αμφισβητούν την ύπαρξη διεγερτικής ή ανασταλτικής δράσης της hK3, τουλάχιστον στον καρκίνο του προστάτη (Fortier *et al*, 1999, Denmeade *et al*, 2003). Αλλά και στην hK10 αποδίδεται πιθανή ογκοκατασταλτική δράση, κυρίως εξαιτίας της σημαντικής μείωσης της έκφρασής της σε πολλούς τύπους καρκίνου (μαστός, προστάτη, όρχεων και οξεία λυμφοβλαστική λευχαιμία) (Obiezu *et al*, 2005). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η hK10 καταστέλλει τον ογκογονικό φαινότυπο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Goyal *et al*, 1998).

Οι καλλικρεΐνες επίσης πιθανώς εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Αρκετές *in vitro* μελέτες υποδεικνύουν άμεση ή/και έμμεση συμμετοχή της οικογένειας (σχήμα 4.5β). Άμεσα, η υδρόλυση πρωτεϊνών του εξωκυτταρίου στρώματος από κάποιες καλλικρεΐνες διευκολύνει τη μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Cloutier *et al*, 2002, Weber *et al*, 1995, Bennett *et al*, 2002). Τον ίδιο στόχο εξυπηρετεί, έμμεσα, η ενεργοποίηση άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων (όπως των προ-MMP2 και προ-MMP9 από την hK1 ή του συστήματος uPA-uPAR από τις hK2 και hK4) (Tschesche *et al*, 1989, Desrivieres *et al*, 1999, Takayama *et al*, 2001, Frenette *et al*, 1997, Mikolajczyk *et al*, 1999), τα οποία αποικοδομούν συστατικά της βασικής μεμβράνης και του εξωκυτταρίου στρώματος, διευκολύνοντας

τη μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή την απελευθέρωση και ενεργοποίηση προσδεδμεμένων προ-αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων, όπως ο VEGF. Παράλληλα, η ενεργοποίηση του TGFβ από την hK3 ίσως συμμετέχει στην επαγωγή της αγγειογένεσης, ενώ οι κινίνες (βιολογικά δραστικά πεπτίδια που παράγονται από το κινινογόνο) που προκύπτουν από τη δράση της hK1 έχουν επίσης αγγειογενετική δράση (Emanuelli *et al*, 2001). Η πιθανή αλληλεπίδραση καλλικρεϊνών με PARs ίσως να έχει την ίδια δράση, όπως έχει ήδη φανεί με τη θρυψίνη.

Ανταγωνιστική προς την αγγειογένεση δράση έχει επίσης παρατηρηθεί για κάποιες καλλικρεϊνες. Οι hK3, hK6 και hK13 παράγουν μόρια ανάλογα της αγγειοστατίνης κατά την υδρόλυση του πλασμινογόνου *in vitro* (Heidmann *et al*, 1999, Bayes *et al*, 2004, Sotiropoulou *et al*, 2003). Η αγγειοστατίνη αναστέλλει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση *in vivo*. Επιπλέον, ανεξάρτητα από την πρωτεολυτική της δράση, η hK3 μπορεί να λειτουργήσει ως αντι-αγγειογενετική πρωτεΐνη, εμποδίζοντας τη δράση των αυξητικών παραγόντων FGF2 και VEGF (Fortier *et al*, 1999, 2003). Οι παρατηρήσεις αυτές συμπληρώνονται από μία κλινική μελέτη που έδειξε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της hK3 και της μέσης αγγειακής πυκνότητας, η οποία αποτελεί μέτρο της αγγειογένεσης *in situ*, στον καρκίνο του προστάτη (Paradopoulos *et al*, 2001).

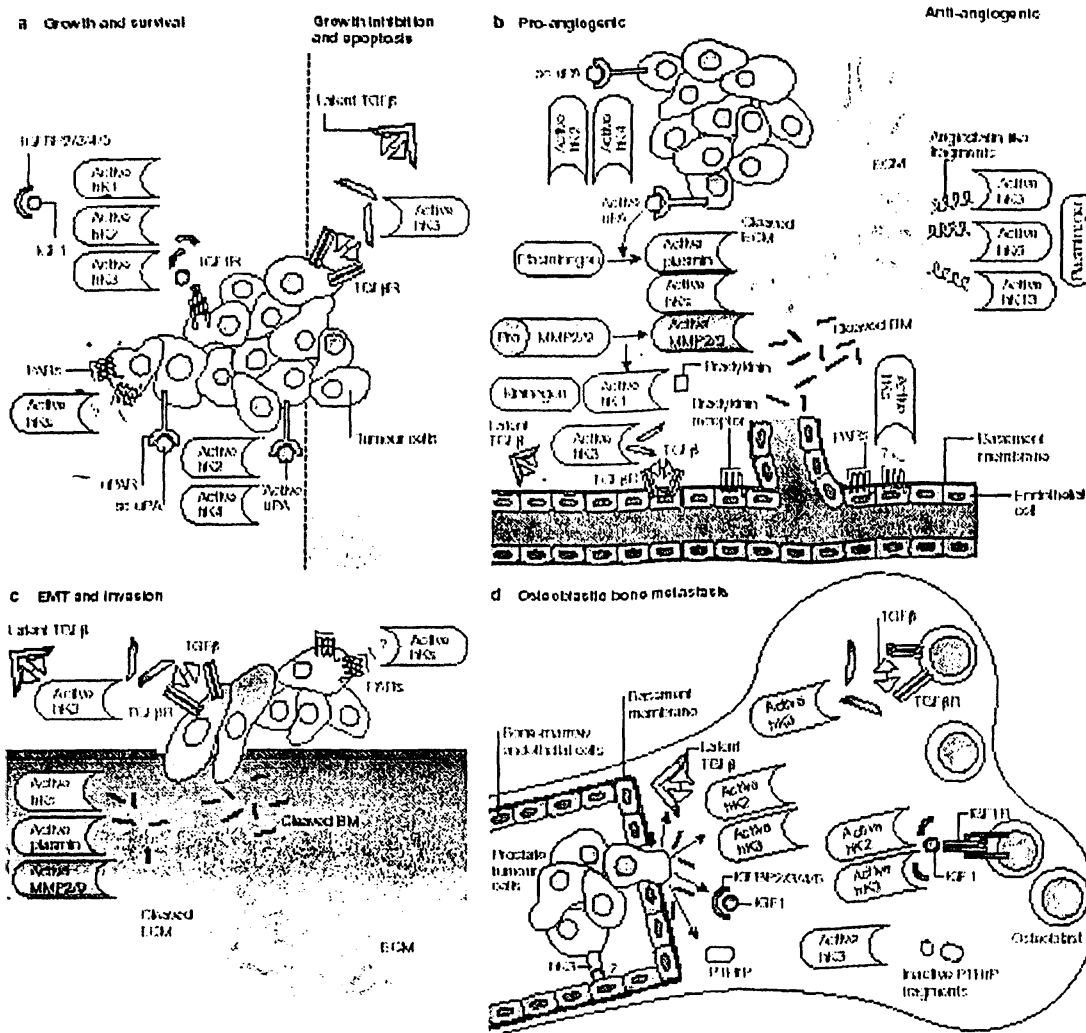
Οι καλλικρεϊνες συμμετέχουν σε πολλά στάδια της μεταστατικής ακολουθίας, διευκολύνοντας την αποκόλληση των κυττάρων του όγκου και τη διήθηση των εξωκυττάρων φραγμών ανεξάρτητα και σε συνεργασία με άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα και συνεισφέροντας, ενδεχομένως, στη μεταστατική εξάπλωση (Σχήμα 4.5γ). Για να αποκολληθούν, να διηθήσουν τους τοπικούς ιστούς και να κάνουν μετάσταση, τα καρκινικά κύτταρα υφίστανται μία επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial to mesenchymal transition, EMT), κατά τη διάρκεια της οποίας αποκτούν τον κακοήθη φαινότυπο. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από αλλαγές στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης, μεταξύ των οποίων απώλεια της διακυτταρικής πρόσφυσης που γίνεται με τη μεσολάβηση της E-καντερίνης και *de novo* έκφραση μεσεγχυματικών καντερινών, όπως η N-καντερίνη, η οποία προάγει την κυτταρική κινητικότητα και μετανάστευση. Καθώς ο TGFβ επάγει τη μετάβαση αυτή, η hK3 πιθανώς να εμπλέκεται στην προαγωγή της διακυτταρικής αποκόλλησης και του διηθητικού φαινοτύπου, δια μέσου της ενεργοποίησης του αυξητικού παράγοντα (Derynck *et al*, 2001, Killian *et al*, 1993). Αλλά και η πρωτεολυτική δράση των καλλικρεϊνών στο εξωκυττάριο στρώμα φαίνεται να συμβάλει στη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων. Εκτός από τις μελέτες που δείχνουν άμεση ή έμμεση συμμετοχή των καλλικρεϊνών στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του εξωκυττάρου στρώματος, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις και για το ρόλο τους στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, έχει δείχθει ότι αναστολή των hK6, hK3 και hK1 προκαλεί μείωση της διείσδυσης *in vitro* και *ex vivo* καρκινικών κυττάρων στομάχου, προστάτη και μαστού αντίστοιχα (Nagahara *et al*, 2005, Webber *et al*, 1995, Wolf *et al*, 2003, Ishii *et al*, 2004). Αντίθετα, οι Fortier και συνεργάτες (1999) έχουν δείξει μείωση της μετάστασης στον καρκίνο του πνεύμονα *in vivo* από την hK3. Η αντι-



μεταστατική αυτή δράση ίσως να οφείλεται στην αντι-αγγειογενετική δράση της hK3, η οποία είναι ανεξάρτητη της πρωτεολυτικής της ιδιότητας. Η αντι- ή προ-μεταστατική δράση του ενζύμου αυτού *in vivo* ίσως να εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου ή τους παράγοντες που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

Αρκετές ενδείξεις υπάρχουν επίσης για το ρόλο των καλλικρεϊνών στις οστεοβλαστικές μεταστάσεις που εμφανίζονται στο 90% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη (σχήμα 4.5δ). Η επιλεκτική μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στα οστά επηρεάζεται από μία σειρά διαλυτών και αδιάλυτων παραγόντων στα μικροπεριβάλλοντα του πρωτογενούς όγκου, της κυκλοφορίας και του οστού (π.χ. χημειοτακτικοί παράγοντες) καθώς και από την επιλεκτική προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη στα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών. Φαίνεται ότι η hK3 είναι διαμεσολαβητής αυτής της κυτταρικής αλληλεπίδρασης (Romanov *et al*, 2004), ενώ παράλληλα μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό και ενεργοποίηση οστεοβλαστών. Η λειτουργία αυτή της hK3 μπορεί να επιτυγχάνεται έμμεσα, δια μέσου της ενεργοποίησης του TGFβ, άμεσα, με τροποποίηση επιφανειακών υποδοχέων, ή από κάποιον μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος από τους αυξητικούς παράγοντες που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Yonou *et al*, 2001). Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον IGF από αρκετές καλλικρεΐνες, αλλά και η πέψη και απενεργοποίηση μιας σχετιζόμενης με την παραθορμόνη πρωτεΐνης, η οποία λειτουργεί ως ενεργοποιητής των οστεοκλαστών (Iwamura *et al*, 1996, Cramer *et al*, 1996), αποτελούν λειτουργίες των καλλικρεϊνών που πιθανώς σχετίζονται με τις οστικές μεταστάσεις του καρκίνου του προστάτη.





Σχήμα 4.5: Πιθανοί ρόλοι των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών στην καρκινική ανάπτυξη.

4.9 Ρύθμιση των καλλικρεϊνών στον καρκίνο

Η διαφορετική έκφραση των γονιδίων των καλλικρεϊνών που παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνου μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς μηχανισμούς. Καθώς το χρωμόσωμα 19q13 υφίσταται αλλοιώσεις σε διάφορους όγκους, οι γενετικές ανωμαλίες θα μπορούσαν να αποτελούν ένα τέτοιο μηχανισμό. Για παράδειγμα, επέκταση του γονιδίου *KLK6* ίσως ευθύνεται εν μέρει για την αυξημένη του έκφραση στον καρκίνο των ωθηκών (Ni *et al*, 2004). Άλλες γενετικές ανωμαλίες δεν έχουν παρατηρηθεί στις ούτως ή άλλως λίγες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα.

Αλλαγές στη μεταγραφή, εξαιτίας γενετικών πολυμορφισμών, επιγενετικών μεταβολών ή αλλαγών σε *trans* μεταγραφικούς παράγοντες, αποτελούν την πιθανότερη αιτία της διαφορετικής έκφρασης των καλλικρεϊνών στους όγκους (Borgono and Diamandis, 2004). Στις κωδικές περιοχές και τις περιοχές υποκινητή/ενισχυτή των γονιδίων της οικογένειας υπάρχει μία σειρά γενετικών πολυμορφισμών, κυρίως μονού νουκλεοτιδίου (SNPs). Οι πολυμορφισμοί αυτοί επηρεάζουν τη μεταγραφική ρύθμιση ή εισφέρουν αυξημένη ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στον καρκίνο. Για παράδειγμα, ασθενείς με καρκίνο του μαστού που



είναι ομόζυγοι για το νουκλεοτίδιο G στην περιοχή -158 του υποκινητή του γονιδίου KLK3 παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση της hK3 και αυξημένη ολική επιβίωση σε σχέση με εκείνους που είναι ομόζυγοι για το νουκλεοτίδιο A (Bharaj *et al*, 2000), ενώ ένας μη συνώνυμος πολυμορφισμός (C→T) στο εξόνιο 3 του γονιδίου KLK10 προκαλεί αλλαγή ενός αμινοξέως αλανίνης σε σερίνη και έχει συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη (Bharaj *et al*, 2002).

Ένας άλλος μηχανισμός που έχει αναφερθεί στη μείωση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 10 σε διάφορους καρκίνους είναι η επιγενετική σίγαση μέσω μεθυλίωσης του DNA. Η μεθυλίωση του DNA που σχετίζεται με τον καρκίνο συμβαίνει συνήθως στις νησίδες CpG εντός του υποκινητή. Τέτοιες νησίδες δεν υπάρχουν στον εγγύς υποκινητή, ωστόσο μεθυλίωση μεμονωμένων CpG δινουκλεοτιδίων και αλληλουχιών CC(A/T)GG σε αυτή την περιοχή αρκεί για να μεταβάλλει την μεταγραφή του KLK10 στον καρκίνο (Li *et al*, 2001, Roman-Gomez *et al*, 2004).

Trans ρυθμιστικοί παράγοντες ίσως να παίζουν επίσης ρόλο στην αλλαγή της έκφραση των καλλικρεΐνων στην κακοήθεια. Διαφορικά επίπεδα του συνεργοποιητή του υποδοχέα ανδρογόνων SRC1 έχουν συσχετισθεί σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου KLK3 που είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται από ανδρογόνα (Magklara *et al*, 2002). Επιπλέον, ανωμαλία ή απώλεια της λειτουργίας trans παραγόντων ίσως ευθύνεται μερικώς για την μείωση της έκφρασης του KLK10 mRNA σε μία ομάδα καρκίνων μαστού, εκτός από την επιγενετική σίγαση μέσω υπερμεθυλίωσης (Li *et al*, 2001).

Πολλές επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες εμπλέκουν τις στεροειδείς ορμόνες στην αιτιολογία των ορμονο-εξαρτώμενων καρκίνων, όπως του μαστού, των ωοθηκών και του προστάτη. Οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν την έκφραση πολλών αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι, εν συνεχεία, μεταφέρουν σήματα ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Καθώς η έκφραση των καλλικρεΐνων ελέγχεται επίσης από τις ορμόνες αυτές, ίσως τα μόρια αυτά αποτελούν στόχους μέσω των οποίων οι ορμόνες ρυθμίζουν την εξέλιξη του όγκου (Borgono and Diamandis, 2004).

4.10 Κλινικές εφαρμογές των καλλικρεΐνων

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τις καλλικρεΐνες είχαν ως αντικείμενο τη διερεύνηση του πιθανού τους ρόλου ως καρκινικών δεικτών. Πράγματι, φαίνεται πως η οικογένεια αυτή μπορεί να αποτελέσει πολύτιμη πηγή δεικτών, ιδιαίτερα για ορμόνο-εξαρτώμενους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη, του μαστού, των ωοθηκών και των όρχεων (πίνακας 2) (Obiezu and Diamandis, 2005).

Ένα μέλος της οικογένειας, η hK3, αποτελεί σήμερα τον πιο αξιόπιστο δείκτη στην κλινική Ιατρική για τη διάγνωση, τη σταδιοποίηση και την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη (Stamey *et al*, 1987). Δυστυχώς όμως, δεν παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Για το λόγο αυτό, έχει μελετηθεί η αξία διαφόρων παραμέτρων της μέτρησης της hK3, (π.χ. διαφορετικά όρια αναφοράς ανά ηλικιακή ομάδα, μέτρηση διαφόρων σταδίων της πρωτεΐνης, όπως προ-hK3, ενεργό ένζυμο ή προϊόντα διάσπασης, μέτρηση της δεσμευμένης με αναστολείς

πρωτεΐνης κ.α.), χωρίς ιδιαίτερο αποτέλεσμα. Οι καλλικρεΐνες 2 και 11 μπορούν να λειτουργήσουν συμπληρωματικά προς την hK3 (Stenman, 1999, Diamandis *et al*, 2002, Nakamura *et al*, 2003). Στον καρκίνο των ωοθηκών, οι καλλικρεΐνες 5, 6, 8, 10, 11 και 14 ίσως παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω των αυξημένων επιπέδων τους στον ορό κάποιων υπο-ομάδων ασθενών (Yousef *et al*, 2003, Diamandis *et al*, 2000, Kishi *et al*, 2003, Luo *et al*, 2003, Diamandis *et al*, 2002, Borgono *et al*, 2003). Είναι αξιοσημείωτο ότι η μέτρηση των καλλικρεϊνών 6 και 10 μπορεί να αυξήσει τη διαγνωστική ευαισθησία του καρκινικού αντιγόνου 125 (CA125) σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο (I/II) καρκίνου των ωοθηκών (Luo *et al*, 2003, Diamandis *et al*, 2003). Στον πίνακα X παρουσιάζεται η σχέση της έκφρασης των καλλικρεϊνών σε επίπεδο mRNA ή πρωτεΐνης με την πρόγνωση για τον ασθενή.

Δυστυχώς, κανένας μεμονωμένος δείκτης δεν μπορεί να διαγνώσει τον καρκίνο ή να προβλέψει την εξέλιξη της νόσου με απόλυτη αξιοπιστία. Η σύγχρονη τάση της επιστήμης είναι η αξιοποίηση της συνολικής διαγνωστικής/προγνωστικής αξίας που παρέχουν διάφοροι δείκτες με εφαρμογή πολυπαραγοντικών αλγορίθμων, όπως είναι τα τεχνητά νευρονικά δίκτυα. Οι καλλικρεΐνες είναι μόρια που πιθανώς μπορούν να ενταχθούν σε τέτοιες ομάδες δεικτών που θα παρέχουν πολύ πιο ευαίσθητη και εξειδικευμένη πληροφορία από ό,τι μεμονωμένα μόρια.

Δεδομένου του ρόλου των καλλικρεϊνών στην εξέλιξη του καρκίνου, θα μπορούσε η υποοικογένεια αυτή να αντιπροσωπεύει μία νέα, πολλά υποσχόμενη πηγή πιθανών θεραπευτικών στόχων. Έχουν ήδη προταθεί κάποιες προσεγγίσεις για τη μελέτη της πιθανής θεραπευτικής τους αξίας, που βασίζονται κυρίως στην αναστολή ή τον έλεγχο της ενεργότητας και της ειδικότητας τους σε διάφορους ιστούς. Μία τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η σχεδίαση νέων μορίων σερπινών που θα αναστέλλουν πολύ ειδικά τις καλλικρεΐνες. Οι σερπίνες είναι ενδογενείς πρωτεΐνες του οργανισμού και, ως εκ τούτου, οι τροποποιημένες ανασυνδυασμένες μορφές τους αναμένεται να παρουσιάζουν μικρότερη τοξικότητα ή ανοσογονικότητα και χαμηλότερο ρυθμό απομάκρυνσης από το σώμα σε σχέση με τους μικρούς χημικούς αναστολείς. Ο Cloutier πρόσφατα περιέγραψε μία νέα μέθοδο ανάπτυξης ειδικών για την hK2 σερπινών, με αντικατάσταση της αλληλουχίας που κανονικά διασπάται από την α₁-ACT στη δραστικής θέσης του βρόχου τους από ένα πενταπεπτίδιο που αναγνωρίζεται από την hK2 (Cloutier *et al*, 2004).

Μία άλλη θεραπευτική προσέγγιση, που αξιοποιεί την ενεργότητα και/ή την ιστοειδικότητα των καλλικρεϊνών, θα μπορούσε να βασίζεται στην ανάπτυξη προ-φαρμάκων που να ενεργοποιούνται από τη δράση των ενζύμων αυτών, στην εισαγωγή τοξικών γονιδίων υπό τον έλεγχο των ίδιων υποκινητών/ενισχυτών, ή σε ανοσοθεραπεία με εμβόλια κατά των καλλικρεϊνών. Για παράδειγμα, έχουν κατασκευασθεί μερικοί κυτταροτοξικοί παράγοντες (όπως δοξορουβικίνη, βινμπλαστίνη) ως προ-φάρμακα, που περιέχουν ένα πεπτίδιο στη λανθάνουσα μορφή τους. Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται με το υπόλοιπο μόριο με μία αλληλουχία που διασπάται από την hK3, απελευθερώνοντας τη δραστική ουσία. Η αυστηρά ειδική έκφραση της hK3 στον καρκίνο του προστάτη έχει ως αποτέλεσμα τα φάρμακα να ενεργοποιούνται μόνο στην περιοχή του συγκεκριμένου καρκίνου, καταστρέφοντας



τα καρκινικά κύτταρα και αναστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου, προκαλώντας μικρή σχετικά τοξικότητα (Denmeade *et al*, 1998, DeFeo-Jones *et al*, 2002, Denmeade *et al*, 2003). Ένας άλλος τρόπος ενεργοποίησης του προ-φαρμάκου περιλαμβάνει την εισαγωγή στο καρκινικό κύτταρο ικών ή μη ικών φορέων (π.χ. αδενοϊών ή λιποσωμάτων, αντίστοιχα) που περιέχουν ένα γονίδιο το οποίο, υπό τον έλεγχο του ειδικού προστατικού υποκινητή/ενισχυτή για την hK3, παράγει το ένζυμο που θα ενεργοποιήσει το προφάρμακο (Latham *et al*, 2000, Suzuki *et al*, 2001). Τέλος, η ανάπτυξη εμβολίων αποτελεί μια πιθανή θεραπευτική αντιμετώπιση. Έχουν ήδη διεξαχθεί κλινικές μελέτες φάσης I για την αξιολόγηση εμβολίων που περιέχουν ανασυνδυασμένους ιούς που εκφράζουν την hK3 (Eder *et al*, 2000) ή δενδριτικών κυττάρων διαμολυσμένων με το mRNA της KLK3 (Heiser *et al*, 2001), σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη ή ασθενείς που έχουν υποστεί προστατεκτομή αλλά παρουσιάζουν υποτροπή. Τα εμβόλια αυτά ήταν ικανά να διεγείρουν τα T-κύτταρα, χωρίς σοβαρή τοξικότητα ή άλλες παρενέργειες.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΣΤΙΚΗ

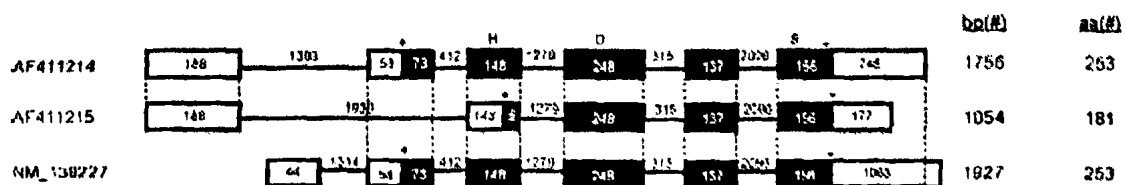
ΚΑΛΙΚΡΕΪΝΗ 7



Η ανθρώπινη ιστική καλλικρεΐνη 7 (hK7, HSCCE, Human Stratum Corneum Cyymotryptic Enzyme) ανακαλύφθηκε αρχικά στην κεράτινη στιβάδα (stratum corneum) κατά τη μελέτη ενός *in vitro* μοντέλου απολέπισης στην πελματική κεράτινη στιβάδα του ανθρώπου (Lundström and Egelrud, 1990, Egelrud, 1991, Lundström and Egelrud, 1991). Τότε περιγράφηκε ως πρωτεάση του τύπου της χυμοθρυψίνης που πιθανώς εμπλέκεται στη διαδικασία απολέπισης. Ανήκει στην οικογένεια των καλλικρεΐνων, το δε γονίδιό της, όπως και το γονίδιο της KLK5, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε από cDNA βιβλιοθήκη κερατινοκυττάρων (Egelrud, 1993, Hansson *et al*, 1994, Brattsand and Egelrud, 1999). Η hK7 αποτελεί μία από τις ελάχιστες καλλικρεΐνες για τις οποίες έχει προταθεί ένας ρόλος στη φυσιολογία του υγιούς ατόμου. Συγκεκριμένα, συμμετέχει στην κατάλυση των διακυτταρικών συνεκτικών δομών στο εξώτερο στρώμα του δέρματος, συνεισφέροντας στην απόρριψη των κυττάρων και την ανανέωση της επιφάνειας της επιδερμίδας. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ή έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε διάφορους τύπους καρκίνου πρόγνωση για τους ασθενείς.

5.1 Γονίδιο KLK7: Οργάνωση, Ρύθμιση, Προϊόντα Συρραφής

Γονίδιο (Genbank NM_005046). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των καλλικρεΐνων, η KLK7 χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη περισσοτέρων του ενός προϊόντων εναλλακτικής συρραφής του hnRNA. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 3 μετάγραφα της KLK7 (Yousef *et al*, 2000, Dong *et al*, 2003, Σχήμα 5.1). Ένα μετάγραφο της KLK7 περιέχει μία εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης, η οποία βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης. Εάν όμως μεταφράζεται αυτό το μετάγραφο, παράγει πολυπεπτίδιο χωρίς αμινοτελικό πεπτίδιο σήμανσης και χωρίς το κατάλοιπο ιστιδίνης που συμμετέχει στο σχηματισμό της καταλυτικής τριάδας της hK7. Τα άλλα δύο μετάγραφα διαφέρουν ως προς το πρώτο (μη κωδικό) εξόνιο και το μήκος της 3'-αμετάφραστης περιοχής. Για το μετάγραφο με τη μακρύτερη 3'-αμετάφραστη περιοχή έχει προταθεί κλινικός/διαγνωστικός ρόλος στον καρκίνο των ωοθηκών (Dong *et al*, 2003).



Σχήμα 5.1: Τα mRNA μετάγραφα για το γονίδιο της ανθρώπινης καλλικρεΐνης 7 (KLK7). Πρώτη αναφέρεται η πρωτογενής μορφή. Αναφέρεται ο αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα δεδομένων Genbank, ο αριθμός βάσεων του μεταγράφου, καθώς και ο αριθμός αμινοξέων του προβλεπόμενου πολυπεπτιδίου που θα προέκυπτε από την μετάφραση του μεταγράφου. Τα κουτιά αντιπροσωπεύουν εξόνια, με τις κωδικές περιοχές με μαύρο χρώμα. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν εσόνια και οι αριθμοί δείχνουν το μήκος εξονίων και εσονίων σε ζεύγη βάσεων. * Κωδικόνιο έναρξης και ▼ λήξης της μετάφρασης. H,D,S: ιστιδίνη, σερίνη και ασπαραγικό οξύ που σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα του ενζύμου (Kurlender *et al*, 2005).

5.2 Πρωτεΐνη hK7

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της KLK7 περιλαμβάνει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για ένα ανενεργό προένζυμο 253 αμινοξέων. Το προένζυμο ενεργοποιείται κατόπιν πρωτεολυτικής απομάκρυνσης ενός πεπτιδίου 7 αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο.

Η hK7 αναστέλλεται από των αναστολέα πρωτεασών αντιλευκοπροτεάση (Franzke *et al*, 1996) και το ρετινοϊκό οξύ (Egelrud *et al*, 1993). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε η δυνατότητα αναστολής από έναν άλλο αναστολέα, τον LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor) (Egelrud *et al*, 2005, Schechter *et al*, 2005)

5.3 Φυσιολογική κατανομή και λειτουργία

Η καλλικρεΐνη 7 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς του φυσιολογικού οργανισμού, κυρίως στο δέρμα, αλλά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στα νεφρά, στο μαστικό αδένα, στο θύμο αδένα και στους σιελογόνους αδένες (Yousef *et al*, 2000b).

Η επιδερμίδα είναι το πιο επιφανειακό στρώμα του δέρματος και προσφέρει το πρώτο φράγμα για την προστασία του σώματος από την εισβολή ξένων παραγόντων. Αποτελείται από κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Σχηματίζεται από πέντε διαφορετικά στρώματα. Η κεράτινη στιβάδα είναι το εξώτερο στρώμα από αυτά, αποτελεί δηλαδή το στρώμα που καλύπτει το ανθρώπινο σώμα. Η κεράτινη στιβάδα αποτελείται από νεκρά κύτταρα και είναι πλούσια σε κερατίνη, μια πρωτεΐνη που την καθιστά στεγνή και υδατοστεγή (Vivier, 1997). Τα κερατινοκύτταρα προέρχονται από τη βασική στιβάδα της επιδερμίδας, όπου βρίσκονται τα αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα που διαιρούνται συνεχώς. Τα νεαρά κύτταρα που σχηματίζονται από τα αρχέγονα σταδιακά διαφοροποιούνται και παράλληλα ωθούνται προς την επιφάνεια της επιδερμίδας. Μεταξύ τους αναπτύσσονται δεσμοσώματα, που αυξάνουν τη συνοχή τους και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην μηχανική αντίσταση του δέρματος. Καθώς όμως τα θυγατρικά κύτταρα ωθούνται προς την επιφάνεια από τα νέα κύτταρα που παράγονται συνεχώς, απομακρύνονται από την πηγή των θρεπτικών και κερατινοποιούνται. Οι δύο αυτές διαδικασίες προκαλούν σταδιακά τον εκφυλισμό και τη νέκρωσή τους, ενώ παράλληλα απελευθερώνονται πρωτεολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν τις συνεκτικές δομές. Έτσι, καθώς τα νεκρά κύτταρα ωθούνται προς την επιφάνεια, αποικοδομούνται τα δεσμοσώματα και τα κύτταρα διαχωρίζονται και απομακρύνονται, μία διεργασία που καλείται απολέπιση. Η απολέπιση είναι μία φυσιολογική διαδικασία, που εξασφαλίζει την ανανέωση του δέρματος (Egelrud, 2000). Η απώλεια ελέγχου αυτής της διαδικασίας προκαλεί ανεξέλεγκτη, παθολογική απολέπιση του δέρματος και δερματική φλεγμονή, που ευθύνονται για τα συμπτώματα που εμφανίζονται σε σοβαρές δερματικές παθήσεις, όπως το σύνδρομο Netherton (ichthiosis linearis circumflexa περισπώμενη γραμμική ιχθύωση), η ψωρίαση, η ατοπική δερματίτιδα κ.α.



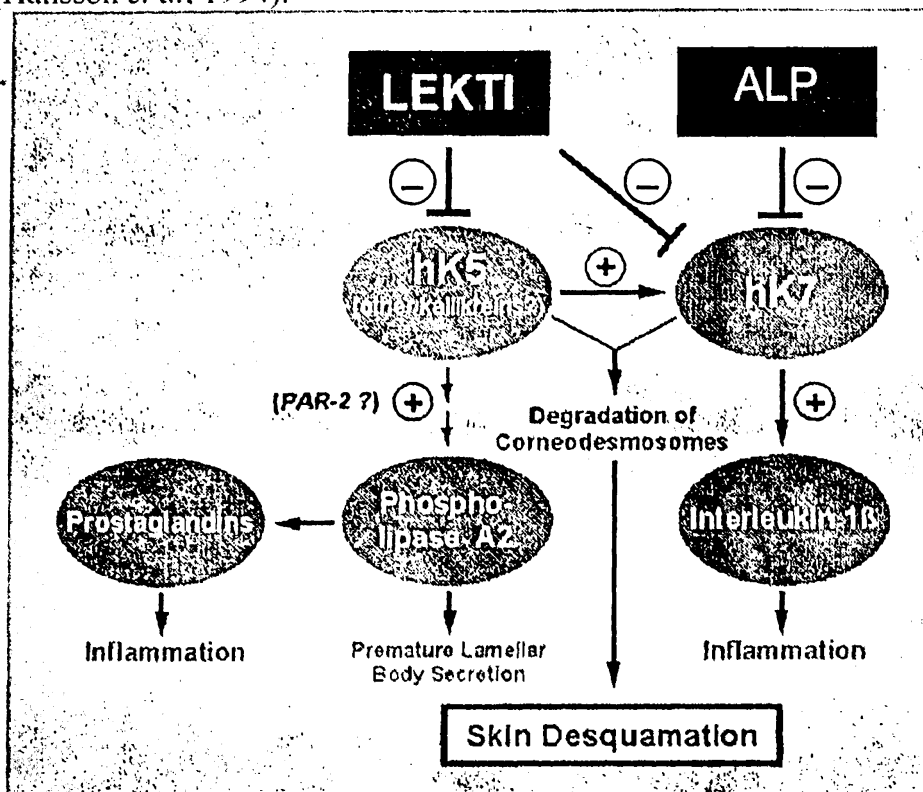
Σήμερα θεωρείται ότι η hK7, μαζί με την hK5, και πιθανώς άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική διαδικασία της αποικοδόμησης των κερατινο-δεσμοσωμάτων και της απολέπισης. Τα δύο ένζυμα συνεκφράζονται στην επιδερμίδα και παρουσιάζουν την υψηλότερη έκφραση στο πλακώδες επιθήλιο της επιδερμίδας που υφίσταται κερατινοποίηση (Eckholm and Egelrud, 2000b, Sondel *et al*, 1994, Brattsand and Egelrud, 1999, Simon *et al*, 2001). Η hK7 εκφράζεται επίσης στην κοκκώδη στιβάδα και τα εξαρτήματα του δέρματος (Komatsu *et al*, 2005). Η hK7 μεταφέρεται στον εξωκυττάριο χώρο δια των ελασματοειδών σωματίων (Sondel *et al*, 1995), όπου μαζί με την hK5 συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών των δεσμοσωμάτων, όπως η δεσμογλεϊνη και η κορνεοδεσμοσίνη (Egelrud, 2000, Simon *et al*, 2001, Caubet *et al*, 2004).

Όμως, εκτός από τη φυσιολογική διαδικασία της απολέπισης, η hK7 εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις του δέρματος. Έτσι, ίσως να μετατρέπει την πρόδρομη μορφή της ιντερλευκίνης-1β, μίας προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης, στην ενεργή της μορφή (Eckholm and Egelrud, 1999). Επίσης, αυξάνεται η έκφρασή της στο δέρμα ασθενών με ατοπική δερματίτιδα και ψωρίαση (Hansson *et al*, 2005, Komatsu *et al*, 2005b)

Η hK7 παράγεται ως ανενεργό προένζυμο και ενεργοποιείται από ένζυμα με δραστηριότητα θρυψίνης (Brattsand *et al*, 2005, Caubet *et al*, 2004). Έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται *in vitro* από την hK5, η οποία, πιθανώς αποτελεί και τον φυσιολογικό ενεργοποιητή της (Eckholm and Egelrud, 2000b, Brattsand *et al*, 2005). Η αντιλευκοπροτεάση (εκκρινόμενος αναστολέας πρωτεασών των λευκοκυττάρων), η ελαφίνη (αντιλευκοπροτεάση που παράγεται στο δέρμα) και ανασταλτικά πεπτίδια που παράγονται από την οικογένεια αναστολέων πρωτεασών σερίνης τύπου kazal ρυθμίζουν πιθανώς την ενεργότητα των καλλικρεϊνών στην επιδερμίδα του δέρματος (Komatsu *et al*, 2003). Πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν ότι η καλλικρεϊνή 7, όπως και η καλλικρεϊνή 5, αναστέλλονται *in vitro* από τον τομέα 6 του ανθρώπινου αναστολέα πρωτεασών σερίνης LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type-related Inhibitor) (Schechter *et al*, 2005, Egelrud *et al*, 2005). Ο LEKTI παρουσιάζει 15 τομείς, εκφράζεται σε αρκετά από τα στρώματα του δέρματος και έχει εμπλακεί σε δερματικές παθήσεις (Mägert *et al*, 2002, Bitoun *et al*, 2003). Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στο γονίδιο SPINK5, που κωδικοποιεί για το LEKTI, προκαλούν το σύνδρομο Netherton, το οποίο χαρακτηρίζεται από ατελή κερατινοποίηση, αλλά και ατοπική δερματίτιδα ή άσθμα (Chavanas *et al*, 2000, Walley *et al*, 2001, Kabesch *et al*, 2004). Οι hK5, hK7 και ο LEKTI εκφράζονται παράλληλα στα επιδερμικά κύτταρα (Komatsu *et al*, 2002, 2003). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένα νέο μέλος της οικογένειας αναστολέων πρωτεασών της α2-μακροσφαιρίνης (α2M), η α2M1.1 (α2-Macroglobulin-Like 1), που μπορεί να προσδέεται στην hK7, και είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανιχνεύεται στην επιδερμίδα, καθώς παράγεται στα κερατινοσώματα της κοκκώδους στιβάδας και εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μεταξύ αυτής και της κεράτινης στιβάδας (Galliano *et al*, 2006). Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποδίδουν στην καλλικρεϊνή 7 κεντρικό ρόλο στη φυσιολογική

διαδικασία της απολέπισης και διάφορες παθολογικές καταστάσεις του δέρματος, ενώ ενισχύουν την άποψη που υποστηρίζει ότι αποτελεί μέρος ενός πρωτεολυτικού καταρράκτη, στον οποίο πιθανώς συμμετέχουν περισσότερες καλλικρεΐνες (Σχήμα 5.2).

Ανάσυνδασμένη hK7 διασπάται *in vitro*, ίσως από αυτοπρωτεολυτικό μηχανισμό (Hansson *et al.*, 1994).



Σχήμα 5.2: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της hK7 και άλλων καλλικρεΐνών στη διαδικασία της απολέπισης του δέρματος και της φλεγμονής. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να εξελιχθούν σε παθολογικές, όταν υπάρχει απώλεια της αρνητικής ρύθμισης. Η hK7, κάτω από τον έλεγχο των αναστολέων LEKTI και ALP και ενεργοποιούμενη από την hK5 και πιθανώς άλλα ένζυμα με δραστηριότητα θρυψίνης, αποικοδομεί πρωτεΐνες των δεσμοσωμάτων, οδηγώντας τα κερατινοκύτταρα σε απολέπιση. Με την ενεργοποίηση της ιντερλευκίνης-1β, συμμετέχει στη διαδικασία της φλεγμονής. Η hK5 ή άλλα ένζυμα θρυψίνης, πιθανώς ενεργοποιούν επίσης τη φωσφολιπάση A2, η οποία οδηγεί στη σύνθεση προσταγλανδινών, οι οποίες συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση, και την έκκριση πρώιμων ελασματοειδών σωμάτων. Η διαδικασία αυτή ίσως επιτυγχάνεται δια μέσου του ενεργοποιούμενου από πρωτεάσες υποδοχέα 2 (PAR-2) και G-πρωτεϊνών.

5.4 Καλλικρεΐνη 7 και καρκίνος

Η καλλικρεΐνη 7, όπως και άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεΐνών, παρουσιάζει διαφορετική έκφραση σε επίπεδο mRNA ή πρωτεΐνης σε διάφορους τύπους καρκίνου. Περισσότερα δεδομένα υπάρχουν για τη συσχέτιση της έκφρασής της με ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους που σχετίζονται με το φύλο. Η πρώτη ένδειξη ότι σχετίζεται με την κακοήγη ανάπτυξη προήλθε από την παρατήρηση της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου σε καρκινικούς ιστούς ωοθηκών, σε σύγκριση με ιστό από φυσιολογικές ωοθήκες. Η αύξηση παρατηρήθηκε σε όλους τους υποτύπους



(ορώδες, βλεννώδες, ενδομητριάδες, clear cell) και στάδια καρκινώματος (Tanimoto *et al*, 1999) και είναι συντονισμένη στον καρκίνο των ωοθηκών με τον αναστολέα πρωτεασών αντιλευκοπρωτεάση (Shigemasa *et al*, 2001). Ακόμη ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί εάν η KLK7 και η ALP παρουσιάζουν κοινό χωρικό και χρονικό πρότυπο έκφρασης. Πρόσφατα, η έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 συσχετίστηκε με δυσοίωση πρόγνωση για ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών (Kyriakopoulou *et al*, 2003, Dong *et al*, 2003, Yousef *et al*, 2003), ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφρασή της σε αυτόν τον καρκίνο είναι συντονισμένη με την έκφραση της hK5 (Dong *et al*, 2003). Σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η έκφραση της KLK7 σχετίζεται με μικρότερη ολική και ελευθέρα νόσου επιβίωση (Taliari *et al*, 2004), ενώ, επιπλέον, έχει βρεθεί διαφορετική έκφραση της σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και συσχέτιση με τη μεταστατική συμπεριφορά του καρκίνου αυτού (Santin *et al*, 2004). Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η καλλικρεΐνη 7 πιθανώς εμπλέκεται στην εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει διαφορετική έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε μη ορμονοεξαρτώμενους τύπους καρκίνου, όπως παγκρέατος και παχέως εντέρου (Yousef *et al*, 2004), όπου οι πρώτες *in silico* μελέτες δείχνουν αύξηση της έκφρασης της. Φαίνεται όμως ότι αυτό δεν ισχύει σε όλους τους τύπους καρκίνου, καθώς στον πνεύμονα υπάρχουν ενδείξεις ότι η KLK7 ίσως αποτελεί δείκτη καλής πρόγνωσης. Στην υπόθεση αυτή οδηγεί η παρατήρηση ότι μειώνεται η έκφραση της σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα (Planque *et al*, 2005). Πιθανώς η ρύθμιση του γονιδίου σε αυτούς τους όγκους να υπόκειται σε διαφορετική ρύθμιση από ότι στους ορμόνο-εξαρτώμενους τύπους καρκίνου.

Η πρακτικά αποκλειστική έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στην κεράτινη στιβάδα του υγιούς οργανισμού, σε συνδυασμό με την αυξημένη της έκφραση σε κάποιους τύπους καρκίνου έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι η πρωτεάση αυτή ίσως να έχει αξία ως βιοδείκτης ή θεραπευτικός στόχος για αυτές τις νόσους. Έχει προταθεί ότι η hK7 ίσως να εμπλέκεται στην εξάπλωση ή μετάσταση του όγκου με μία διαδικασία που είναι παρόμοια με τη φυσιολογική της λειτουργία στην αποκόλληση και απολέπιση των κερατινοκυττάρων. Χαρακτηριστικό είναι ότι διεισδυτικά κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών παράγουν την hK7 (Dong *et al*, 2003). Η έκφρασή της ίσως προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα ένα μηχανισμό αποκοπής τους από τον όγκο (Tanimoto *et al*, 1999), μία υπόθεση που συμφωνεί με το σχηματισμό περιτοναϊκών μεταστάσεων από κύτταρα που έχουν απομακρυνθεί από τον αρχικό όγκο, κατά την καρκινική εξέλιξη.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ &

ΜΕΘΟΔΟΙ



6.1. Πληθυσμός μελέτης

A. Μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με ποσοτικό RT-PCR (QPCR) στον καρκίνο του μαστού. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν δείγματα ιστού από μία ομάδα 155 ασθενών με πρωτογενή καρκίνο του μαστού που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου στα νοσοκομεία του Κέντρου Μελέτης Καρκίνου East της Ολλανδίας (Comprehensive Cancer Center East in The Netherlands) και την Πανεπιστημιακή Ιατρική Κλινική (University Medical Center) στη Δρέσδη της Γερμανίας. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 31 ως 86 έτη, με στατιστικό μέσο τα 59 έτη. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας των ασθενών είχε μέσο χρονικό διάστημα 61 μήνες, με μέγιστο τους 120 μήνες. Σε αυτό το χρόνο, 67 (43,2%) ασθενείς επανεμφάνισαν καρκίνο (17 με υποτροπή στο αρχικό όργανο, 46 με απομακρυσμένες μεταστάσεις, 4 με αμφότερα) και 47 (30,3%) ασθενείς απεβίωσαν. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή ή εκτομή του όγκου, σε συνδυασμό με αφαίρεση μασχαλιαίων λεμφαδένων. Μετεγχειρητική τοπική ακτινοθεραπεία του μαστού εφαρμόστηκε μετά από ατελή μαστεκτομή ή μετά από τοπική εκτομή του όγκου. Η μασχαλιαία και η ανώτερη της κλείδας περιοχή ακτινοβολήθηκαν ανάλογα με την κατάσταση των λεμφαδένων. Σε 87 (56,1%) ασθενείς παρατηρήθηκαν λεμφαδενικές μεταστάσεις, ενώ 68 (43,9%) είχαν αρνητικούς λεμφαδένες. Συμπληρωματική συστηματική θεραπεία χορηγήθηκε ανάλογα με τα επικρατή πρωτόκολλα την εποχή της διάγνωσης. 69 Ασθενείς δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία, 49 έλαβαν ορμονική θεραπεία, 28 έλαβαν χημειοθεραπεία και 9 έλαβαν συνδυασμό χημειοθεραπείας και ορμονικής θεραπείας. Από τους 68 ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες, οι 59 (86,8%) δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία.

B. Μελέτη της έκφρασης των καλλικρεΐνών 5 και 7 με ποιοτικό RT-PCR στον καρκίνο του μαστού. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν δείγματα ιστού από μία ομάδα 80 ασθενών με πρωτογενή καρκίνο του μαστού που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου στα νοσοκομεία «Άγιος Σάββας» και Αρεταίειο. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 35 ως 88 έτη, με στατιστικό μέσο τα 63,2 έτη. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας των ασθενών είχε μέσο χρονικό διάστημα 26 μήνες, με μέγιστο τους 56 μήνες. Σε αυτό το χρόνο, 12 (15%) ασθενείς επανεμφάνισαν καρκίνο και 10 (12,5%) ασθενείς απεβίωσαν. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή ή εκτομή του όγκου, σε συνδυασμό με αφαίρεση μασχαλιαίων λεμφαδένων. Μετεγχειρητική τοπική ακτινοθεραπεία του μαστού εφαρμόστηκε μετά από ατελή μαστεκτομή ή μετά από τοπική εκτομή του όγκου. Η μασχαλιαία και η ανώτερη της κλείδας περιοχή ακτινοβολήθηκαν ανάλογα με την κατάσταση των λεμφαδένων. Σε 48 (60%) ασθενείς παρατηρήθηκαν λεμφαδενικές μεταστάσεις, ενώ 32 (40%) είχαν αρνητικούς λεμφαδένες. Συμπληρωματική συστηματική θεραπεία χορηγήθηκε ανάλογα με τα επικρατή πρωτόκολλα την εποχή της διάγνωσης.



Γ. Μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με ποιοτικό RT-PCR στον καρκίνο του ενδομητρίου. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν δείγματα ιστού από μία ομάδα 43 ασθενών με πρωτογενή καρκίνο του ενδομητρίου που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου στα νοσοκομεία «Άγιος Σάββας» και Αρεταίειο. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 27 ως 88 έτη, με στατιστικό μέσο τα 62,7 έτη. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας των ασθενών είχε μέσο χρονικό διάστημα 48 μήνες, με μέγιστο τους 95 μήνες. Πληροφορίες για την εξέλιξη της νόσου ήταν διαθέσιμες για 25 ασθενείς, από τους οποίους, 10 (40%) ασθενείς επανεμφάνισαν καρκίνο και 4 (16%) ασθενείς απεβίωσαν. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε υστερεκτομή. Μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία εφαρμόστηκαν σε ασθενείς σταδίου II ή μεγαλύτερου.

Δ. Μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με ποιοτικό RT-PCR στον καρκίνο των ωοθηκών. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν δείγματα ιστού από μία ομάδα 25 ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου στα νοσοκομεία «Άγιος Σάββας» και Αρεταίειο. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 31 ως 78 έτη, με στατιστικό μέσο τα 56,5 έτη. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας των ασθενών είχε μέσο χρονικό διάστημα 38 μήνες, με μέγιστο τους 59 μήνες. Σε αυτό το χρόνο, 9 (36%) ασθενείς επανεμφάνισαν καρκίνο και 5 (20%) ασθενείς απεβίωσαν. Από τους 25 όγκους, 13 ήταν ορώδεις, 6 ενδομητριώδεις, 3 αδιαφοροποίητοι, 2 βλεννώδεις και 1 clear cell. Ο ιστολογικός τύπος των όγκων καθορίστηκε με βάση τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Seron and Sorbin, 1973). Ο χαρακτηρισμός του βαθμού κακοήθειας (grade) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύστημα διαβάθμισης της Διεθνούς Ένωσης Γυναικολογίας και Μαιευτικής (Peterson, 1994) και η σταδιοποίηση έγινε με βάση τα κριτήρια του Day *et al* (1975). Εννέα ασθενείς (36%) ήταν βαθμού κακοήθειας I ή II και 16 (64%) ήταν βαθμού κακοήθειας III. Συμπληρωματική χημειοθεραπεία χορηγήθηκε σε ασθενείς με βαθμό κακοήθειας III.

Ε. Μελέτη της έκφρασης των καλλικρεΐνων 5 και 7 με ποιοτικό RT-PCR στον καρκίνο του παχέως εντέρου. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν δείγματα ιστού από μία ομάδα 105 ασθενών με πρωτογενή καρκίνο του παχέως εντέρου που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου στο νοσοκομείο «Άγιος Σάββας» μεταξύ των ετών 1996 και 2005. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 31 ως 92 έτη, με στατιστικό μέσο τα 67,5 έτη. Από 54 από τους παραπάνω ασθενείς, λήφθηκε επίσης υγιής βλεννώδης ιστός, επαρκώς απομακρυσμένος (>10cm) από τον όγκο. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας των ασθενών είχε μέσο χρονικό διάστημα 29 μήνες, με μέγιστο τους 104 μήνες και ήταν δυνατή για 98 από τους ασθενείς. Σε αυτό το χρόνο, 36 (36,7%) ασθενείς υποτροπίασαν και 28 (28,6%) ασθενείς απεβίωσαν. Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ολική χειρουργική αφαίρεση του όγκου, χωρίς προηγηθείσα χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Μελετήθηκε επίσης η έκφραση των καλλικρεΐνων 5 και 7 σε 10 εντερικά αδενώματα, 18 δείγματα από βιοψίες φλεγμονώδους εντερικού βλεννώδους και ένα μεταστατικό καρκίνο του εντέρου. Τα δείγματα αυτά δεν συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση επιβίωσης.

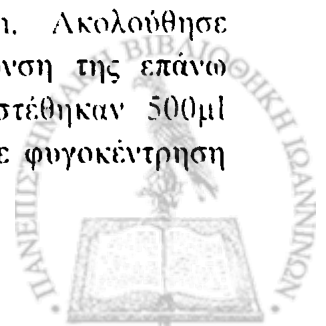


ΣΤ. Μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με ποιοτικό RT-PCR σε καρκίνους του εγκεφάλου. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν δείγματα ιστού από μία ομάδα 73 ασθενών με πρωτογενή καρκίνο του εγκεφάλου που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου στο Νευροχειρουργικό τμήμα του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου του Ηρακλείου, στην Κρήτη, μεταξύ των ετών 1999 και 2003. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 1 ως 86 έτη, με στατιστικό μέσο τα 51 έτη. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας των ασθενών είχε μέσο χρονικό διάστημα 20 μήνες, με μέγιστο τους 59 μήνες και ήταν δυνατή για 66 από τους ασθενείς. Σε αυτό το χρόνο, 24 (36%) ασθενείς υποτροπίασαν και 19 (29%) ασθενείς απεβίωσαν.

Σε όλες τις μελέτες ακολουθήθηκαν οι αντίστοιχοι εθνικοί κανονισμοί σε θέματα βιοηθικής και λήφθηκε άδεια από τις τοπικές επιτροπές βιοηθικής. Κατόπιν χειρουργικής απομάκρυνσης του πρωτογενούς όγκου, αντιπροσωπευτικές περιοχές του όγκου επιλέχθηκαν μακροσκοπικά από έναν παθολογοανατόμο και αμέσως καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Ο ιστολογικός βαθμός (grade) των όγκων καθορίστηκε με βάση τα κριτήρια των Bloom και Richardson (Doussal *et al.*, 1989). Το ιστολογικό στάδιο του όγκου καθορίστηκε σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης TNM. Ασθενείς που έλαβαν συμπληρωματική neo-adjvant θεραπεία, ή είχαν προηγούμενη διάγνωση καρκίνου, ή είχαν καρκίνωμα *in situ*, καθώς και ασθενείς που υποτροπίασαν εντός ενός μηνός μετά την εγχείριση ή εμφάνιζαν και μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης αποκλείστηκαν από αυτήν τη μελέτη.

6.2. Απομόνωση ολικού RNA

Σημαντικό στοιχείο στην απομόνωση και γενικά στο χειρισμό του RNA είναι η απουσία RNασών από τα υλικά που χρησιμοποιούνται. Για αυτό το λόγο τα διαλύματα ή το νερό είναι πάντα επεξεργασμένα με έναν γενικό αναστολέα RNασών, το DEPC (diethyl pyrocarbonate). Επιπλέον οι ηλεκτροφορητικές συσκευές πριν τη χρήση τους πλένονται με 5% SDS, ενώ στη συνέχεια ξεπλένονται με DEPC-επεξεργασμένο νερό, ομοίως τα ακροφύσια και τα erpendorfs ξεπλένονται με DEPC-επεξεργασμένο νερό πριν την αποστείρωσή τους, ενώ τα γυαλικά αποστειρώνονται για 3 ώρες στους 120°C. Το ολικό RNA απομονώθηκε από τους ιστούς ή τις κυτταρικές σειρές με το διάλυμα Trizol (Gibco) με το πρωτόκολλο που προτείνει ο κατασκευαστής. Για τους ιστούς αρχικά πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση με μηχανικό τρόπο και κατόπιν προστέθηκε 1ml Trizol ανά 50-100mg ιστού. Για καλλιέργεια κυττάρων, η ομογενοποίηση επιτεύχθηκε με προσθήκη 1ml Trizol ανά 10cm² επιφάνειας. Μετά την πλήρη ανάμειξη των δύο συστατικών και την παραμονή για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν στο μείγμα 200μl CHCl₃ ανά 1ml Trizol, ομογενοποιήθηκαν και επωάσθησαν για άλλα 2-3min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 12000g για 15 min στους 4°C και απομάκρυνση της επάνω υδατικής φάσης που περιείχε το RNA. Στο διάλυμα αυτό προστέθηκαν 500μl ισοπροπανόλη ανά 1ml Trizol. Η κατακρήμνιση του RNA έγινε με φυγοκέντρηση



στις 10000g για 10 min στους 4°C μετά από επώαση του μείγματος στον πάγο για 10 min, και το ίζημα ξεπλύθηκε από τα άλατα με 1ml 70% αιθανόλη ανά 1ml Trizol. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για 10 min, αναδιαλύθηκε σε 50μl RNA storage buffer (Ambion) και επώαστηκε για 20min στους 55-60°C. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε από την οπτική του πυκνότητα σε μήκος κύματος 260nm σε φωτόμετρο Hitachi UV-VIS (U-2000). Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 και τα 280nm αποτέλεσε ένδειξη της καθαρότητας του ολικού RNA, ενώ η ακεραιότητά του ελέγχθηκε με αντίδραση ενίσχυσης ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης (β-ακτίνη).

6.3. Αντιδράσεις RT-PCR

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Superscript pre-amplification system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Αρχικά αναμίχθηκαν 2μg RNA και 2 pmole του εκκινητικού ολιγονουκλεοτιδίου oligo(dT) μέχρι τελικού όγκου 12μl και επώασθηκαν στους 70°C για 10min. Ακολούθησε γρήγορη μεταφορά του δείγματος στον πάγο και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης σε τελική συγκέντρωση 1X (5X: 250mM Tris·Cl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl²), 2μl DTT 0,1M, 2μl MgCl² 25mM, μείγμα dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0,5mM, και 1μl (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης (Superscript II, Invitrogen). Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας έγινε στους 42°C για 50 min και το ένζυμο απενεργοποιήθηκε στη συνέχεια θερμικά με επώαση στους 70°C για 15 min. Προστέθηκε 1μl ριβονουκλεάση H και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20 min προκειμένου να αποδιαταχθεί το RNA. Μόνο το 5% (1μl) της αντίδρασης σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σαν μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο.

6.4. Ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τον προσδιορισμό της καλλικρεΐνης 7

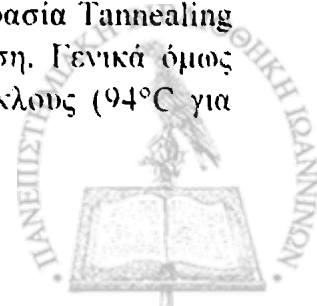
Για την ποσοτικοποίηση του mRNA της *KLK7* αναπτύχθηκε ευαίσθητη μέθοδος ποσοτικής RT-PCR (QPCR) με χρήση της τεχνολογίας LightCycler (Roche Diagnostics, έκδοση λογισμικού 3.5). Με βάση την cDNA αλληλουχία της *KLK7* (κατατεθειμένη στη βάση δεδομένων Genbank με αριθμό πρόσβασης L33404), σχεδιάστηκαν τα εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια *KLK7_S* και *KLK7_A* (Πίνακας 6.1). Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αντίδρασης εμπλουτισμού πραγματοποιήθηκε με χρήση των ιχνηθετών υβριδισμού *KLK7_FL* και *KLK7_LC*. Το αρχικό μίγμα της αντίδρασης εμπλουτισμού περιείχε 4,5mM MgCl₂, 10μM από κάθε εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο και 5μM από κάθε ιχνηθέτη υβριδισμού σε



τελικό όγκο 20 μ l. Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε αρχικό βήμα αποδιάταξης στους 95°C για 10 min και ακολουθούσαν 45 κύκλοι εμπλουτισμού με: αποδιάταξη στους 95°C για 10 sec, υβριδοποίηση στους 64°C για 10 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 6 sec. Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των ποσοτικών μετρήσεων, τυχαία επιλεγμένα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτές αгарόζης 1,5% και αλληλουχήθηκαν κατόπιν καθαρισμού. Για κάθε αντίδραση εμπλουτισμού σχηματίστηκαν πέντε καμπύλες ελέγχου εκθετικής κλίμακας, με χρήση 8 γυάλινων τριχοειδών αγγείων που είχαν επιστρωθεί με προκαθορισμένους αριθμούς γραμμικοποιημένων μορίων πλασμιδίων pRcRSV στα οποία είχε κλωνοποιηθεί το cDNA της καλλικρεΐνης 7 (pRcRSV-KLK7). Ο ακριβής αριθμός των μορίων του φορέα καθορίστηκε με βαθμονόμηση HPLC (Roboscreen, Λειψία, Γερμανία) (Köhler et al, 1999). Τα 8 τριχοειδή αγγεία που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα ήταν επιστρωμένα με 10, 20, 50, 10², 10³, 5x10³, 10⁴ και 10⁵ αντίγραφα, αντίστοιχα. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (human glucose-6-phosphate-dehydrogenase, h-G6PDH), καθώς αποτελεί κατάλληλο γονίδιο αναφοράς για τον καρκίνο του μαστού (Farthmann et al, 2004). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το h-G6PDH Housekeeping Gene Set (Roche Diagnostics) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνει ο κατασκευαστής (μήκος προϊόντος: 123bp). Όλα τα δείγματα cDNA στα οποία μετρήθηκαν <10⁴ μόρια h-G6PDH θεωρήθηκαν μη βελτιστης ποιότητας και αποκλείστηκαν από τη μελέτη (21 από 176 δείγματα, 11,9%). Στη συνέχεια, όλοι οι υπολογισμοί και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν με χρήση των σχετικών λόγων έκφρασης mRNA (xmol KLK7/ymol h-G6PDH).

6.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Οι αντιδράσεις εμπλουτισμού έγιναν στη συσκευή PCR PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Κατά περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν διάφορα ένζυμα. Για τη μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 στους καρκινικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA polymerase (των εταιριών Sigma, Invitrogen, New England Biolabs). Για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης και γενικότερα όπου χρειαζόταν υψηλή πιστότητα αντιγραφής, χρησιμοποιήθηκαν οι Expand High Fidelity PCR System (Roche), Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μ l και περιείχε 0,2mM dNTPs, 0,1mM από κάθε εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο, 1 unit πολυμεράσης και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Η βέλτιστη συγκέντρωση MgCl₂ καθορίστηκε κατά περίπτωση, από 1 έως 2mM. Οι παράμετροι της αντίδρασης και κυρίως ο αριθμός κύκλων, η θερμοκρασία Tannealing (Tan), ο χρόνος επιμήκυνσης, επίσης καθορίστηκαν κατά περίπτωση. Γενικά όμως περιελάμβαναν αρχικό βήμα ολικής αποδιάταξης 94°C , 33-40 κύκλους (94°C για



1min, Tan για 1min, επιμήκυνση σε 68-72°C) και βήμα τελικής επιμήκυνσης των μορίων στους 72°C για 10 min.

Εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία (5'-3')
actinf	ACA ATG AGC TGC GTG TGG CT
actinr	TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA
HSI	GAA GAA GCT GAT GGT GGT GC
HSII	CTG AAT GGT TTT TTG GAT CC
KLK7_S	GGA AAC TGC AGG AGA AGC
KLK7_A	TGG AGC TGA TTG CCA CTG A
KLK7_FL	GGT GGG AGC CTC TTG CAC ATG G-Φλουορεσκαΐνη
KLK7_LC	LCred640-CGC CAT CAA TAA TCT TGT CAC CCT G- Φωσφορικό οξύ
K7ex2f	CTT ACT GCT ATC CTT AGC CTT GG
K7ex4r	CTT TCT TCA CCA TCG ATG ACA GC
K5ex3f	CCA CTA CTC CCT GTC ACC AG
K5ex5r	GTA ATC TCC CCA GGA CAC GA
GSPII	CTT GAT CCT CTG AGC TCT CCT GTC G
K75u1	TTC CAC TAC CTC AAC ACA ACC TTC A
K75u2	AGA CCC AGC TGA TCC TCA CCT CTC T
K75u3	CTC CAG CTC CAT TCA CGT CCC TAC A
K75u1	CTC CCA CTC TCC ACC CTC TCA TAA GC
K7intr1	ACC CAG GAA TCT AGG CTC CGA TCT T
Προσαρμογέας 5'-RACE	GCU GAU GGC GAU GAA UGA ACA CUG CGU UUG CUG GCU UUG AUG AAA
GSPII	CTT GAT CTC TGA GCT CTC CTG TCG
Εξωτερικός5'-RACE	GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG
Εσωτερικός5'-RACE	CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG
GSPIII	AAT ATG GTA CCG ATC CTC TGA GCT CTC CTG
K75u1HIII	AAT ATA AGC TTC CAC TAC CTC AAC ACA ACC
K75u3K1	AAT ATG GTA CCC TCC AGC TCC ATT CAC G
K75u2K1	AAT ATG GTA CCG ATC CTC ACC TCT CTG G
K7intr1HIII	AAT ATA AGC TTA CCC AGG AAT CTA GGC TCC

Πίνακας 6.1: Εκκινητικά Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μελέτη της έκφρασης των ανθρωπίνων ιστικών καλλικρεϊνών 5 και 7 σε διάφορους τύπους καρκίνου με ποσοτική, ημι-ποσοτική ή ποιοτική μέθοδο RT-PCR, καθώς και κατά την αναζήτηση του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου KLK7.

Σημειώνεται ότι για κάθε ζεύγος εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιήθηκε διαφορετική θερμοκρασία Tan ανάλογα με τη θερμοκρασία Tm που παρουσιάζει το ζεύγος. Τα προϊόντα εμπλουτισμού όταν χρειάσθηκε



κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης PCR 2.1 (Invitrogen, TA cloning kit) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα ζεύγη των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες αντιδράσεις καταγράφονται στον Πίνακα 6.1.

Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8-1,5% (ανάλογα με το μέγεθος της ζώνης), που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (TBE 50X:2M Tris-acetate, 50mM EDTA). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (όπως αυτή διαπιστώθηκε από τη διαδρομή που διέτρεξαν οι χρωστικές bromophenol blue και xylene cyanol) το DNA παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου και είναι ορατή η χρωστική του βρωμιούχου αιθιδίου. Για τη φωτογράφιση χρησιμοποιήθηκε το ψηφιακό σύστημα Gel Logic 100 Imaging System και το λογισμικό 1D Image Analysis Software, version 3.6 (Eastman Kodak Company, USA). Το μέγεθος των ζωνών υπολογίστηκε με βάση τις ζώνες διαφόρων κατά περίπτωση προτύπων μαρτύρων μοριακών μεγεθών (50 bp, 100bp, 1Kb, φχ174, PCR ladder) που συνέτρεξαν στο πήκτωμα με τα δείγματα.

Εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία (5'-3')
Hk7-intup	CAG GGT GTA CTC ATT CAT CTT GC
Hk7-intdo	GAC TGC ACG AAG GTT TAC AAG G
RSV-hK7-HIII	AAT ATA AGC TTA TGG CAA GAT CCC TTC TC
RSV-hK7-X	AAT ATT CTA GAT TAG CGA TGC TTT TTC AT
Hk6-intup	GTC GCA GGG TCC GCC ATG CAC C
Hk6-intdo	GAC ATC ATG CTG TTG CGC CTG G
RSV-Hk6-HIII	AAT ATA AGC TTA TGA AGA AGC TGA TGG TG
RSV-Hk6-X	AAT ATT CTA GAT CAC TTG GCC TGA ATG G
Hk5-intup	CCT TAG CAA CAG CGC GGC CTG C
Hk5-intdo	CAG TGC TTG AAT ATC AGC GTG C
RSV-hK5-HIII	AAT ATA AGC TTA TGG CTA CAG CAA GAC C
RSV-hK5-X	AAT ATT CTA GAT TAG GAG TTG GCC TGG ATG
Hk4-intup	GAA CAA TTC GTT TTC CAT GAC C
Hk4-intdo	ACC GTG CTG CAG TGC GTG AAC G
RSV-hK4-HIII	AAT ATA AGC TTA TGG CCA CAGCAG GAAATC
RSV-hK4-X	AAT ATT CTA GAT TAA CTG GCC TGG ACGGTT

Πίνακας 6.2: εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις πολυμερισμού κατά τη μελέτη των φαινοτυπικών αλλαγών στη συμπεριφορά κυττάρων κατά την υπερέκφραση διαφόρων μεμονωμένων καλλικρεϊνών ή συνδυασμών τους.



6.6. Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 και τις κλινικές ή ιστομορφολογικές παραμέτρους. Για τα δεδομένα που προέκυψαν από την ποσοτική μέθοδο PCR έγινε χρήση των παραμετρικών τεστ T-test και One-way ANOVA υπό τη συνθήκη της κανονικής κατανομής. Για τα δεδομένα που προήλθαν από την ημιποσοτική μέθοδο, εφαρμόστηκαν τα τεστ χ^2 και Fisher. Για την ανάλυση επιβίωσης, η ελεύθερη νόσου επιβίωση (Disease-Free Survival, DFS) ορίστηκε ως το διάστημα από τη στιγμή της εγχείρησης ως τη διάγνωση υποτροπής ή το θάνατο της ασθενούς. Αυτός είναι ο συνδυασμένος χρόνος ελεύθερος νόσου, σύμφωνα με τον ορισμό του DFS στο πρωτόκολλο μελέτης του Cancer and Leukemia Group B (CALGB, <http://www.calgb.org>) και του National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project NSABP (<http://www.nsabp.pitt.edu>) των ΗΠΑ. Η συσχέτιση του επιπέδου έκφρασης του mRNA του γονιδίου μελέτης και άλλων κλινικών και ιστομορφολογικών παραμέτρων με την ολική επιβίωση και την ελεύθερη νόσου επιβίωση πραγματοποιήθηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών (Cox, 1972). Οι καμπύλες επιβίωσης δημιουργήθηκαν με τους υπολογισμούς Kaplan και Meier με χρήση παλινδρομικού μοντέλου (Kaplan and Meier, 1958). Οι τιμές $p \leq 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Οι υπολογισμοί έγιναν με τα στατιστικά προγράμματα SPSS 12.0 και S-Plus.

6.7 Ανοσοϊστοχημική μέθοδος για την ανίχνευση της καλλικρεΐνης 7

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί σήμερα χρήσιμη μέθοδο για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση αντιγόνων που βρίσκονται σε βιολογικά υλικά, χρησιμοποιείται δε ευρέως στην ιατροβιολογική έρευνα και διαγνωστική. Για την ανίχνευση της παρουσίας και τη μελέτη της κατανομής της πρωτεΐνης καλλικρεΐνη 7 σε καρκινικούς ιστούς, αναπτύχθηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος από ορό κουνελιού (παράχθηκε και παραχωρήθηκε από την ερευνητική μονάδα του Καθηγητή Ε.Π. Διαμαντή, Πανεπιστήμιο Τορόντο, Καναδά).

Αντικειμενοφόρες πλάκες με τομές (πάχους 5μm) καρκινικών ιστών μαστού, ωοθηκών και ενδομητρίου, οι οποίοι είχαν μονιμοποιηθεί σε μπλοκ παραφίνης, αφού θερμάνθηκαν στους 60-65°C, ενυδατώθηκαν με διαδοχικές διπλές εμβαπτίσεις 5 λεπτών σε λουτρά ξυλόλης και αιθανόλης διαφόρων συγκεντρώσεων (100%, 96%, 80% και 70%). Κατόπιν, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 10mmol, θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων επί 10min και ξεπλύθηκαν σε διάλυμα TBS (pH 7,6). Η δράση της εξωγενούς υπεροξειδάσης παρεμποδίστηκε με επώαση για 15min σε διάλυμα 3% H₂O₂ σε μεθανόλη. Ακολούθησε ξέπλυμα σε TBS, επώαση με 200μl με φυσιολογικό ορό αλόγου (normal blocking serum) επί 15min και δεύτερη επώαση με 200μl πρωτογενούς μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ανθρώπινης ιστικής καλλικρεΐνης 7 (προσφορά του Καθηγητή Ε.Π. Διαμαντή, Τορόντο, Καναδά), σε αραιώση 1:60, για 30min. Οι τομές ξεπλύθηκαν με TBS,



επώαστηκαν για 30min σε 200μl βιοτινιλιωμένου δευτερογενούς αντισώματος, 1:100 σε TBS και ξεπλύθηκαν πάλι. Επώαστηκαν σε 200μl αντιδραστηρίου AB complex/HRP (Dako) 1:100, επί 30min, ξεπλύθηκαν με TBS και ακολούθησε επώαση σε 3,3 τετραχλωρίδιο της διαμινοβενζιδίνης (DAB, Sigma) για 10min. Μετά από νέο πλύσιμο σε TBS και νερό βρύσης, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1min, αφυδατώθηκαν σε λουτρά αιθανόλης και ξυλόλης και καλύφθηκαν με κόλλα DPX και καλυπτρίδα. Οι τομές μελετήθηκαν σε μικροσκόπιο και επιλεγμένες περιοχές φωτογραφήθηκαν με σύστημα ψηφιακής φωτογράφισης (Nikon Digital Sight DS-L1). Τα δείγματα αρνητικού ελέγχου επώαστηκαν με PBS αντί του πρωτογενούς αντισώματος.

6.8. Στελέχη βακτηρίων

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό ανασυνδυασμένων μορίων ήταν τα XL1 Blue (Stratagene) με γονότυπο *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'*proAB lac⁺ZΔM15 Tn10 (Tet^r)] και DH5a Library efficiency (Invitrogen), με γονότυπο *F-* φ80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-*. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB (αναμιγνύονται 10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract και 10g NaCl για 1l θρεπτικού, προσαρμόζεται το pH=7) στους 37°C στατικά και υπό ολονύκτια ανακίνηση στις υγρές καλλιέργειες. Βακτηριακά στελέχη για καθημερινή χρήση διατηρούνταν σε τρυβλία στους 4°C, ενώ για μακροπρόθεσμη συντήρηση φυλάσσονταν σε διαλύματα γλυκερόλης σύστασης 33% στους -80°C.

6.9. Αντιδράσεις περιορισμού και διασύνδεσης του DNA

Αντιδράσεις περιορισμού (πέψεις) πραγματοποιήθηκαν στα προϊόντα PCR και το πλασμίδιο πριν τις αντιδράσεις διασύνδεσης (ligation) ώστε να σχηματιστούν τα μονόκλωνα άκρα και μετά την απομόνωση του πλασμδιακού DNA ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία κομματιού εισδοχής στο φορέα κλωνοποίησης (ανάλυση περιορισμού). Οι αντιδράσεις έγιναν με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, σε τελικό όγκο 50μl, στους 37°C για 1 ώρα και στη συνέχεια το σύνολο της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα δείγματα στα οποία εκτός από τη ζώνη 5,2Kb (που αντιστοιχεί στον γραμμικοποιημένο φορέα pRc/RSV) εμφανιζόταν και κάποια ή κάποιες άλλες ζώνες διατηρήθηκαν για περαιτέρω μελέτη, αφού παρουσίαζαν αλληλουχία εισδοχής. Οι αντιδράσεις διασύνδεσης του τμήματος DNA στο φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο T4-DNA-λιγάση σε συνθήκες: 250mM Tris-HCl pH 7.6, 50mM MgCl₂, 25% πολυεθυλενογλυκόλη, 5mM DTT, 10mM ATP σε τελικό όγκο 21μl για 3,5 ώρες στους 21°C. Η αναλογία μορίων DNA εισδοχής προς μόρια του φορέα ήταν 5:1.





Σχήμα 6.1: Φορέας κλωνοποίησης pRc/RSV (Invitrogen).

6.10. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων DH5a και XL1 Blue και μετασχηματισμός

Καλλιέργεια 100ml βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB επώασθη υπό ανακίνηση (150 rpm) στους 37°C μέχρι οπτικής απορρόφησης 0,5 στα 600nm. Μετά από επώαση σε πάγο για 5min, τα κύτταρα καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση για 5min στις 6000rpm στους 4°C και στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων αναδιλύθηκε σε 30ml buffer 1 (0,1M RbCl₂, 0,05M MnCl₂, 0,01M CaCl₂, 0,03M KOH, 15% γλυκερόλη pH5,8). Ακολούθησε επώαση 90min σε πάγο και νέα καταβύθιση των κυττάρων με φυγοκέντρηση και αναδιάλυσή τους σε 4ml buffer 2 (0,01M RbCl₂, 0,01M MOPS pH6,8, 75mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη). Διαιρέθηκαν σε δείγματα των 200μl, τα οποία καταψύχθηκαν ταχέως σε υγρό άζωτο ή μίγμα ξηρού πάγου-αιθανόλης και διατηρήθηκαν στους -80°C. Για το μετασχηματισμό, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από τους -80°C σε πάγο για 15-20min. Στο διάστημα αυτό προστέθηκαν 8μl από την αντίδραση διασύνδεσης σε 42μl διαλύματος TE pH 8 σε πάγο. Στο μίγμα προστέθηκαν 100μl δεκτικών κυττάρων και επώασθηκαν για 25min σε πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ για 1min στους 42°C. Μετά την επαναφορά στον πάγο για 5min, τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό διάλυμα 2xTY (αναμιγνύουμε 16g nutrient broth, 10g peptone και 2g γλυκόζης για τελικό όγκο θρεπτικού 1l, προσαρμόζουμε το pH=7,5) και κατόπιν ήπιας ανάδευσης παρέμειναν για 1 ώρα στους 37°C ώστε να ανακάμψουν. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 6000rpm και επαναδιλύθηκε σε ~200μl από το υπερκείμενο. Ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε κατάλληλα τρυβλία τα οποία περιείχαν το αντιβιοτικό επιλογής και ολονύχτια επώαση στους 37°C.



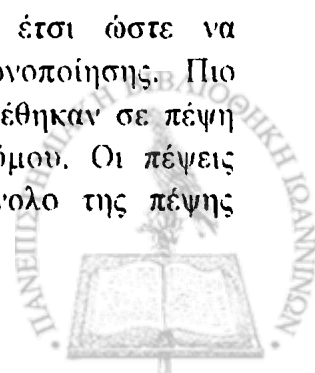
6.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια σε μικρή κλίμακα

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή, μεσαία ή μεγάλη κλίμακα με μέγιστη απόδοση και καθαρότητα, χρησιμοποιήθηκε το High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Για απομόνωση ρουτίνας πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο: Εμβολιάστηκαν καλλιέργειες 3 ml LB που περιείχαν το αντιβιοτικό της επιλογής με αποικίες από το τρυβλίο του μετασχηματισμού και αφέθηκαν να αναπτυχθούν ολονύκτια στους 37°C. 1,5 ml της καλλιέργειας καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση για 1 min στις 13000rpm και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος P1 (50mM γλυκόζη, 5%, 25mM Tris-Cl pH8.0, 10mM EDTA, pH8.0) Μετά από ανάδευση, στο εναιώρημα των κυττάρων προστέθηκαν 200μl από διάλυμα P2 (1% SDS, 0,2N NaOH) και το μείγμα επώασθη για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 150μl P3 (3M Kac, pH8.0) και αφού τα δείγματα διατηρήθηκαν στον πάγο για 30 min, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min στις 13000 rpm, στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο μεταφέρθηκε και ακολούθησε καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με προσθήκη 400μl φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε εκ νέου και το DNA καταβυθίστηκε με προσθήκη 800μl αιθανόλης, επώαση 5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση 15 min στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ξηρό ίζημα αναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος ριβονουκλεάσης (0,1mg/ml RNάσης σε διάλυμα TE, 10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0). Το διάλυμα αφέθηκε 3min σε θερμοκρασία δωματίου και επώασθη για 15min στους 37°C. Προστέθηκαν 300μl διαλύματος LiCl (0,4M) και 400μl φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 3min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν αφαιρέθηκε η πάνω φάση και σε αυτήν προστέθηκαν 800μl αιθανόλης. Μετά από 5min στον πάγο, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 15min στις 13000 rpm, στους 4°C. Το ίζημα, αφού στέγνωσε, επαναδιαλύθηκε σε 20μl TE.

6.12. Πέψεις των πλασμιδιακών DNA και επιλογή των κλώνων

Οι πέψεις έγιναν με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία κομματιού εισδοχής στο φορέα κλωνοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, 3μl από το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA προστέθηκαν σε πέψη τελικού όγκου 20μl όπου προστέθηκε 1 unit περιοριστικού ενζύμου. Οι πέψεις επώασθησαν στους 37°C για 2 ώρες και στη συνέχεια το σύνολο της πέψης



ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,7% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X (TAE 50X:2M Tris-acetate, 50mM EDTA). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (όπως αυτή διαπιστώθηκε από τη διαδρομή που διέτρεξαν οι χρωστικές bromophenol blue και xylene cyanol) το DNA χρωματίστηκε με τον εμβαπτισμό του πηκτώματος σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου και είναι ορατή η χρωστική του βρωμιούχου αιθιδίου. Το μέγεθος των ζωνών υπολογίστηκε με βάση τις ζώνες ενός πρότυπου μάρτυρα μοριακών μεγεθών (1Kb ladder, BRL) που συνέτρεξε στο πήκτωμα με τα δείγματα, ενώ τα δείγματα στα οποία εκτός από τη ζώνη 3Kb (που αντιστοιχεί στον γραμμικοποιημένο φορέα pBluescript SK) εμφανιζόταν και κάποια ή κάποιες άλλες ζώνες διατηρήθηκαν για περαιτέρω μελέτη, αφού παρουσίαζαν αλληλουχία εισδοχής.

6.13. Καλλιέργεια κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 32 κυτταρικές σειρές (Πίνακες 6.3, 6.4). Από αυτές, οι 31 ήταν ανθρώπινες καρκινικές σειρές και 1 μη καρκινική. Από τις καρκινικές, οι 17 προέρχονταν από γυναικολογικούς καρκίνους και οι 14 από λοιπές μορφές καρκίνου. Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν σε επωαστήρα σε συνθήκες 5% CO₂ και 95% αέρα, στους 37°C σε τρυβλία petri ή φιάλες κυτταρικής καλλιέργειας. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν είτε ως προσκολλημένο μονόστρωμα στην επιφάνεια του τρυβλίου είτε ως εναιώρημα, ενώ ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση τα RPMI 1640, DMEM και McCoy's. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας περιείχε επίσης 2mM L-γλουταμίνη, 10% εμβρυϊκό ορό αγελάδας (Fetal Bovine Serum, FBS), 1% μη απαραίτητα αμινοξέα και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

Στα πειράματα μελέτης του πολλαπλασιασμού και του μεταστατικού δυναμικού των κυττάρων, απαιτήθηκε η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή, μετά την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου, πραγματοποιήθηκε καταμέτρησή τους με χρήση της χρωστικής Trypan Blue, η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα, και καταμέτρηση των ζώντων κυττάρων σε πλάκα Neubauer.



Κυτταρική σειρά	Ιστός Προέλευσης	Τύπος καρκίνου	Μορφολογία	Τρόπος ανάπτυξης	Θρεπτικό μέσο
U-251 MG	Εγκέφαλος	Γλιοβλάστωμα		Προσκ.	DMEM
D-54	Εγκέφαλος	Γλιοβλαστώμα		Προσκ.	DMEM
SH-SY5Y	Εγκέφαλος	Νευροβλάστωμα	Επιθ.	Μικτός	DMEM
HL60	Προ-μυελοβλάστες	Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία	Μυελ.	Εναιωρ.	RPMI 1640
Molt-4	T-λεμφοβλάστες	Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία	Λεμφ.	Εναιωρ.	RPMI 1640
Raji	B λεμφοκύτταρα	Λέμφωμα Burkitt	Μονοκ.	Εναιωρ.	RPMI 1640
Daudi	B-λεμφοβλάστες	Λέμφωμα Burkitt	Λεμφ.	Εναιωρ.	RPMI 1640
U-937	Μακροφάγα	Ιστιοκυτταρικό λέμφωμα		Εναιωρ.	RPMI 1640
K562	Μυελός οστών	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία	Λεμφ.	Εναιωρ.	RPMI 1640
HT1080	Άγνωστο	Ινοσάρκωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
PC-3	Προστάτης	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640
FM-3		Μελάνωμα	Μονοκ.	Προσκ.	RPMI 1640
HCT 116	Έντερο	Καρκίνωμα παχέως εντέρου	Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640
HT-29	Έντερο	Αδενοκαρκίνωμα παχέως εντέρου	Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640
HaCaT	Κερατινοκύτταρα		Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640

Πίνακας 6.3: Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές από μη γυναικείους τύπους καρκίνου.

Κυτταρική σειρά	Ιστός Προέλευσης	Τύπος καρκίνου	Μορφολογία	Τρόπος ανάπτυξης	Θρεπτικό μέσο
MCF7	Μαστικός Αδένας	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
aMCF7	Μαστικός Αδένας	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
MCF-10A	Μαστικός Αδένας	Ινοκυστική νόσος	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
T-47D	Μαστικός Αδένας	Ductal καρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640
BT-474	Μαστικός Αδένας	Ductal καρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
ZR-75-1	Μαστικός Αδένας	Ductal καρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
MDA-MB-231	Μαστικός Αδένας	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
MDA-MB-435S	Μαστικός Αδένας	Ductal καρκίνωμα	spindle	Προσκ.	RPMI 1640
ES-2	Ωοθήκη	Clear cell καρκίνωμα	Ινοβλ.	Προσκ.	McCoy's5A
SK-UT-1B	Μήτρα	Μεσοδερμικός όγκος (μικτός)	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
TOV-21G	Ωοθήκη	Πρωτογενές Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640
Caov-3	Ωοθήκη	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	DMEM
MDAH 2774	Ωοθήκη	Αδενοκαρκίνωμα		Προσκ.	RPMI 1640
OV-MZ-6	Ωοθήκη	Αδενοκαρκίνωμα		Προσκ.	DMEM
OV-MZ-10	Ωοθήκη	Αδενοκαρκίνωμα		Προσκ.	DMEM
NHEK/OCAR-3	Ωοθήκη	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	RPMI 1640
Hel.a	Τράχηλος μήτρας	Αδενοκαρκίνωμα	Επιθ.	Προσκ.	McCoy's5A

Πίνακας 6.4: Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές από γυναικείους τύπους καρκίνου.



6.14. Ασταθής διαμόλυνση κυττάρων

Σε πιάτο 12 πηγαδιών καλλιεργήθηκαν 10^5 κύτταρα σε 1ml πλήρες θρεπτικό μέσο, για 24 ώρες. Κατόπιν, αντικαταστάθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο με θρεπτικό που δεν περιείχε ορό και αντιβιοτικά. Σε ειδικά αποστειρωμένα σωληνάρια διαμόλυνσης των 5ml προστέθηκαν 100μl θρεπτικού χωρίς ορό και 4μl λιπιδίου Lipofectin® Reagent (Invitrogen) και επώαστηκαν για 30-45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον κλίβανο. Προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο μίγμα 100μl θρεπτικού και 0,5-2μg DNA, επώαστηκε 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον κλίβανο και προστέθηκε 1ml θρεπτικό χωρίς ορό. Εν συνεχεία αντικαταστάθηκε το θρεπτικό των κυττάρων με το διάλυμα που περιείχε το λιπίδιο και το DNA. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 5-6ώρες, οπότε και αντικαταστάθηκε το θρεπτικό των κυττάρων με πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 2 μέρες, με ενδιάμεσες αλλαγές του θρεπτικού μέσου.

6.15. Σταθερή διαμόλυνση κυττάρων

Σε τρυβλίο petri που είναι κατά 70-90% γεμάτο προστέθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και για την ασταθή διαμόλυνση διάλυμα 200μl θρεπτικού με 15μl Lipofectin και 5μg DNA. Μετά από 2 ημέρες, τα κύτταρα αφαιρέθηκαν και μοιράστηκαν σε 3 τρυβλία. Όταν τα τρυβλία ήταν 100% γεμάτα, άρχισε η διαδικασία επιλογής των κυττάρων που είχαν ενσωματώσει το φορέα. Προστέθηκε θρεπτικό μέσο επιλογής, που περιείχε 0,1%w/v γενετισίνη (geneticin, G418). Το θρεπτικό ανανεωνόταν περιοδικά, έως ότου όλα τα κύτταρα ελέγχου νεκρώθηκαν. Στη φάση αυτή τα διαμολυσμένα κύτταρα είχαν αρχίσει να σχηματίζουν κλώνους. Όταν οι κλώνοι αναπτύχθηκαν αρκετά, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν, ενοποιήθηκαν και εν συνεχεία καλλιεργήθηκαν κανονικά.

6.16. Ανοσολογική δοκιμασία ELISA

Δύο εκατομμύρια κύτταρα αποκολλήθηκαν με θρυψίνη 48h μετά την επίστρωση και φυγοκεντρήθηκαν για 3min στις 1200rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα υποβλήθησαν σε εναλλαγή παγώματος στους -20°C και τήξης σε θερμοκρασία δωματίου δύο φορές, προκειμένου να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες. Κατόπιν τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500μl διαλύματος 0.05M Tris/HCl, 0,1M NaCl, 10mM EDTA και 0,2% Triton X-100 ώστε να διαλυθούν οι πρωτεΐνες. Ακολούθησε επώαση στον πάγκο για 5-10min με ανάδευση ενδιάμεσως, επανάληψη της διαδικασίας παγώματος-τήξης και αποθήκευση στους -



20°C. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανοσολογική δοκιμασία ELISA για την ποσοτική ανίχνευση της καλλικρεΐνης 7 και άλλων μελών της οικογένειας των καλλικρεΐνών στο Εργαστήριο Μοριακής Παθολογίας του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Mount Sinai, στο Τορόντο του Καναδά, από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Ε.Π. Διαμαντή.

6.17. Δοκιμασία Πολλαπλασιασμού

Πενήντα χιλιάδες κύτταρα που υπερεκφράζουν την καλλικρεΐνη 7 ή άλλες καλλικρεΐνες, καθώς και κύτταρα ελέγχου (control), καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 16mm². Για κάθε ομάδα κυττάρων επιστρώθηκαν 4 τρυβλία. Κατόπιν μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων εις διπλούν στις 48 και τις 72 ώρες μετά την καλλιέργεια. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε κυτταρική ομάδα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος ζώντων κυττάρων στις δύο χρονικές στιγμές.

6.18. Μελέτη μεταστατικού δυναμικού καρκινικών κυττάρων

Η μελέτη μεταστατικού δυναμικού με matrigel δίνει ένα μετρήσιμο αποτέλεσμα της ικανότητας των κυττάρων να διηθούν το εξωκυττάριο στρώμα, λειτουργία απαραίτητη στη διαδικασία εξάπλωσης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Το Growth Factor Reduced MatrigelTM Matrix w/o Phenol Red (Becton Dickinson Biosciences) αποτελεί συνθετικό υπόστρωμα, η σύσταση του οποίου προσομοιάζει τη βασική μεμβράνη των ιστών. Τα κύρια συστατικά του είναι λαμινίνη, κολλαγόνο IV, εντακτίνη και πρωτεογλυκάνες (Bissel et al, 1987). Επίσης περιέχει αυξητικούς παράγοντες, κολλαγενάσες, ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και άλλα μη προσδιορισμένα συστατικά. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως *in vitro* φραγμός για τη μελέτη του μεταστατικού δυναμικού καρκινικών κυττάρων.

Δείγματα 80μl Matrigel (11,7mg/ml) διατηρήθηκαν στους -20°C. Αφού αφέθηκε να λιώσει στη διάρκεια της νύχτας σε πάγο, το Matrigel αραιώθηκε 1:24 με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ένθετες πλαστικές μεμβράνες από τερεφθαλικό πολυεθυλένιο (polyethylene terephthalate, PET) διαμέτρου 6,4mm και με πόρους 8μm (Becton Dickinson Labware) για πιάτα με 24 πηγάδια επιστρώθηκαν με 60μl Matrigel/μεμβράνη (πυκνότητα ~85μg/cm²). Τα πιάτα επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας. Αφού πήρε τη μορφή ζελατίνης, το Matrigel αφέθηκε να στεγνώσει στη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα, η ζελατίνη επανυδατώθηκε με προσθήκη 200μl ελεύθερο ορού θρεπτικό μέσο DMEM/0,1% BSA. Τα διαμολυσμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 60-80% και εν συνεχεία προστέθηκαν 5x10⁴ κύτταρα/500μl DMEM/0,1% BSA σε κάθε μεμβράνη. Το υπό των μεμβρανών διαμέρισμα πληρώθηκε με 750μl DMEM με



περιεκτικότητα 10% FCS, ως χημειοτακτική ουσία. Κατόπιν 48 ωρών επώασης, η ζελατίνη με τα κύτταρα που δεν την είχαν διηθήσει πλήρως απομακρύνθηκαν με λεπτό απορροφητικό χαρτί και τα κύτταρα που είχαν διηθήσει πλήρως τη ζελατίνη και είχαν προσκολληθεί στη μεμβράνη μονιμοποιήθηκαν και βιάφτηκαν με Diff-Quick[®] (Dade Behring). Τα βαμμένα κύτταρα μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40x) με χρήση πλέγματος ισοαπεχόντων γραμμών. Σε κάθε πείραμα, η δοκιμασία εφαρμόστηκε εις τριπλούν για κάθε τύπο κυττάρων, ενώ τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

6.19. Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης καλλικρεϊνών στην ανάπτυξη καρκίνου σε ζωικό μοντέλο

Για τη μελέτη της επίδρασης των καλλικρεϊνών στη διαδικασία καρκινογένεσης, 10^7 διαμολυσμένα κύτταρα, διαλυμένα σε 300μl PBS εισήχθησαν με ένεση στην περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικών που στερούνταν θύμου αδένα (nu/nu). Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υγιή, θηλυκά ποντίκια ηλικίας 9 εβδομάδων. Για κάθε τύπο διαμολυσμένων κυττάρων (OV-KLK7, OV-KLK5+7, OV-KLK4+5+6+7) μολύνθηκαν 14 ποντίκια, ενώ για την ομάδα ελέγχου μολύνθηκαν 17 πόντίκια. Μετά από 64 ημέρες, όγκοι είχαν αναπτυχθεί στην περιτοναϊκή κοιλότητα των ζώων. Τότε, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και αφαιρέθηκαν όλα τα ενδοπεριτοναϊκά τους όργανα, μαζί με το διάφραγμα και το κοιλιακό τοίχωμα. Μετρήθηκε η συνολική μάζα των αφαιρεμένων οργάνων και εν συνεχεία αφαιρέθηκαν όλοι οι ορατοί όγκοι από τα όργανα αυτά. Αφού μετρήθηκε η μάζα και των όγκων, υπολογίστηκε ο συντελεστής ογκογένεσης, ως ο λόγος των δύο μαζών. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκφραση των καλλικρεϊνών σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε ανίχνευσή τους με ειδικές ELISA στο υπερκείμενο και το κυτοσόλιο των κυττάρων πριν από την ένεσή τους στα πειραματόζωα, στον ορό του αίματος των ποντικών, στον ασκίτη της περιτοναϊκής κοιλότητας αλλά και στον καρκινικό ιστό που αναπτύχθηκε. Ο καρκινικός ιστός αρχικά παγώθηκε σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία κονιορτοποιήθηκε, αναδιαλύθηκε σε διάλυμα TBS, pH 8.5, 1% (v/v) Triton X-100, και φυγοκεντρήθηκε (60min, 13000g, 4°C). Η ολική πρωτεΐνη μετρήθηκε στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης με χρήση της δοκιμασίας ποσοτικοποίησης BCA[™] (Pierce, Rockford, IL, ΗΠΑ), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι μετρήσεις ELISA πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Παθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Mount Sinai, στο Τορόντο του Καναδά, από την ερευνητική ομάδα του Καθ. Ε.Π. Διαμαντή.

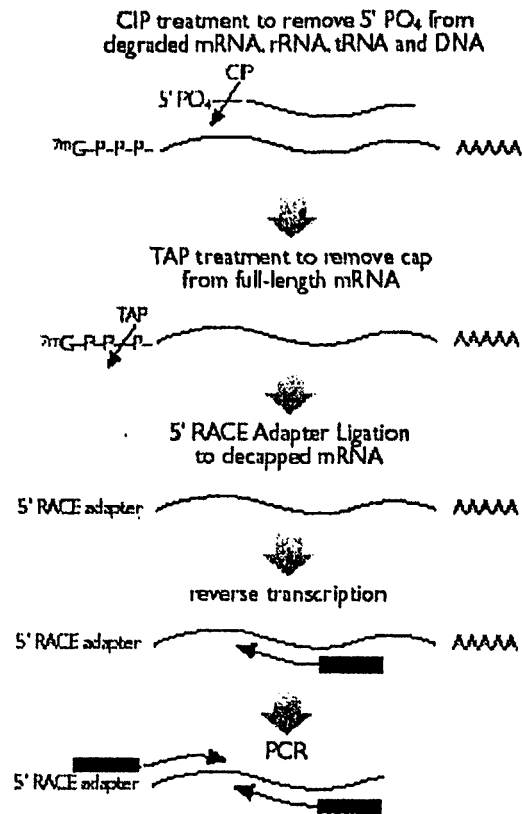


6.20. Ανίχνευση του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου KLK7 με ταχεία επάυξηση του 5' άκρου του cDNA (5' RACE)

Η ανίχνευση του σημείου εκκίνησης της μεταγραφής της καλλικρεΐνης 7 πραγματοποιήθηκε με την τεχνική 5' RACE. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το προϊόν First Choice RLM-RACE (Ambion, Austin, Texas, USA). Η αρχή της μεθόδου παρουσιάζεται στο σχήμα 6.2. 10μg ολικού RNA επώαστηκαν με αλκαλική εντερική φωσφατάση μοσχαριού (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) για μία ώρα στους 37°C προκειμένου να απομακρυνθούν οι ελεύθερες 5'-φωσφορικές ρίζες από τα τεμαχισμένα μόρια mRNA, rRNA, tRNA και το γενωμικό DNA. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη οξικού αμμωνίου, τα ακέραια μόρια mRNA εκχυλίστηκαν με 1 όγκο φαινόλης:χλωροφορμίου και καταβυθίστηκαν με 1 όγκο ισοπροπανόλης. Το RNA επώαστηκε με όξινη πυροφωσφατάση του καπνού (Tobacco Acid Pyrophosphatase, TAP) για μία ώρα στους 37°C προκειμένου να απομακρυνθεί η καλύπτρα (cap) από τα ακέραια μόρια mRNA, αφήνοντας ελεύθερο μονό 5'-φωσφορικό οξύ. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης του 5'-άκρου του mRNA με ένα ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογέα RNA 45 βάσεων (προσαρμογέας 5'-RACE), με επάωση με T4 RNA λιγάση στους 37°C για μία ώρα. Κατά την αντίδραση σύνδεσης, η πλειοψηφία των ακέραιων και χωρίς καλύπτρα μορίων mRNA αποκτούν την αλληλουχία-προσαρμογέα στο 5'-άκρο τους. Η αλληλουχία αυτή δεν μπορεί να συνδεθεί με το αποφωσφορυλιωμένο RNA, λόγω της απουσίας του απαραίτητου 5'-φωσφορικού οξέως από τα μόρια αυτά. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με χρήση τυχαίων δεκαμερών ως εκκινητών και αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV, για μία ώρα στους 42°C επέτρεψε τη μετατροπή του mRNA σε cDNA. Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε δύο γύρους με εξωτερικό και εσωτερικό ζεύγος εκκινητών (nested PCR) επιτεύχθηκε ο πολλαπλασιασμός του 5'-άκρου του μεταγράφου. Ως εξωτερικοί εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο εξωτερικός εκκινητής 5'-RACE και ο εκκινητής hsII, ενώ ως εσωτερικοί εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο εσωτερικός εκκινητής 5'-RACE και ο εκκινητής GSPII (πίνακας 6.1). Οι παράμετροι των αντιδράσεων περιλάμβαναν αρχικό βήμα ολικής αποδιάταξης 3 min στους 94°C, 35 κύκλους (94°C για 30sec, 60 για 30sec, 72°C για 30sec) και βήμα τελικής επιμήκυνσης των μορίων στους 72°C για 7min. Το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης, όπου υπολογίστηκε το μέγεθος του σε σχέση με δείκτη διαφόρων μοριακών μεγεθών DNA. Κατάλληλη ποσότητα DNA απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης με την τυποποιημένη δοκιμασία απομόνωσης DNA (Invitrogen) και υποβλήθηκε σε αντίδραση προσδιορισμού της αλληλουχίας (sequencing), προκειμένου να προσδιοριστεί το ακριβές σημείο έναρξης της μεταγραφής.



5' RLM-RACE



Σχήμα 6.2: Επισκόπηση της διαδικασίας 5' RLM-RACE



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



7.1. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές – Επίδραση χημειοφαρμάκων

Διερευνήθηκε η έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 σε μία ομάδα 33 κυτταρικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης. Από αυτές, οι 18 ήταν καρκινικές σειρές προερχόμενες από καρκίνους σχετιζόμενους με το φύλλο, οι 14 προέρχονται από διάφορους μη σχετιζόμενους με το φύλλο καρκίνους και μία σειρά ήταν μη καρκινική, αλλά αθανатоποιημένη, επιδερμικής προελεύσεως (Πίνακας 7.1). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε RT-PCR με χρήση των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων k7ex2f και k7ex4r (Πίνακας 6.1). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (με χρήση των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων actinf και actinr). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.

Κύτταρα ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων			Κύτταρα μη-ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων		
Κυτταρική σειρά	Ιστός Προέλευσης	Έκφραση KLK7	Κυτταρική σειρά	Ιστός Προέλευσης	Έκφραση KLK7
MCF7	Μαστικός Αδένας	+	U-251 MG	Εγκέφαλος	-
AMCF7		-	D-54		-
MCF-10A		-	SH-SY5Y		++
T-47D		-	HL60	Προ-μυελοβλάστες	++
BT-474		-	Molt-4	T-λεμφοβλάστες	-
ZR-75-1		+	Raji	B λεμφοκύτταρα	+
MDA-MB-231		-	Daudi	B-λεμφοβλάστες	+
MDA-MB-435S		-	U-937	Μακροφάγα	+
ES-2		Ωοθήκη	++	K562	Μυελός οστών
TOV-21G	+		HT1080	Άγνωστο	+
Caov-3			FM-3		+
MDAH 2774	++		HCT 116	Έντερο	+++
OV-MZ-6	-		HT-29		+++
OV-MZ-10	+		HTB-161		++
NIH:OVCAR-3					
SK-UT-1B	Μήτρα	++	Μη καρκινικά κύτταρα		
HeLa		-	HaCaT	Κερατινοκύτταρα	++
PC-3	Προστάτης	+++			

Πίνακας 7.1: Καρκινικές και μη, ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και έκφραση της καλλικρεΐνης 7.



7.2. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο του Μαστού

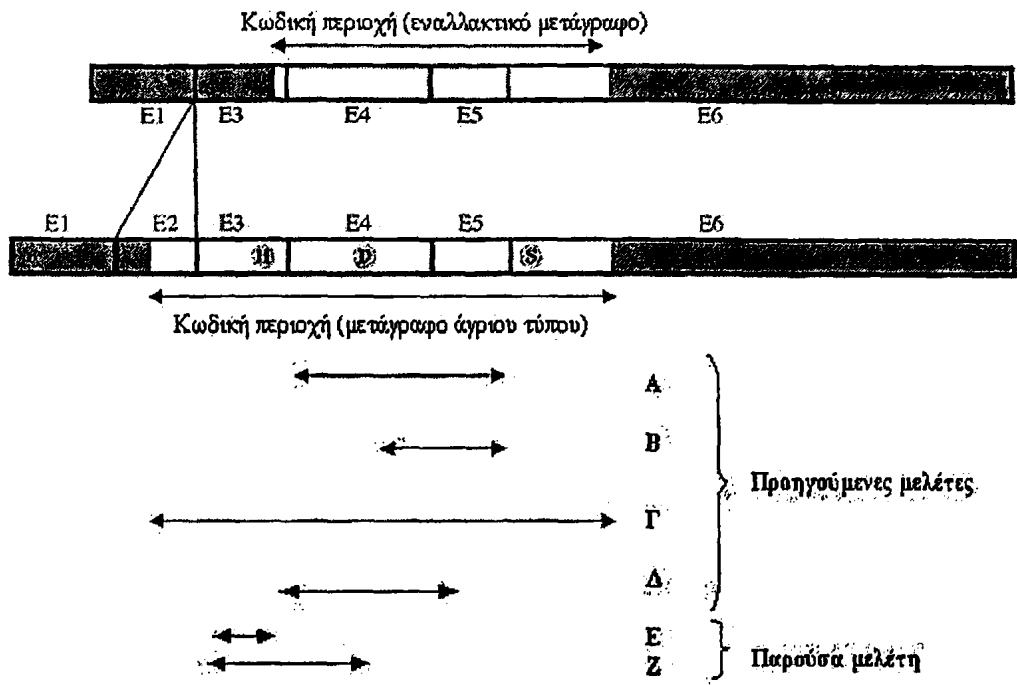
Μελετήθηκε η κλινική σημασία της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του μαστού. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε ποσοτική μέθοδος PCR (Real Time), για τον ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA της KLK7. Παράλληλα, με χρήση ποιοτικής μεθόδου PCR, μελετήθηκε η συν-έκφραση των καλλικρεΐνών 5 και 7 και η κλινική σημασία αυτής στην εξέλιξη της υγείας των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

7.2.1. Ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου PCR για τη μέτρηση του mRNA της καλλικρεΐνης 7

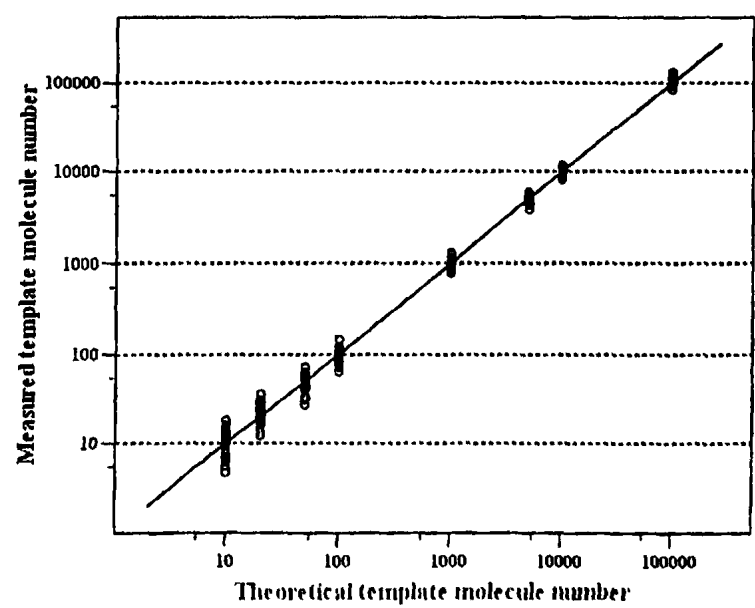
Για την ποσοτικοποίηση του mRNA της καλλικρεΐνης 7, αναπτύχθηκε ευαίσθητη μέθοδος ποσοτικής μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, με χρήση της τεχνολογίας Light Cycler. Το γονίδιο της καλλικρεΐνης 7 αποτελείται από 6 εξόνια (E1-E6). Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τρία μετάγραφα της KLK7 (Kurlender *et al*, 2005). Το ένα εξ' αυτών δεν περιέχει το εξόνιο 2 (Dong *et al*, 2003) και, επομένως, κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο χωρίς τις αμινοτελικές αλληλουχίες των καλλικρεΐνών που ρυθμίζουν την έκκριση και ενεργοποίησή τους, αλλά και χωρίς την αλληλουχία που περιλαμβάνει το κωδικόνιο της His⁵⁷ της καταλυτικής τριάδας (Σχήμα 7.1). Δηλαδή, το κωδικοποιούμενο πολυπεπτίδιο αποκλείεται να παρουσιάζει ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης. Επιπλέον, στο συγκεκριμένο μετάγραφο, υπάρχουν 4 εκτός πλαισίου κωδικόνια ATG στην αλληλουχία άνωθεν του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης που παρουσιάζει ομολογία προς την hK7. Επομένως είναι μάλλον απίθανη η μετάφραση του μεταγράφου αυτού σε ένα πολυπεπτίδιο όμοιο προς την καλλικρεΐνη 7. Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκαν μόνο τα μετάγραφα της KLK7 που κωδικοποιούν για την ενεργή hK7. Αυτό επιτεύχθηκε με σχεδιασμό μορίου εκκινητή που υβριδίζει στη μοναδική αλληλουχία που σχηματίζεται από την ένωση των εξονίων 2 και 3. Το δεύτερο μόριο εκκινητή υβριδίζει στο εξόνιο 3 (Σχήμα 7.1). Αντίθετα, οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα για την ανάλυση πιθανής συσχέτισης της έκφρασης της KLK7 με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους σε διάφορους τύπους καρκίνου ανιχνεύουν αδιακρίτως όλα τα μετάγραφα εκτός από τον Planque και συνεργάτες (2005) (Σχήμα 7.1).

Καθώς το 5' εκκινητικό μόριο υβριδίζει στην ένωση των εξονίων 2-3, αποκλείστηκε η πιθανότητα πολλαπλασιασμού γενωμικού DNA. Για την παραγωγή των καμπυλών αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τριχοειδή αγγεία επιστρωμένα με προκαθορισμένους αριθμούς αντιγράφων (από 10 έως 10⁵) του φορέα έκφρασης pRc/RSV-KLK7, ο οποίος περιείχε το cDNA όλης της κωδικής περιοχής του μεταγράφου αγρίου τύπου της KLK7. Ο ακριβής αριθμός των αντιγράφων προσδιορίστηκε βαθμονόμηση με HPLC (Köhler *et al*, 1999). Έτσι, αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης του mRNA της KLK7 μεγάλης ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας (σχήμα 7.2).

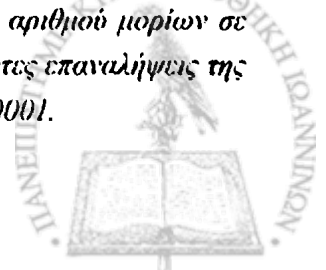




Σχήμα 7.1: Ποσοτική μέθοδος PCR για την KLK7. Το γονίδιο της KLK7 αποτελείται από 6 εξόνια (E1-E6), πέντε εκ των οποίων περιέχουν κωδικές περιοχές. Ράβδοι με άσπρο χρώμα: κωδικές περιοχές, ράβδοι με γκρι χρώμα: μη κωδικές περιοχές, H, D, S: κατάλοπα ιστιδίνης, σερίνης και ασπαρτικού οξέους που σχηματίζουν την καταλυτική τριάδα. Προϊόντα PCR που μελετήθηκαν σε προηγούμενες εργασίες: A: Talieri et al, 2004, B: Kyriakoroulou et al, 2003, Γ: Planque et al, 2005, Δ: Santin et al, 2004. Προϊόντα PCR που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία: E: ποσοτική μέθοδος PCR και Z: ποιοτική μέθοδος PCR.



Σχήμα 7.2: Καμπύλες αναφοράς της αντίδρασης PCR με τη μέθοδο Light-Cycler για ποσοτική μέτρηση του mRNA της καλλικρεΐνης 7. Οι καταγραφές του μετρούμενου αριθμού μορίων σε σχέση με το θεωρητικό αριθμό μορίων mRNA εξήχθησαν από 33 ανεξάρτητες επαναλήψεις της PCR. Η συσχέτιση των τιμών είναι $r=0,99$ με βαθμό σημαντικότητας $p<0,0001$.



Για τον έλεγχο της ειδικότητας της ποσοτικής μεθόδου PCR που αναπτύχθηκε, δύο κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού (MDA-MB-231 και aMCF-7) και η κυτταρική σειρά καρκίνου των ωοθηκών OVMZ-6 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pRc/RSV, στο οποίο κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια KLK5 και/ή KLK7. Οι κυτταρικές σειρές διαμολύνθηκαν επίσης μόνο με το πλασμίδιο. Η ανάλυση της έκφρασης του mRNA της KLK7 πραγματοποιήθηκε στις σειρές αυτές, αλλά και την αθανατοποιημένη σειρά κερατινοκυττάρων, HaCaT. Η σειρά αυτή χρησιμοποιήθηκε, επειδή είναι γνωστό ότι η ανθρώπινη επιδερμίδα εκφράζει υψηλά επίπεδα της καλλικρεΐνης 7 (Hansson *et al*, 1994). Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.2, η κυτταρική σειρά HaCaT εκφράζει διακριτά επίπεδα της KLK7, ενώ στις καρκινικές σειρές η έκφραση είναι μόλις ανιχνεύσιμη. Αυξάνει όμως σημαντικά στις κυτταρικές σειρές που έχουν διαμολυνθεί με το φορέα έκφρασης της KLK7. Διασταυρωτή αντίδραση με το mRNA της KLK5 δεν παρατηρήθηκε, ακόμη και όταν αυτό υπερεκφράστηκε με το φορέα έκφρασης.

Κυτταρική σειρά	Προέλευση	Επίπεδο έκφρασης
HaCaT	δέρμα	25
MDA-231	μαστός	< 1
MDA-231+RSV	μαστός	< 1
MDA-231+KLK7	μαστός	211
aMCF-7	μαστός	< 1
aMCF-7+RSV	μαστός	< 1
aMCF-7+KLK5	μαστός	< 1
aMCF-7+KLK7	μαστός	336
OVMZ-6	ωοθήκη	< 1
OVMZ-6+RSV	ωοθήκη	< 1
OVMZ-6+KLK5	ωοθήκη	< 1
OVMZ-6+KLK5+KLK7	ωοθήκη	224
OVMZ-6+KLK7	ωοθήκη	479

Πίνακας 7.2: Ποσοτικοποίηση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 σε κυτταρικές σειρές. Οι δύο κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού (MDA-231 και aMCF-7 και η μία σειρά από καρκίνο των ωοθηκών (OVMZ6) διαμολύνθηκαν με το φορέα κλωνοποίησης pRcRSV μόνο ή φέροντα το cDNA της KLK7. Το επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK7 είναι κανονικοποιημένο προς το γονίδιο σταθερής έκφρασης G6PDH (2mol KLK7/amol h-G6PDH).



7.2.2. Έκφραση του mRNA της KLK7 σε δείγματα καρκίνου του μαστού και συσχέτισή της με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους

Μετρήθηκε η έκφραση του μεταγράφου άγριου τύπου της καλλικρεΐνης 7 σε 155 δείγματα από καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με το λόγο της έκφρασης του mRNA της KLK7 προς την έκφραση του mRNA του γονιδίου σταθερής έκφρασης G6PDH (zmol KLK7/amol h-G6PDH). Η διάμεσος τιμή της έκφρασης ήταν 2,6 και το ενδοτεταρτομοριακό εύρος (interquartile range) 9,4. Η κατανομή των τιμών της έκφρασης της KLK7 ήταν λογαριθμική-κανονική, καθώς η κατανομή του λογαρίθμου τους ($10 \cdot \lg[\text{zmol KLK7/amol h-G6PDH}]$) δεν παρουσίαζε απόκλιση από την κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov-Test διορθωμένο κατά Lilliefors κατόπιν λογαριθμικού μετασχηματισμού: $p \geq 0.200$). Όλες οι επακόλουθες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τις λογαριθμικά μετασχηματισμένες τιμές. Η διάμεσος των τιμών αυτών ήταν 4,1, η τυπική απόκλιση 9,4 και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (interquartile range) 11,6.

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK7 και των κλινικών ή ιστολογικών-μορφολογικών παραμέτρων των όγκων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, η κατάσταση των λεμφαδένων (LN), το μέγεθος του όγκου (pT), ο βαθμός διαφοροποίησης (κατά Bloom-Richardson), η κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) και η κατάσταση του υποδοχέα προγεστερόνης (PgR), αναλύθηκε με εφαρμογή του παραμετρικού T-test. Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK7 και της συμπληρωματικής θεραπείας αναλύθηκε με εφαρμογή του τεστ One-way ANOVA. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.3, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 σε όγκους που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων ($p=0.001$). Πλην τούτου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με άλλη κλινική ή ιστολογική-μορφολογική παράμετρο.

7.2.3. Συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης του mRNA της KLK7 με την ελεύθερα υποτροπής επιβίωση (DFS)

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης Cox μίας μεταβλητής για τον έλεγχο της πιθανής συσχέτισης της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με την ελεύθερα υποτροπής επιβίωση των ασθενών. Βρέθηκε ότι η έκφραση της KLK7 ως συνεχούς μεταβλητής συσχετίζεται σημαντικά με μεγαλύτερη περίοδο DFS των ασθενών με καρκίνο του μαστού (hazard ratio=0.97, 95% διάστημα εμπιστοσύνης=0.94-0.99, $p=0.005$, Πίνακας 7.3). Έτσι, ο κίνδυνος υποτροπής ή θανάτου μειώνεται κατά περίπου 3% για κάθε μονάδα της λογαριθμικά μετασχηματισμένης έκφρασης της καλλικρεΐνης 7. Καθώς η έκφραση της KLK7 ως συνεχούς μεταβλητής βρέθηκε να διαθέτει σημαντική προγνωστική αξία, αποφασίστηκε η περαιτέρω διερεύνησή της κατόπιν μετατροπής της σε διακριτή μεταβλητή. Για το λόγο αυτό, υπολογίστηκε ένα βέλτιστο όριο διάκρισης, με βελτιστοποιημένη διχοτόμηση εντός του 30^{στω} και 70^{στω} εκατοστημορίου, με βάση την ικανότητα της KLK7 να προβλέπει την DFS. Το όριο

αυτό καθορίστηκε στην τιμή 2,5 ($10 \cdot \lg[\text{zmol KLK7}/\text{amol h-G6PDH}]$). Με βάση αυτό το όριο, οι 155 ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο επίπεδα έκφρασης, χαμηλό ($\text{KLK7} \leq 2,5$) και υψηλό ($\text{KLK7} > 2,5$). Με τον τρόπο αυτό, 66 (42,6%) ασθενείς χαρακτηρίστηκαν χαμηλής έκφρασης KLK7 και 89 (57,4%) χαρακτηρίστηκαν υψηλής έκφρασης.

Μεταβλητή	Ασθενείς (%)	KLK7 ⁴ Μέση τιμή (σ^5)	Τιμή P
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση¹			0,250
προ/περι-	45 (29,0)	5,4 (1,5)	
μετα-	110 (71,0)	3,5 (0,9)	
Κατάσταση λεμφαδένων¹			0,059
Αρνητικοί	68 (43,9)	5,7 (1,0)	
Θετικοί	87 (56,1)	2,8 (1,1)	
Μέγεθος όγκου (pT)²			0,648
1	47 (30,3)	5,1 (1,4)	
2	87 (56,1)	3,7 (1,0)	
3/4	21 (13,6)	3,4 (2,0)	
Grade (Bloom-Richardson)¹			0,729
1/2	80 (51,6)	3,8 (0,9)	
3	75 (48,4)	4,3 (1,2)	
Κατάσταση υποδοχέα οιστρογόνων¹			0,001
Αρνητικοί	52 (33,5)	7,4 (1,4)	
Θετικοί	103 (66,5)	2,4 (0,8)	
Κατάσταση υποδοχέα προγεστερόνης¹			0,211
Αρνητικοί	62 (40,0)	5,3 (1,4)	
Θετικοί	93 (60,0)	3,2 (0,9)	
Συμπληρωματική θεραπεία⁵			0,409
Ναι	69 (44,5)	4,8 (1,1)	
Όχι	86 (55,5)	3,5 (1,1)	

Πίνακας 7.3: Συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK7 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 155 ασθενείς με καρκίνο του μαστού. ¹ T-test, ² One-way ANOVA, ³ ενδοκρινική θεραπεία (n=49), χημειοθεραπεία (n=28) ή αμφότερες (n=9), ⁴ KLK7/h-G6PDH, ⁵ τυπικό σφάλμα.

Στον πίνακα 7.4 παραθέτονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης επιβίωσης για την έκφραση της KLK7 (ως συνεχούς ή διακριτής μεταβλητής) και άλλες κλινικές και ιστολογικές-μορφολογικές παραμέτρους, με εφαρμογή ανάλυσης Cox μίας μεταβλητής. Η συνεχής έκφραση της καλλικρεΐνης 7, το (διακριτό) επίπεδο έκφρασης της, αλλά και η κατάσταση των λεμφαδένων, ο βαθμός διαφοροποίησης και η συμπληρωματική θεραπεία παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση. Ασθενείς με θετικούς (με διήθηση από καρκινικά κύτταρα) λεμφαδένες παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη DFS σε σχέση με εκείνους που είχαν αρνητικούς (χωρίς



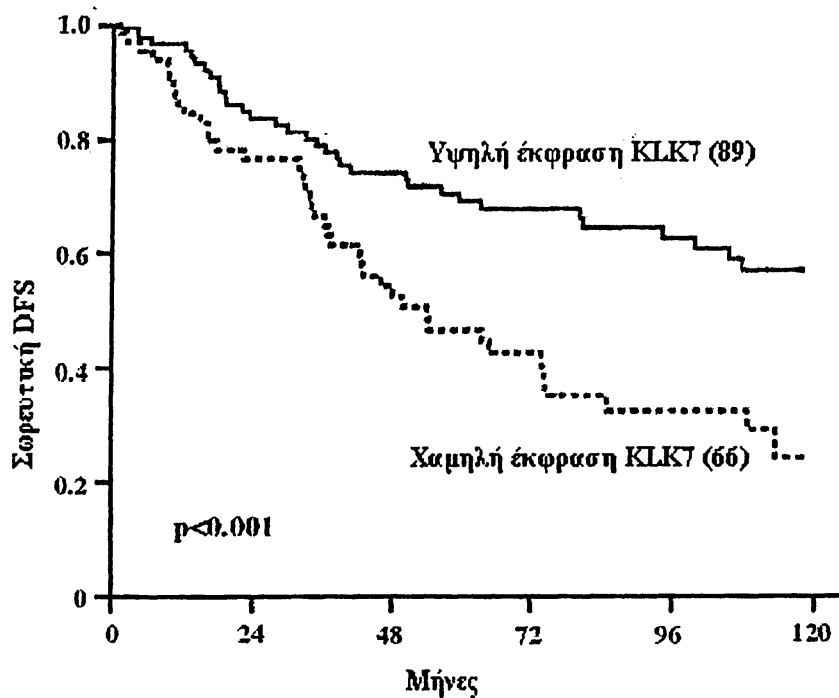
δήθηση) λεμφαδένες (hazard ratio: 2,09, p=0,003). Οι θετικοί λεμφαδένες είναι χαρακτηριστικό περισσότερο διηθητικών, και επομένως επικίνδυνων, όγκων (Gilcrease and Sahin, 2006). Η συμπληρωματική θεραπεία επίσης συσχετίστηκε με μικρότερη DFS (hazard ratio: 1,72, p=0,028). Συμπληρωματική θεραπεία χορηγείται σε ασθενείς που εμφανίζουν χαρακτηριστικά δυσμενούς κλινικής κατάστασης και πρόγνωσης.

Μεταβλητή	Ασθενείς (%)	ΣΓ ³ (%)	HR ⁴ (95% ΔΕ ⁵)	Τιμή P
Έκφραση της KLK7 ¹ συνεχής	155 (100)	73 (47,1)	0,97 (0,94-0,99)	<u>0,005</u>
Επίπεδο mRNA της KLK7¹			0,45 (0,28-0,71)	<u>0,001</u>
Υψηλό (KLK7 > 2,5)	89 (57,4)	33 (37,1)		
Χαμηλό (KLK7 ≤ 2,5)	66 (42,6)	40 (60,6)		
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση			0,81 (0,49-1,32)	0,389
προ/περι- μετα-	45 (29,0) 110 (71,0)	23 (51,1) 50 (45,5)		
Κατάσταση λεμφαδένων			2,09 (1,28-3,42)	<u>0,003</u>
Αρνητικοί Θετικοί	68 (43,9) 87 (56,1)	24 (35,3) 49 (56,3)		
Μέγεθος όγκου ως διακριτή μεταβλητή			1,41 (0,99-2,01)	0,055
1 2 3/4	47 (30,3) 87 (56,1) 21 (13,6)	19 (40,4) 42 (48,3) 12 (57,1)		
Grade (Bloom-Richardson)			1,61 (1,01-2,55)	<u>0,045</u>
1/2 3	80 (51,6) 75 (48,4)	32 (40,0) 41 (54,7)		
Κατάσταση υποδοχέα οιστρογόνων			1,28 (0,77-2,12)	0,347
Αρνητικοί Θετικοί	52 (33,5) 103 (66,5)	21 (40,4) 52 (50,5)		
Κατάσταση υποδοχέα προγεστερόνης			1,06 (0,66-1,70)	0,801
Αρνητικοί Θετικοί	62 (40,0) 93 (60,0)	28 (45,2) 45 (48,4)		
Συμπληρωματική θεραπεία²			1,72 (1,06-2,78)	<u>0,028</u>
Ναι Όχι	69 (44,5) 86 (55,5)	26 (37,7) 47 (54,7)		
Ηλικία συνεχής	155 (100)	73 (47,1)	0,99 (0,97-1,01)	0,195

Πίνακας 7.4: Χαρακτηρισμός των δειγμάτων καρκίνου του μαστού σε σχέση με την ελεύθερα νόσου επιβίωση (DFS) των ασθενών με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας μεταβλητής (n=155). ¹ KLK7/h-G6PDH. ² ενδοκρινική θεραπεία (n=49), χημειοθεραπεία (n=28) ή αμφότερες (n=9). ³ συχνότητα γεγονότων. ⁴ hazard ratio (HR) που υπολογίστηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox. ⁵ διάστημα εμπιστοσύνης (CI) του υπολογιζόμενου hazard ratio.

(όπως διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μεγάλο μέγεθος όγκου), οπότε είναι αναμενόμενο να αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε η παρατήρηση ότι ασθενείς με υψηλό επίπεδο έκφρασης της KLK7 παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο κίνδυνο ($\text{hazard ratio}=0,45$, $p=0,001$) υποτροπής ή θανάτου σε σύγκριση με εκείνους που είχαν χαμηλή ($\leq 2,5$) έκφραση. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς με χαμηλό επίπεδο έκφρασης του mRNA πλήρους μήκους της καλλικρεΐνης 7 σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο έκφρασης (Σχήμα 7.3, \log rank test: $p<0.001$).

Σχήμα 7.3: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του mRNA της καλλικρεΐνης 7 σε ασθενείς με



καρκίνο του μαστού. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής δείχνει ότι ασθενείς με χαμηλό επίπεδο έκφρασης της KLK7 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου (συνδυασμένη DFS).

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox πολλών μεταβλητών (Cox, 1972), όπου συμπεριλήφθηκε η συνεχής μεταβλητή της έκφρασης της KLK7 ή η διακριτή μεταβλητή του επιπέδου έκφρασης της KLK7 και όλες οι διαθέσιμες κλινικές και ιστολογικές-μορφολογικές παράμετροι (εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, κατάσταση των λεμφαδένων, μέγεθος του όγκου, βαθμός διαφοροποίησης, κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων και κατάσταση του υποδοχέα προγεστερόνης). Η συνεχής μεταβλητή της έκφρασης της KLK7 παρέμεινε ανεξάρτητος ισχυρός προγνωστικός δείκτης της συνδυασμένης επιβίωσης σε αυτή τη συλλογή δειγμάτων καρκίνου του μαστού. ($\text{Hazard Ratio}=0,97$, $p=0,046$, Πίνακας 7.5). Ομοίως, όταν στην ανάλυση συμπεριλήφθηκε η διακριτή μεταβλητή του επιπέδου έκφρασης της KLK7, και



αυτή αποδείχθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο ισχυρό προγνωστικό δείκτη της DFS (Hazard Ratio =0,50; p=0,005).

Μεταβλητή		HR ³ (95% ΔΕ ⁴)	Τιμή P
Έκφραση της KLK7 ¹	Συνεχής	0,97 (0,95-1,00)	0,046
Επίπεδο mRNA της KLK7 ²	Υψηλό έναντι χαμηλού	0,50 (0,31-0,81)	0,005

Πίνακας 7.5: Χαρακτηρισμός των δειγμάτων καρκίνου του μαστού σε σχέση με την ελεύθερα νόσου επιβίωση (DFS) των ασθενών με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας μεταβλητής (n=155). ¹ Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει τη συνεχή έκφραση της KLK7, την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, τη λεμφαδενική κατάσταση, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό του όγκου, την κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων, την κατάσταση του υποδοχέα προγεστερόνης, την Συμπληρωματική θεραπεία και την ηλικία, ² Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK7, την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, τη λεμφαδενική κατάσταση, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό του όγκου, την κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων, την κατάσταση του υποδοχέα προγεστερόνης, την Συμπληρωματική θεραπεία και την ηλικία ³ hazard ratio (HR) που υπολογίστηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox, ⁴ διάστημα εμπιστοσύνης (CI) του υπολογιζόμενου hazard ratio.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση τόσο της συνεχούς όσο και της διακριτής μεταβλητής της έκφρασης της KLK7 στην φυσική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, αποκλείστηκαν από τη συλλογή των δειγμάτων όλοι οι ασθενείς που είχαν υποστεί συμπληρωματική θεραπεία. Η υπο-ομάδα αυτή των ασθενών (n=86) αποκλείστηκε διότι είναι άγνωστος ο βαθμός στον οποίο η συμπληρωματική θεραπεία επηρέασε την πορεία της νόσου. Αντίθετα, η υπο-ομάδα των ασθενών που δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία (n=69) αποτελεί ένα πιο «καθαρό» σύστημα, επιτρέποντας την εξαγωγή πιο αξιόπιστων συμπερασμάτων σε σχέση με την σημασία της έκφρασης της KLK7 στον καρκίνο του μαστού. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας και πολλών μεταβλητών για την υπο-ομάδα αυτή με τον ίδιο τρόπο που έγινε και για ολόκληρη τη συλλογή. Βρέθηκε ότι η συνεχής μεταβλητή της έκφρασης της KLK7, αλλά και το υψηλό επίπεδο έκφρασης της στη διακριτή μεταβλητή συσχετίστηκαν σημαντικά με μεγαλύτερη περίοδο επιβίωσης των ασθενών, τόσο στην ανάλυση μίας μεταβλητής (συνεχής έκφραση της KLK7: Hazard Ratio =0,92, p=0,001, διακριτή έκφραση της KLK7: Hazard Ratio=0,29, p=0,002), όσο και στην ανάλυση πολλών μεταβλητών (συνεχής έκφραση της KLK7: Hazard Ratio =0,94, p=0,013, διακριτή έκφραση της KLK7: Hazard Ratio=0,29, p=0,002) (Πίνακας 7.6). Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής για την υπο-ομάδα των ασθενών που δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα, καταδεικνύοντας τη σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς με χαμηλό επίπεδο έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο έκφρασης (Σχήμα 7.4, log rank test: p=0,001).

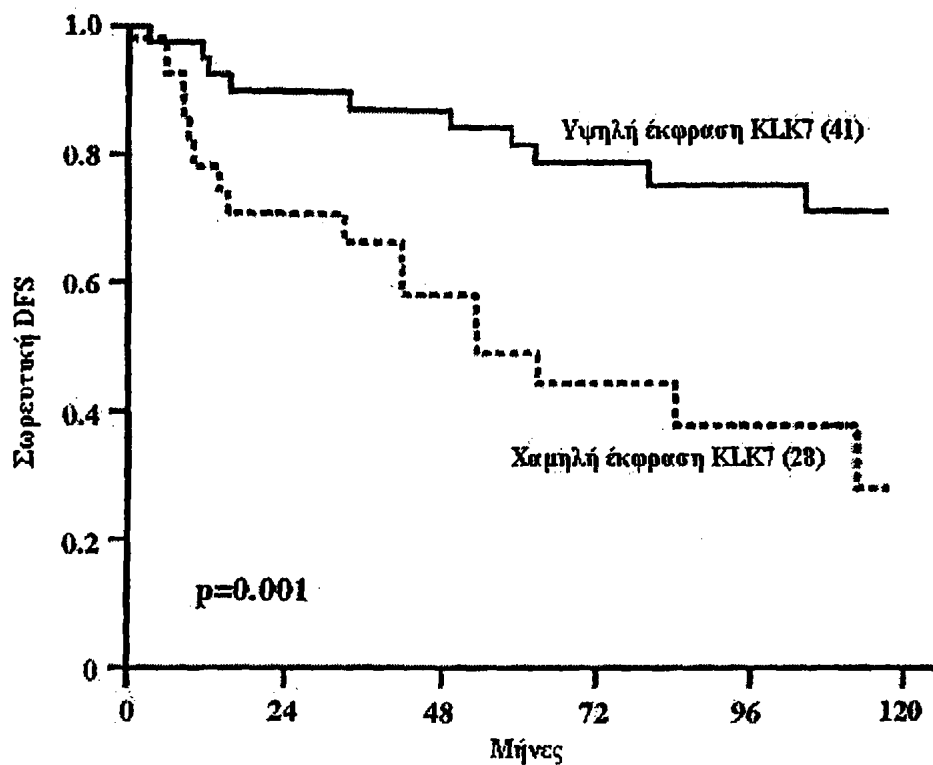


Συμπληρωματική θεραπεία	Άσθενείς	Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox			
		μίας μεταβλητής		πολλών μεταβλητών	
		HR ³ (95% ΠΕ ⁴)	Τιμή P	HR ³ (95% ΔΕ ⁴)	Τιμή P
<u>Μη συμπληρωματική θεραπεία</u>	69				
Συνεχής KLK7 ¹		0.92 (0.87-0.96)	<u>0.001</u>	0.94 (0.89-0.99)	<u>0.013</u>
Επίπεδο mRNA της KLK7 ²		0.29 (0.13-0.65)	<u>0.002</u>	0.40 (0.17-0.94)	<u>0.034</u>
Υψηλό	41				
Χαμηλό	28				
<u>Συμπληρωματική θεραπεία</u>	86				
Συνεχής KLK7 ¹		0.99 (0.96-1.02)	0.554	0.99 (0.96-1.03)	0.693
Επίπεδο mRNA της KLK7 ²		0.61 (0.34-1.09)	0.094	0.62 (0.33-1.16)	0.132
Υψηλό	48				
Χαμηλό	38				

Πίνακας 7.6: Χαρακτηρισμός των υπο-ομάδων ασθενών που έλαβαν ή όχι συμπληρωματική θεραπεία σε σχέση με την DFS, με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών. ¹ Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει τη συνεχή έκφραση της KLK7, την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, τη λεμφαδενική κατάσταση, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό του όγκου, την κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων, την κατάσταση του υποδοχέα προγεστερόνης, την Συμπληρωματική θεραπεία και την ηλικία. ² Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK7, την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, τη λεμφαδενική κατάσταση, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό του όγκου, την κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων, την κατάσταση του υποδοχέα προγεστερόνης, την Συμπληρωματική θεραπεία και την ηλικία. ³ hazard ratio (HR) που υπολογίστηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox. ⁴ διάστημα εμπιστοσύνης (CI) του υπολογιζόμενου hazard ratio.

Συνεπώς, οι δύο μεταβλητές με τις οποίες αναλύθηκε η έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του μαστού βρέθηκαν να είναι σημαντικοί κλινικοί δείκτες ευνοϊκής πρόγνωσης για την εξέλιξη της νόσου.





Σχήμα 7.4: Ανάλυση επιβίωσης στην υπο-ομάδα των ασθενών που δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία. Το υψηλό επίπεδο έκφρασης της *KLK7* σε ασθενείς αυτής της υπο-ομάδας συσχετίζεται σημαντικά με καλύτερη πρόγνωση συνδυασμένης επιβίωσης.

7.2.4. Μελέτη της παράλληλης έκφρασης του mRNA των καλλικρεϊνών 5 και 7 και της κλινικής της σημασίας

Έχει παρατηρηθεί ότι οι καλλικρεΐνες 5 και 7 εκφράζονται παράλληλα στα κύτταρα της επιδερμίδας (Komatsu *et al*, 2002, 2003). Η *hK7* μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την *hK5*, η οποία έχει προταθεί και ως φυσιολογικός ενεργοποιητής της (Eckholm and Egelrud, 2000b, Brattsand *et al*, 2005). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφρασή των δύο καλλικρεϊνών στον καρκίνο των ωθηκών είναι συντονισμένη (Dong *et al*, 2003).

Μελετήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση των καλλικρεϊνών 5 και 7 σε ομάδα 80 δειγμάτων από ασθενείς πρωτογενή καρκίνο του μαστού, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κοινό πρότυπο έκφρασης των δύο γονιδίων. Τα χαρακτηριστικά αυτών των ομάδων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.7. Ως εκκινητικά μόρια χρησιμοποιήθηκαν τα *K5ex3f* και *K5ex5r* για την καλλικρεΐνη 5 και τα *K7ex2f* και *K7ex4r* για τον πολλαπλασιασμό της καλλικρεΐνης 7. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Κατόπιν ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή αгарόζης, τα προϊόντα της PCR φωτογραφήθηκαν με το ψηφιακό σύστημα φωτογράφισης Gel Logic 100 Imaging System. Ανάλογα με την εμφάνιση ζώνης, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως θετικά ή αρνητικά. Εν συνεχεία μελετήθηκε η

συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με εκείνη της καλλικρεΐνης 5 και τις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους της ομάδας μελέτης.

Μεταβλητή	Μέση τιμή ± T.Σ.	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50	75	90
Ηλικία (έτη)	63,23±1,57	35-88	46	50,5	65	74	80
Μέγεθος όγκου (cm)	2,89±0,19	0,30-8,00	1,50	1,80	2,50	3,30	5,00
Λεμφαδένες	2.8±0.6	0-19	0	1,3	3,1	4	7
Υποδοχείς Οιστρογόνων (fmol/mg πρωτεΐνης)	55.6±12.7	0.0-438.0	4,0	24,4	59,0	184,2	359,7
Υποδοχείς Προγεσ/νης (fmol/mg πρωτεΐνης)	77.7±16.9	0.0-634.0	2,3	25,0	91,5	183,8	235,2
Ελευθέρα νόσου επιβίωση (μήνες)	26,4±2,4	0-72	5,1	9,0	27,0	40,0	50,0
Ολική επιβίωση (μήνες)	26,2±2,4	0-72	5,1	9,0	27,0	42,5	50,0

Πίνακας 7.7: Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών στην ομάδα μελέτης. TΣ: τυπικό σφάλμα.

Από τα 80 δείγματα ασθενών τα με καρκίνο του μαστού, τα 50 (62,5%) ήταν θετικά για την καλλικρεΐνη 5. Το αντίστοιχο νούμερο για την καλλικρεΐνη 7 ήταν αρκετά χαμηλότερο, καθώς μόλις 26 (32,5%) δείγματα ήταν θετικά. Παρατηρήθηκε όμως, ότι η μεγάλη πλειονότητα των θετικών σε καλλικρεΐνη 7 δειγμάτων (τα 22/26 δείγματα, ή 84,6%) ήταν θετικά και για την καλλικρεΐνη 5. Στατιστική ανάλυση με Fisher's Exact Test απέδειξε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση της έκφρασης των δύο γονιδίων ($p=0.04$) (Πίνακας 7.8). Δηλαδή, με στατιστικά μεγάλη βεβαιότητα, η καλλικρεΐνη 7 εκφράζεται σε δείγματα που εκφράζουν και την καλλικρεΐνη 5. Μάλιστα, φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση και στο επίπεδο έκφρασης των δύο γονιδίων, αν και η συγκεκριμένη μελέτη ήταν κυρίως ποιοτική (Τεστ χ^2 , $p=0.009$) (Πίνακας 7.10)

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK7 και των κλινικών ή ιστολογικών-μορφολογικών παραμέτρων των όγκων παρουσιάζεται στον πίνακα 7.8. Για τη συσχέτιση με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων, των υποδοχέων προγεστερόνης και την κατάσταση των λεμφαδένων (LN), εφαρμόστηκε το Fisher's Exact Test. Η συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης (κατά Bloom-Richardson) πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Τεστ χ^2 . Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.8, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της καλλικρεΐνης 7 και της καλλικρεΐνης 5, καθώς και μεταξύ των δειγμάτων που δεν εκφράζουν την καλλικρεΐνη 7 με εκείνα που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων



($p=0.04$). Πλην τούτων, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με άλλη κλινική ή ιστολογική-μορφολογική παράμετρο.

Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		Θετική KLK7	Αρνητική KLK7	
Έκφραση του mRNA της KLK5				
Θετική	50	22 (44)	28 (56)	0,04 ¹
Αρνητική	30	4 (13,3)	26 (86,7)	
Υποδοχείς Οιστρογόνων³				
Θετικοί	45	13(28,8)	32 (71,1)	0,04 ¹
Αρνητικοί	14	9 (64,3)	5 (35,7)	
x	21			
Υποδοχείς προγεστερόνης³				
Θετικοί	45	14 (31,1)	31 (68,9)	0,569 ¹
Αρνητικοί	14	4 (28,6)	10 (71,4)	
x	21			
Κατάσταση Λεμφαδένων				
Θετικοί	34	25 (73,5)	9 (26,5)	0,176 ¹
Αρνητικοί	24	14 (58,3)	10 (41,7)	
x	22			
Βαθμός διαφοροποίησης				
I	3	1 (33,3)	2 (66,7)	0,905 ²
II	39	12 (30,8)	27 (69,2)	
III	22	8 (36,4)	14 (63,6)	
x	16			

Πίνακας 7.8: Συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK7 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 80 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, x: άγνωστη κατάσταση.

¹Fisher's Exact Test, ²Τεστ χ^2 , ³Όριο διάκρισης: ≤ 10 fmol/mg.

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK5 και των κλινικών ή ιστολογικών-μορφολογικών παραμέτρων των όγκων παρουσιάζεται στον πίνακα 7.9. Για τη συσχέτιση με την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, την κατάσταση των λεμφαδένων (LN) και την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων ή των υποδοχέων προγεστερόνης, εφαρμόστηκε το Fisher's Exact Test. Η συσχέτιση με το στάδιο κακοήθειας (κατά TNM) και το βαθμό διαφοροποίησης (κατά Bloom-Richardson) πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Τεστ χ^2 . Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.9, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 5 με όγκους που εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων ($p=0.04$). Πλην τούτου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 5 με άλλη κλινική ή ιστολογική-μορφολογική παράμετρο.



Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		Αρνητική KLK5	Θετική KLK5	
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση				
Προ/πέρι	13	5 (38,5)	8 (61,5)	0,99 ¹
Μέτα	51	19 (37,3)	32 (62,7)	
x	16			
Κατάσταση Λεμφαδένων				
Θετικοί	22	7 (31,8)	15 (68,2)	0,57 ¹
Αρνητικοί	34	14 (41,2)	20 (58,8)	
x	24			
Στάδιο Κακοήθειας				
I	10	3 (30,0)	7 (70,0)	0,84 ²
II	33	13 (39,4)	20 (60,6)	
III	12	4 (33,3)	8 (66,7)	
x	25			
Ιστολογική διαβάθμιση				
I	3	1 (33,3)	2 (66,7)	0,47 ²
II	38	17 (44,7)	21 (55,3)	
III	21	6 (28,6)	15 (71,4)	
x	18			
Υποδοχείς Οιστρογόνων³				
Θετικοί	40	18 (45,0)	22 (55,0)	0,018 ¹
Αρνητικοί	17	2 (11,8)	15 (88,2)	
x	21			
Υποδοχείς προγεστερόνης³				
Θετικοί	45	18 (42,9)	24 (57,1)	0,063 ¹
Αρνητικοί	14	2 (14,3)	12 (85,7)	
x	21			

Πίνακας 7.9: Συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK5 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 80 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, x: άγνωστη κατάσταση.
¹Fisher's Exact Test, ²Τεστ χ^2 , ³Όριο διάκρισης: ≤ 10 fmol/mg.

Εν συνεχεία μελετήθηκε περαιτέρω η συσχέτιση της έκφρασης των δύο καλλικρεϊνών. Με χρήση του Τεστ χ^2 , έγινε σύγκριση των υπο-ομάδων κάθε επιπέδου έκφρασης της καλλικρεϊνης 5 με τις αντίστοιχες υπο-ομάδες έκφρασης της καλλικρεϊνης 7 (Πίνακας 7.10). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0,009$), γεγονός που δείχνει ότι τα δύο γονίδια συσχετίζονται όχι μόνο ως προς την έκφραση, αλλά και ως προς το επίπεδο αυτής, καθώς αυξανόμενης της έκφρασης της καλλικρεϊνης 5, φαίνεται να αυξάνεται και η έκφραση της καλλικρεϊνης 7.

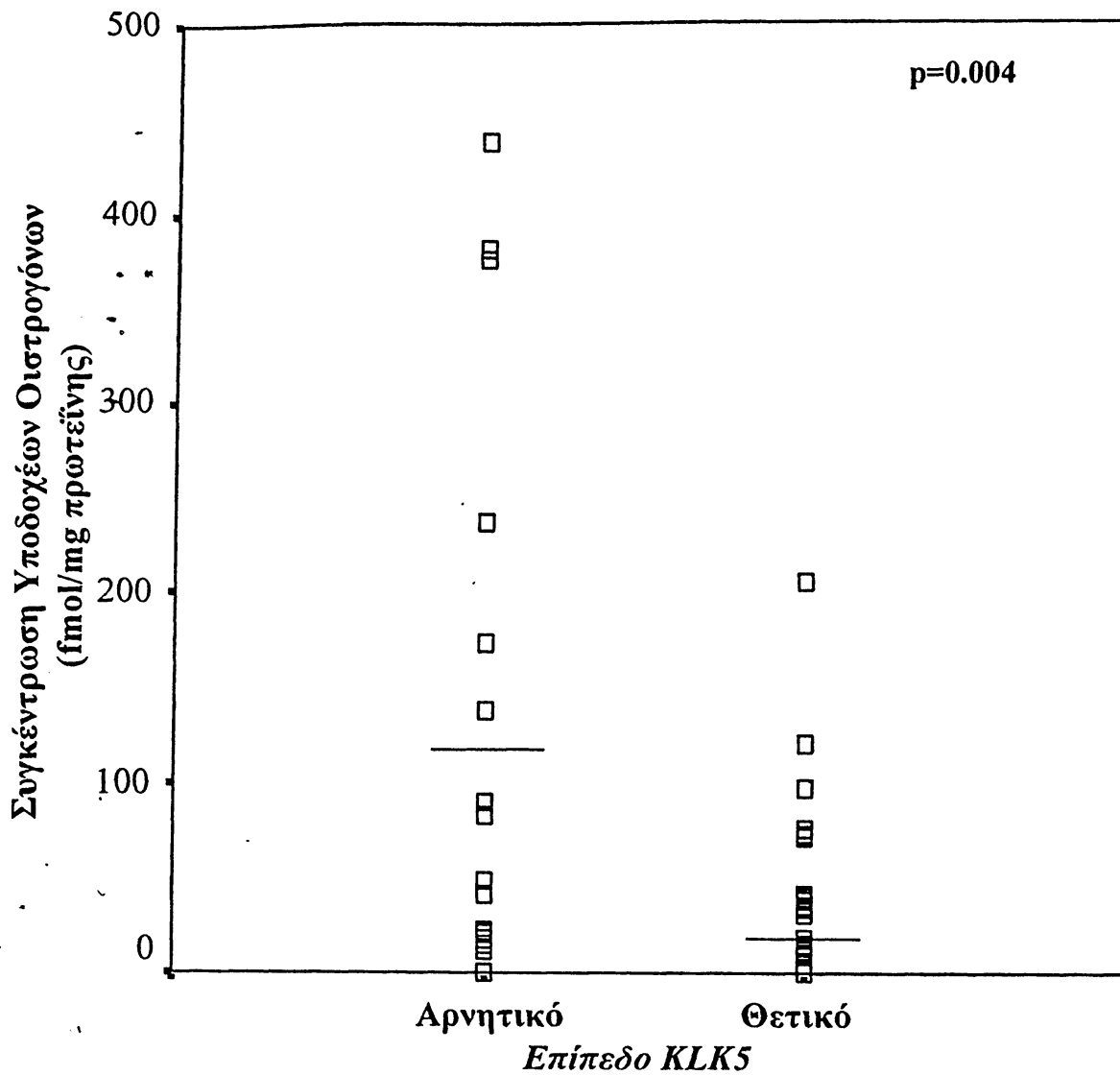


Έκφραση KLK7	Έκφραση KLK5				Σύνολο	
	Αρνητικά	1+	2+	3+		
Αρνητικά	26	15	9	4	54	p=0.009 ¹
1+	3	5	4	1	13	
2+	0	1	4	3	8	
3+	0	1	1	3	5	
Σύνολο	30	80	17	11	80	

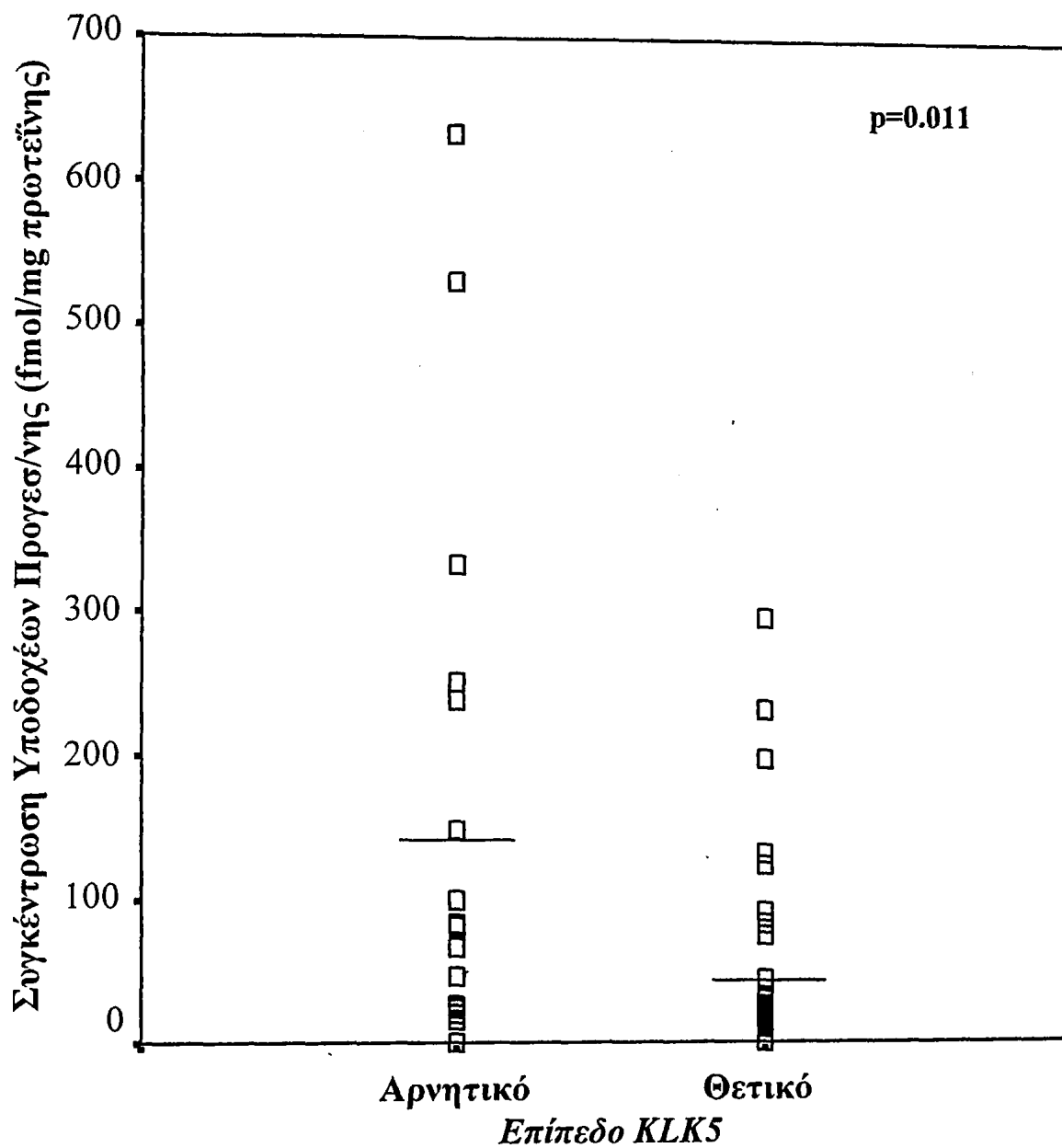
Πίνακας 7.10: Αναλυτική παρουσίαση της έκφρασης των καλλικρεϊνών 5 και 7 στα 80 δείγματα καρκίνου του μαστού. Με έντονο χρώμα παρουσιάζονται οι αριθμοί των δειγμάτων που είχαν ίδιο επίπεδο έκφρασης των δύο γονιδίων. Το επίπεδο έκφρασης χαρακτηρίστηκε ανάλογα με την ένταση των ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, ως αρνητικά, 1+, 2+ ή 3+. ¹Τεστ χ^2 .

Η συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της καλλικρεϊνης 5 και το επίπεδο των ορμονικών υποδοχέων διερευνήθηκε περαιτέρω με εφαρμογή του στατιστικού τεστ Mann-Whitney. Παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που εκφράζουν την καλλικρεϊνη 5 συσχετίζονται σημαντικά με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης τόσο των οιστρογονικών υποδοχέων (Σχήμα 7.5, p=0,004), όσο και των υποδοχέων προγεστερόνης (Σχήμα 7.6, p=0,011). Υπάρχει δηλαδή συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της KLK5 και την χαμηλή έκφραση των ορμονικών υποδοχέων. Η έλλειψη ορμονο-εξάρτησης θεωρείται δείκτης κακής πρόγνωσης για τις ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης (ελευθέρως νόσου και ολικής), με ανάπτυξη μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης μίας ή πολλών μεταβλητών, όπου συμπεριλήφθηκε η διακριτή μεταβλητή του επιπέδου έκφρασης της KLK7 και της KLK5, καθώς και όλες οι διαθέσιμες κλινικές και ιστολογικές-μορφολογικές παράμετροι (η κατάσταση των λεμφαδένων, το μέγεθος του όγκου και ο βαθμός διαφοροποίησης) (Πίνακας 7.11). Στοιχεία για την επιβίωση ήταν διαθέσιμα για 52 ασθενείς. Από αυτούς, 4 (7,7%) απεβίωσαν και 10 (19,2%) υποτροπίασαν. Στην ανάλυση μίας μεταβλητής, η θετική έκφραση της KLK5 παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με μικρότερη ολική (Hazard Ratio =7,50, p<0,001), αλλά και ελευθέρως νόσου (Hazard Ratio =2,40, p=0,020) επιβίωση. Οι ασθενείς δηλαδή που εκφράζουν την καλλικρεϊνη 5 διατρέχουν 2,40 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής και 7,50 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου από τους ασθενείς που δεν εκφράζουν το γονίδιο αυτό. Παρέμεινε δε ανεξάρτητος ισχυρός προγνωστικός δείκτης της ελευθέρως νόσου επιβίωσης (Hazard Ratio=11,5, p=0,040) και στην ανάλυση πολλών μεταβλητών. Αντίστοιχα, η θετική έκφραση της KLK7 παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με μεγαλύτερη ολική (Hazard Ratio =0,12, p=0,006), αλλά και ελευθέρως νόσου (Hazard Ratio =0,20, p=0,011) επιβίωση. Οι ασθενείς δηλαδή που εκφράζουν την καλλικρεϊνη 7 διατρέχουν 5 φορές μικρότερο κίνδυνο υποτροπής και περίπου 8 φορές μικρότερο κίνδυνο θανάτου από τους ασθενείς που δεν εκφράζουν το γονίδιο αυτό. Η ανάλυση πολλών μεταβλητών, ωστόσο, δεν επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα αυτά.



Σχήμα 7.5: Συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 5 με το επίπεδο έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Mann-Whitney τεστ.



Σχήμα 7.6: Συσχέτιση της έκφρασης της καλικρεΐνης 5 με το επίπεδο έκφρασης των υποδοχέων προγεστερόνης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Mann-Whitney test.

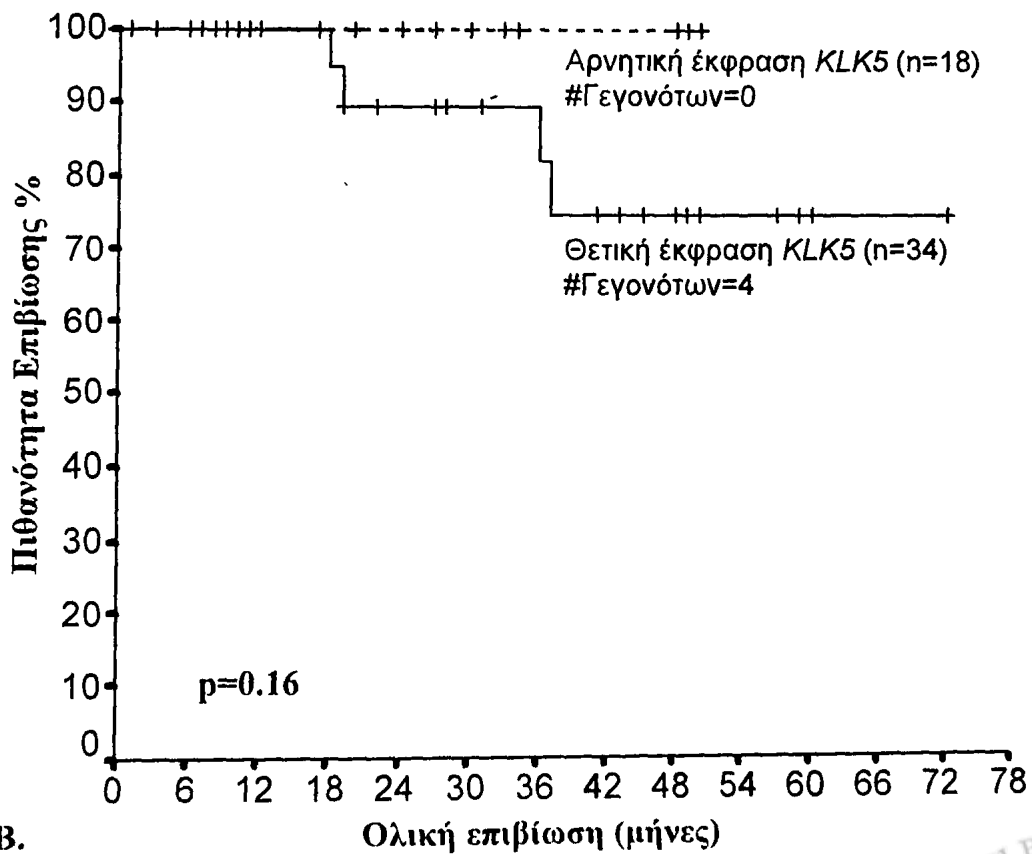
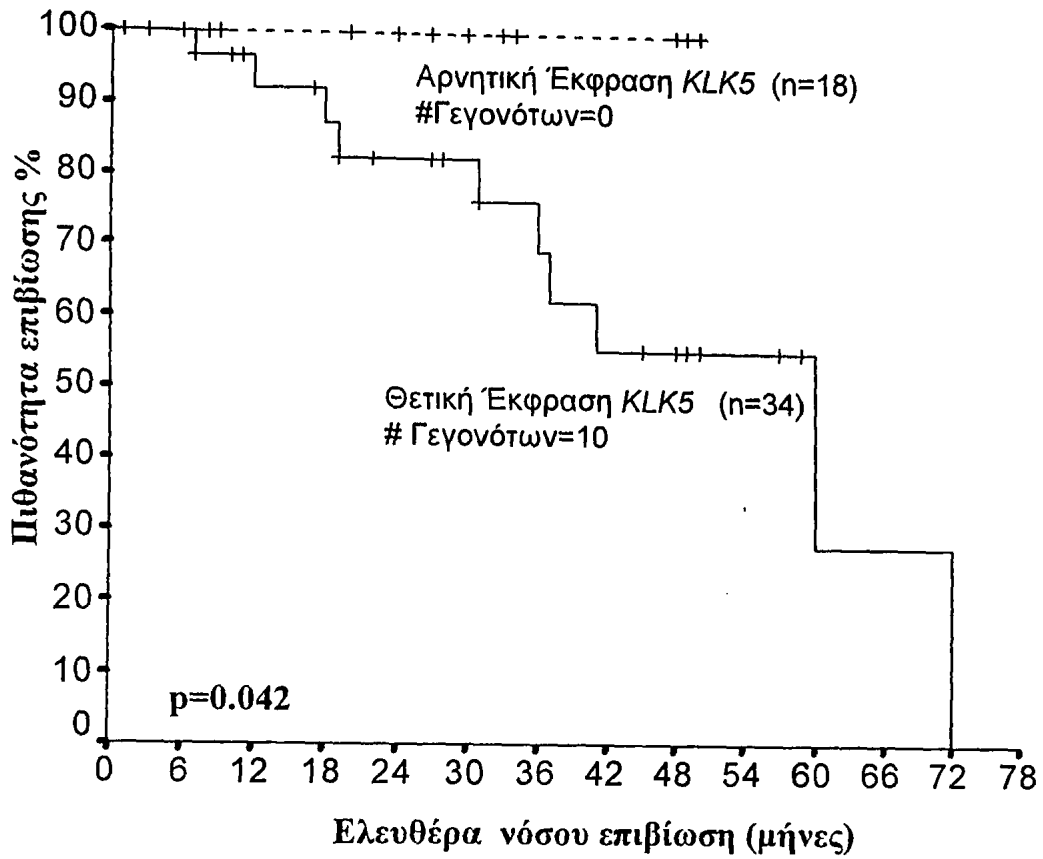


Μεταβλητή	Ελευθέρα Νόσου Επιβίωση			Ολική Επιβίωση		
	HR ^a	95% CI ^b	τιμή p	HR ^a	95% CI ^b	τιμή p
Ανάλυση μίας Μεταβλητής						
Έκφραση KLK5						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	2.40	1.15-5.02	0.020	7.50	2.64-21.28	<0.001
Έκφραση KLK7						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	0.20	0.06-0.69	0.011	0.12	0.03-0.54	0.006
Κατάσταση Λεμφαδένων	2.50	1.10-5.67	0.028	8.33	2.51-27.6	0.001
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)	1.71	1.27-2.30	<0.001	2.70	1.73-4.19	<0.001
Μέγεθος όγκου	1.29	1.06-1.57	0.012	1.91	1.38-2.66	<0.001
Ανάλυση πολλών Μεταβλητών						
Έκφραση KLK5						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	11.5	1.11-118.2	0.040	3.17	0.27-36.6	0.35
Έκφραση KLK7						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	0.63	0.09-4.38	0.64	0.69	0.08-6.08	0.74
Κατάσταση Λεμφαδένων	2.86	0.36-22.4	0.32	1.09	0.12-9.67	0.93
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)	8.77	1.79-43.05	0.007	5.13	1.14-23.07	0.033
Μέγεθος όγκου	1.53	0.82-2.85	0.18	1.26	0.64-2.48	0.51

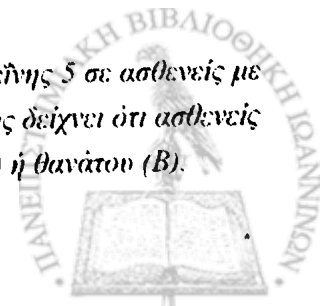
Πίνακας 7.11: Ανάλυση επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με την ελευθέρα νόσου και ολική επιβίωση, με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών.¹ Μοντέλο μίας μεταβλητής, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK5 ή της KLK7, την ηλικία, το μέγεθος του όγκου, και το βαθμό διαφοροποίησης.² Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK5 ή της KLK7, την ηλικία, το μέγεθος του όγκου και το βαθμό διαφοροποίησης.³ hazard ratio (HR) που υπολογίστηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox,⁴ διάστημα εμπιστοσύνης (CI) του υπολογιζόμενου hazard ratio.

Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς που εκφράζουν το mRNA πλήρους μήκους της καλλικρεΐνης 5 σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν αρνητική έκφραση του γονιδίου για την ελευθέρα νόσου, αλλά όχι και για την ολική επιβίωση (Σχήμα 7.7, A: log rank test: p=0.042, B: log rank test: p=0.16).





Σχήμα 7.7: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του mRNA της καλλικρεΐνης 5 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής δείχνει ότι ασθενείς που εκφράζουν την KLK5 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (Α) ή θανάτου (Β).



7.3. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι ο τέταρτος συνηθέστερος στις γυναίκες και ο πιο συχνός από τους γυναικολογικούς καρκίνους. Αν και εμφανίζεται γενικά στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, σε ηλικία >45 ετών, περίπου 30% των περιπτώσεων εμφανίζονται πριν την ηλικία των 40 ετών. Περισσότερο από 95% των καρκίνων της μήτρας εμφανίζονται στο ενδομήτριο, συνήθως ως αδenoκαρκίνωμα. Παραδόξως, και σε αντίθεση με άλλους γυναικολογικούς τύπους καρκίνου (όπως του μαστού και της ωοθήκης), δεν έχει μελετηθεί η κλινική αξία της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών στον καρκίνο του ενδομητρίου, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων (Santin *et al*, 2004)

Μελετήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ομάδα 43 δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο του ενδομητρίου, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το γονίδιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον καρκίνο αυτόν. Ως εκκινητικά μόρια χρησιμοποιήθηκαν τα K7ex2f και K7ex4r για τον πολλαπλασιασμό της καλλικρεΐνης 7. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Κατόπιν ηλεκτροφορήσεως σε πηκτική αгарόζης, τα προϊόντα της PCR φωτογραφήθηκαν με το ψηφιακό σύστημα φωτογράφησης Gel Logic 100 Imaging System. Ανάλογα με την εμφάνιση ζώνης, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως θετικά ή αρνητικά. Εν συνεχεία μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με τις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους της ομάδας μελέτης.

Από τα 43 δείγματα ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου, τα 17 (39,5%) ήταν θετικά για την καλλικρεΐνη 7. Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK7 και των κλινικών ή ιστολογικών-μορφολογικών παραμέτρων των όγκων παρουσιάζεται στον πίνακα 7.12. Η συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με το στάδιο κακοήθειας (κατά TNM) και το βαθμό διαφοροποίησης (κατά Bloom-Richardson) πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Τεστ χ^2 . Για τη συσχέτιση με την κατάσταση των λεμφαδένων (LN) και την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων ή των υποδοχέων προγεστερόνης, εφαρμόστηκε το Fisher's Exact Test. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.12, παρόλο το μικρό μέγεθος του δείγματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με την κατάσταση των λεμφαδένων ($p=0.042$). Η έκφραση της είναι σημαντικά συχνότερη στους ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες. Πλην τούτου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με άλλη κλινική ή ιστολογική-μορφολογική παράμετρο.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης (ελευθέρας νόσου και ολικής), με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών (Cox, 1972), όπου συμπεριλήφθηκε η έκφραση της KLK7 και όλες οι διαθέσιμες κλινικές και ιστολογικές-μορφολογικές παράμετροι (η ηλικία, η κατάσταση των λεμφαδένων, ο βαθμός διαφοροποίησης και το στάδιο κατά TNM). Στοιχεία για την επιβίωση ήταν διαθέσιμα για 36 ασθενείς. Από αυτούς, 5 (13,9%) απεβίωσαν και 8 (22,2%) υποτροπίασαν. Τόσο στην ανάλυση μίας μεταβλητής, όσο και στην ανάλυση



πολλών μεταβλητών, η έκφραση της KLK7 δεν παρουσίασε κάποια σημαντική συσχέτιση με μικρότερη ολική ή ελεύθερα νόσου επιβίωση.

Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		Θετική KLK7	Αρνητική KLK7	
Κατάσταση Λεμφαδένων				
Θετικοί	18	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0,042 ¹
Αρνητικοί	22	7 (31,8%)	15 (68,2%)	
x	3			
Στάδιο κακοήθειας				
I	28	12 (42,9%)	16 (57,1%)	0,114 ²
II	9	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
III	4	2 (50%)	2 (50%)	
x	2			
Υποδοχείς Οιστρογόνων³				
Θετικοί	33	14 (42,4%)	19 (57,6%)	0,088 ¹
Αρνητικοί	10	3 (30%)	7 (70%)	
Υποδοχείς προγεστερόνης³				
Θετικοί	35	14 (40%)	21 (60%)	0,093 ¹
Αρνητικοί	8	3 (37,5)	5 (62,5%)	

Πίνακας 7.12: Συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK7 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 43 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, x: άγνωστη κατάσταση. ¹Fisher's Exact Test, ²Τεστ χ^2 , ³Όριο διάκρισης: ≤ 10 fmol/mg.

Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα, καθώς δεν έδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 και την πρόγνωση της εξέλιξης των ασθενών, τόσο για την ελεύθερα νόσου, όσο και για την ολική επιβίωση.



7.3. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η γυναικολογική ογκολογία. Καθώς οι περισσότερες ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικές έως ότου ο όγκος πραγματοποιήσει μεταστάσεις, η νόσος ανιχνεύεται συνήθως σε προηγμένο στάδιο, με αποτέλεσμα ο καρκίνος των ωοθηκών να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη θνησιμότητα από όλους τους γυναικολογικούς καρκίνους (Holschneider and Berek, 2000). Ο μόνος κλινικός δείκτης με αξιόλογη σημασία για τη διαχείριση του καρκίνου των ωοθηκών σήμερα είναι το καρκινο-εμβρυϊκό αντιγόνο, CA125, το οποίο, ωστόσο, δεν μπορεί να λειτουργήσει ως ξεκάθαρο κριτήριο διάγνωσης, πρόγνωσης ή θεραπευτικής προσέγγισης (Meyer and Rustin, 2000, Chi *et al*, 2000). Είναι συνεπώς απαραίτητη η ανακάλυψη νέων καρκινικών δεικτών για τον καρκίνο των ωοθηκών.

Μελετήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ομάδα 25 δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο των ωοθηκών, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το γονίδιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον καρκίνο αυτόν. Ως εκκινητικά μόρια χρησιμοποιήθηκαν τα K7ex2f και K7ex4r για τον πολλαπλασιασμό της καλλικρεΐνης 7. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Κατόπιν ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή αгарόζης, τα προϊόντα της PCR φωτογραφήθηκαν με το ψηφιακό σύστημα φωτογράφησης Gel Logic 100 Imaging System. Ανάλογα με την εμφάνιση ζώνης, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως θετικά ή αρνητικά. Εν συνεχεία μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με και τις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους της ομάδας μελέτης.

Από τα 25 δείγματα ασθενών τα με καρκίνο των ωοθηκών, τα 10 (40%) ήταν θετικά για την καλλικρεΐνη 7. Στον πίνακα 7.13 παρουσιάζεται η έκφραση των δειγμάτων ανά ιστολογικό τύπο.

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK7 και των κλινικών ή ιστολογικών-μορφολογικών παραμέτρων των όγκων παρουσιάζεται στον πίνακα 7.14. Για τη συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με τον ιστολογικό τύπο και την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση των ασθενών, εφαρμόστηκε το Fisher's Exact Test. Η συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο της νόσου πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του Τεστ χ^2 . Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.14, παρόλο το μικρό μέγεθος του δείγματος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με το στάδιο του όγκου ($p=0.044$). Η έκφρασή της είναι σημαντικά συχνότερη στους ασθενείς με προχωρημένο στάδιο (III) της νόσου. Πλην τούτου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με άλλη κλινική ή ιστολογική-μορφολογική παράμετρο. Λόγω του μικρού μεγέθους του πληθυσμού μελέτης, δεν κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση μιας αξιόπιστης ανάλυσης επιβίωσης.



Ιστολογικός τύπος όγκου	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων που εκφράζουν το mRNA της KLK7
Ορώδεις	13	5
Ενδομητριώδεις	6	2
Αδιαφοροποίητοι	3	2
Βλεννώδεις	2	1
Clear cell	1	0

Πίνακας 7.13: κατανομή της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 ανά ιστολογικό τύπο καρκίνου των ωοθηκών.

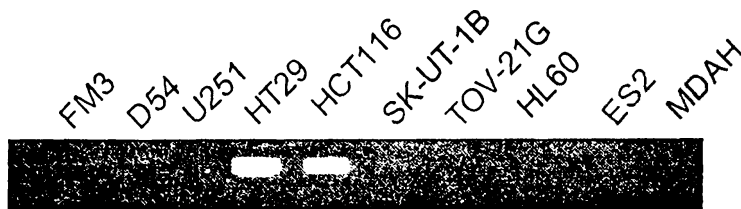
Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		Θετική KLK7	Αρνητική KLK7	
Βαθμός διαφοροποίησης				
I	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,505 ¹
II	5	2 (40%)	3 (60%)	
III	15	6 (40%)	9 (60%)	
x	2	1		
Στάδιο κακοήθειας				
I	4	0	4 (100%)	0,044 ¹
II	5	1 (20%)	4 (80%)	
III	16	9 (56,2%)	7 (43,8%)	
Ιστολογικός Τύπος				
Ορώδη	13	5 (38,5%)	8 (61,55)	0,676 ²
Λοιπά	12	5 (41,7%)	7 (58,3%)	
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση				
Προ/Περι-εμμηνοπαυσιακή	8	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,452 ²
Μετα-εμμηνοπαυσιακή	17	7 (41,2%)	10 (58,8%)	

Πίνακας 7.14: Συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK7 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 25 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, x: άγνωστη κατάσταση. ¹ Τεστ χ^2 , ² Fisher's Exact Test.



7.4. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 στον Καρκίνο του Παχέως εντέρου

Κατά τη μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές από διάφορα όργανα, παρατηρήθηκε έκφρασή της και στις τρεις σειρές καρκίνου του παχέως εντέρου που μελετήθηκαν (HT-29, HCT116 και HTB161, σχήμα 7.8). Η παρατήρηση αυτή, καθώς και πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι η KLK7 εκφράζεται σε κάποιους τύπους μη ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου, όπως του πνεύμονα (Planque *et al*, 2005), εστίασαν το ενδιαφέρον για τη μελέτη της στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.



Σχήμα 7.8: Έκφραση του RNA της καλλικρεΐνης 7 σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Η ισχυρή έκφραση στις κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέως εντέρου έθεσε το ερώτημα εάν η καλλικρεΐνη 7 συσχετίζεται με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Δεν παρουσιάζεται η σειρά HTB 161, όπου όμως η έκφραση ήταν αντίστοιχη με τις HT-29 και HCT116.

Μελετήθηκε με τη μέθοδο του ημι-ποσοτικού RT-PCR η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ομάδα 105 δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο του παχέως εντέρου και διερευνήθηκε η πιθανή αξία της ως καρκινικού δείκτη. Για 54 ασθενείς, υγιής ιστός εντέρου ήταν διαθέσιμος. Μελετήθηκαν επίσης 10 αδενώματα και 18 δείγματα από βιοψίες ασθενών με φλεγμονή. Τα χαρακτηριστικά αυτών των ομάδων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.15. Ως εκκινητικά μόρια χρησιμοποιήθηκαν τα hs1 και hs2. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Κατόπιν ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή αγαρόζης, τα προϊόντα της PCR φωτογραφήθηκαν με το ψηφιακό σύστημα φωτογράφησης Gel Logic 100 Imaging System. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της έντασης των ζώνων καλλικρεΐνης 7 και β-ακτίνης με το λογισμικό 1D Image Analysis Software, έκδοση 3.6 (Eastman Kodak) και υπολογισμό του λόγου τους (ένταση ζώνης καλλικρεΐνης 7/ένταση ζώνης β-ακτίνης). Για την ανάλυση επιβίωσης, υπολογίστηκε ένα βέλτιστο όριο διάκρισης, με βάση την ικανότητα της KLK7 να προβλέπει την ελευθέρα νόσου και την ολική επιβίωση. Το όριο αυτό υπολογίστηκε από τη μέση τιμή έντασης μ στα αρνητικά δείγματα και την τυπική απόκλιση SD με τη σχέση $\mu + 3SD$, στην τιμή 0.18. Εν συνεχεία μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με τις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους των παραπάνω ομάδων.

Μεταβλητή	Μέση τιμή ± Τ.Σ.	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50	75	90
Ηλικία (έτη)	67.45±1.08	31-92	51	60	70	76	81
Μέγεθος όγκου (cm)	4.45±0.17	1.00-12.00	2.50	3.50	4.20	5.15	6.50
Ελευθέρα νόσου επιβίωση (μήνες)	23.4±2.0	1.0-101.0	1.0	12.0	24.0	33.0	42.0
Ολική επιβίωση (μήνες)	31.9±2.05	1.0-104.0	12.0	21.0	29.0	35.0	40.2

Πίνακας 7.15: Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών στην ομάδα μελέτης. Τ.Σ.: τυπικό σφάλμα.

Από τα 105 δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέως εντέρου, τα 37 (35,2%) παρουσίασε υψηλή έκφραση της καλλικρεΐνης 7 (Πίνακας 7.16). Στους υγιείς ιστούς το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 20,4%. Και στις δύο ομάδες δειγμάτων δηλαδή, το ποσοστό υψηλής έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 ήταν σχετικά χαμηλό. Κατά τη σύγκριση όμως της έκφρασής της μεταξύ καρκινικών και υγιών δειγμάτων των ιδίων ασθενών, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη έκφραση στους καρκινικούς όγκους (Πίνακας 7.17). Συγκεκριμένα, στο 42,6% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στο καρκινικό από ότι στο υγιές δείγμα, ενώ μόνο στο 9,3% οι υγιείς ιστοί εκφράζουν περισσότερη καλλικρεΐνη 7 από τους καρκινικούς.

Η σχέση μεταξύ της έκφρασής του mRNA της KLK7 και της κατάστασης των λεμφαδένων (LN) αναλύθηκε με εφαρμογή του παραμετρικού Fisher's Exact Test. Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του mRNA της KLK7 και των κλινικών ή ιστολογικών-μορφολογικών παραμέτρων των όγκων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο βαθμός διαφοροποίησης και το στάδιο κατά TNM ή κατά Duke των όγκων, αναλύθηκε με εφαρμογή του τεστ χ^2 . Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.18, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας υψηλής έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 σε όγκους με μικρότερη διαφοροποίηση ($p=0.001$) και λιγότερο σημαντική συσχέτιση της υψηλής έκφρασης της με όγκους προχωρημένου σταδίου κατά TNM ($p=0,34$) ή Duke's ($p=0,043$). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με άλλη παράμετρο, όπως την ηλικία των ασθενών, την κατάσταση των λεμφαδένων ή το μέγεθος του όγκου.



	Αριθμός Δειγμάτων	Υψηλή έκφραση Καλλικρεΐνης 7 (%)
Καρκίνος παχέως εντέρου	105	37 (35.2)
Αδενώματα	10	4 (40)
Φλεγμονώδεις ιστοί εντέρου	18	5 (27.8)
Υγιείς βλεννογόνος εντέρου	54	11 (20.4)

Πίνακας 7.16: Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε πρωτογενείς όγκους παχέως εντέρου, αδενώματα, φλεγμονώδεις και υγιείς ιστούς εντέρου.

Έκφραση KLK7	Αριθμός ασθενών (%)	Τιμή p ¹
Υψηλότερη στον καρκινικό ιστό	23 (42.6)	0.001
Χαμηλότερη στον καρκινικό ιστό	5 (9.3)	
Ίση στους δύο ιστούς	26 (48.1)	

Πίνακας 17: Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε 54 ζεύγη πρωτογενούς καρκίνου και φυσιολογικού ιστού του παχέως εντέρου. ¹ Η τιμή p υπολογίστηκε με εφαρμογή του στατιστικού τεστ Wilcoxon Signed Ranks.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης (ελευθέρως νόσου και ολικής), με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών (Cox, 1972), όπου συμπεριλήφθηκε η διακριτή μεταβλητή του επιπέδου έκφρασης της KLK7 και όλες οι διαθέσιμες κλινικές και ιστολογικές-μορφολογικές παράμετροι (η ηλικία, το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης και το στάδιο κατά TNM) (Πίνακας 7.19). Στοιχεία για την επιβίωση ήταν διαθέσιμα για 98 ασθενείς. Από αυτούς, 36 (36,7%) απεβίωσαν και 28 (28,6%) υποτροπίασαν. Στην ανάλυση μίας μεταβλητής, η υψηλή έκφραση της KLK7 παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με μικρότερη ολική (Hazard Ratio =2,87, p=0,007), αλλά και ελευθέρως νόσου (Hazard Ratio =2,05, p=0,035) επιβίωση. Οι ασθενείς δηλαδή με υψηλή έκφραση της καλλικρεΐνης 7 διατρέχουν 2,05 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής και 2,87 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου από τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση. Παρέμεινε δε ανεξάρτητος ισχυρός προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης (OS:Hazard Ratio=2,94, p=0,021, DFS:Hazard Ratio=2,29, p=0,031) και στην ανάλυση πολλών μεταβλητών, όταν αυτή προσαρμόστηκε για την ηλικία των ασθενών και το μέγεθος του όγκου.



Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών (%)			Τιμή p
	Σύνολο	Χαμηλό επίπεδο ¹ KLK7	Υψηλό επίπεδο ¹ KLK7	
Κατάσταση λεμφαδένων				
Αρνητικοί	39	29 (74,4)	10 (25,6)	0,12 ²
Θετικοί	55	32 (58,2)	23 (41,8)	
x	11			
Βαθμός διαφοροποίησης				
I	9	9 (100,0)	0 (0,0)	0,001 ³
II	32	24 (75,0)	8 (25,0)	
III	39	25 (64,1)	14 (35,9)	
IV	5	0 (0,0)	5 (100,0)	
x	20			
Στάδιο TNM				
I	13	12 (92,3)	1 (7,7)	0,043 ³
II	23	17 (73,9)	6 (26,1)	
III	38	24 (63,2)	14 (36,8)	
IV	23	11 (47,8)	12 (52,2)	
x	8			
Στάδιο Duke's				
A	11	11 (100,0)	0 (0,0)	0,034 ³
B	28	21 (75,0)	7 (25,0)	
C	42	26 (61,9)	16 (38,1)	
D	7	3 (42,9)	4 (57,1)	
x	17			

Πίνακας 7.18: Συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του mRNA της KLK7 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 105 ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου. Χαμηλό επίπεδο: $\leq 0,18$, υψηλό επίπεδο: $> 0,18$, x: άγνωστη κατάσταση. ¹ KLK7/ β -ακτίνη, ² Fisher's Exact Test, ³ Τεστ χ^2 .

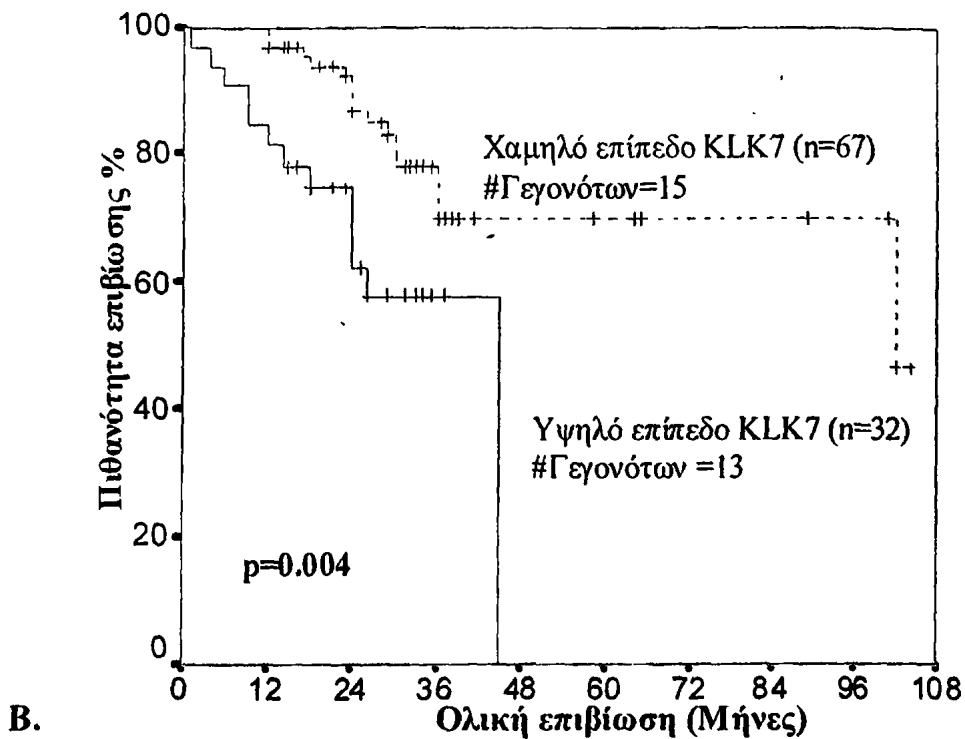
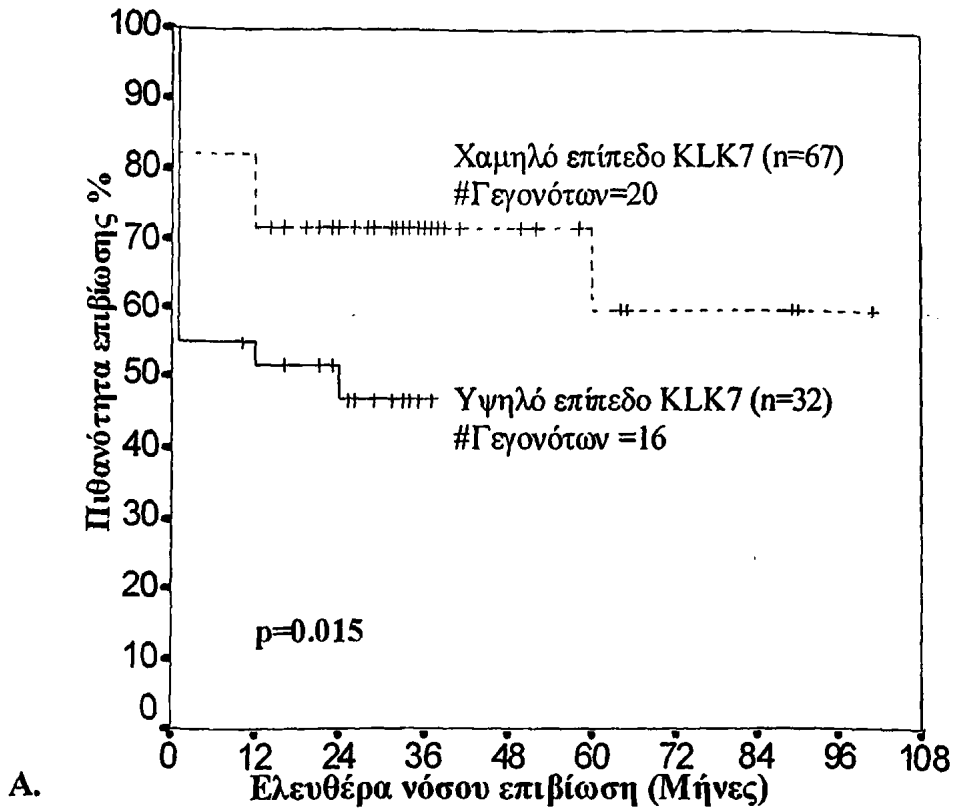
Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς με υψηλό επίπεδο έκφρασης του mRNA της καλλικρεΐνης 7 σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν χαμηλό επίπεδο έκφρασης, τόσο για την ελεύθερα νόσου (log rank test: $p=0,015$), όσο και για την ολική (log rank test: $p=0,004$) επιβίωση (Σχήμα 7.9).



KLK7	Ελευθέρα νόσου επιβίωση			Ολική επιβίωση		
	HR ³	95% CI ⁴	τιμή p	HR ³	95% CI ⁴	τιμή p
Ανάλυση μίας μεταβλητής (n=98)						
Χαμηλό επίπεδο έκφρασης	1.00			1.00		
Υψηλό επίπεδο έκφρασης	2.05	1.05-4.00	0.035	2.87	1.33-6.19	0.007
Ανάλυση πολλών μεταβλητών¹ (n=68)						
Χαμηλό επίπεδο έκφρασης	1.00			1.00		
Υψηλό επίπεδο έκφρασης	1.12	0.43-2.88	0.82	1.08	0.35-3.34	0.89
Ανάλυση πολλών μεταβλητών² (n=85)						
Χαμηλό επίπεδο έκφρασης	1.00			1.00		
Υψηλό επίπεδο έκφρασης	2.29	1.08-4.89	0.031	2.94	1.18-7.32	0.021

Πίνακας 7.19: Ανάλυση επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με την ελευθέρα νόσου και ολική επιβίωση, με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών.¹ Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK7, την ηλικία, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο κατά TNM,² Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK7, την ηλικία, το μέγεθος του όγκου νη, ³ hazard ratio (HR) που υπολογίστηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox, ⁴ διάστημα εμπιστοσύνης (CI) του υπολογιζόμενου hazard ratio.





Σχήμα 7.9: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του mRNA της καλικρεΐνης 7 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής δείχνει ότι ασθενείς με χαμηλό επίπεδο έκφρασης της KLK7 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (A) ή θανάτου (B).

7.5. Μελέτη της Έκφρασης της Καλλικρεΐνης 7 σε ενδοκρανιακούς όγκους

Ο καρκίνος του ΚΝΣ παρουσιάζει μία από τις υψηλότερες θνησιμότητες ανάμεσα σε όλους τους τύπους καρκίνου (Landis, 1998). Χαρακτηρίζεται επίσης από μεγάλη ποικιλία καρκινικών τύπων. Μεταξύ αυτών, τα κακοήθη γλιώματα και τα καλοήγη μηνιγγιώματα είναι οι συχνότεροι τύποι ενδοκρανιακών όγκων. Οι καλλικρεΐνες έχει βρεθεί να εμπλέκονται στην φυσιολογία του κεντρικού νευρικού συστήματος (Yousef *et al*, 2003), αλλά και σε νευρο-εκφυλιστικές νόσους, όπως η νόσος του Parkinson (Diamandis *et al*, 2000, Okui *et al*, 2001), η νόσος Alzheimer (Shimizu-Okabe *et al*, 2001), σκλήρυνση κατά πλάκας (Scarlsbrick *et al*, 2002) ή φλεγμονές του ΚΝΣ (Blaber *et al*, 2004). Η καλλικρεΐνη 7 έχει βρεθεί να εκφράζεται στον εγκέφαλο, τη σπονδυλική στήλη και την παρεγκεφαλίδα (Yousef *et al*, 2000). Στην τελευταία, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση της έκφρασής της σε ασθενείς με frontotemporal άνοια (Diamandis *et al*, 2004). Δεν έχει ωστόσο μελετηθεί η πιθανή σημασία των καλλικρεΐνων στην κλινική εικόνα, τη διάγνωση και την πρόγνωση των κακοηθειών του ΚΝΣ.

Μελετήθηκε με τη μέθοδο του ποιοτικού RT-PCR η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ομάδα 73 δειγμάτων από ασθενείς με ενδοκρανιακούς όγκους και διερευνήθηκε η πιθανή αξία της ως καρκινικού δείκτη. Λόγω της φύσεως και της θέσεως των όγκων, γειτονικός υγιής εγκεφαλικός ιστός ήταν διαθέσιμος μόνο για 2 ασθενείς. Ο ιστός αυτός λήφθηκε με τομή του φλοιού κατά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Ως εκκινητικά μόρια χρησιμοποιήθηκαν τα *hs1* και *hs2*. Ως γονίδιο σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Κατόπιν ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή αγαρόζης, τα προϊόντα της PCR φωτογραφήθηκαν με το ψηφιακό σύστημα φωτογράφησης Gel Logic 100 Imaging System. Ανάλογα με την εμφάνιση ζώνης, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως θετικά ή αρνητικά. Εν συνεχεία μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με τις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους των παραπάνω ομάδων.

Από τα 73 δείγματα ασθενών με ενδοκρανιακούς όγκους, τα 24 ήταν μηνιγγιώματα, 16 γλιοβλαστώματα, 8 αστροκυτώματα 5 νευρινώματα, 3 ολιγοδενδρογλιώματα, 2 επενδυώματα, 2 μυελοβλαστώματα, από ένα αιμιγλιοβλάστωμα, οστέωμα, λίπωμα, θήλωμα του χοριοειδούς πλέγματος, Β λύμφωμα non-Hodgkin και 8 μεταστάσεις από άλλους ιστούς (Πίνακας 7.20).

Από τα 73 δείγματα καρκίνου του εγκεφάλου, 31 (42.5%) παρουσίασαν υψηλή έκφραση της καλλικρεΐνης 7 (Πίνακας 7.20). Οι όγκοι του ΚΝΣ, ανάλογα με την κακοήθειά τους, μπορούν να χαρακτηριστούν ως χαμηλής ή υψηλής κακοήθειας. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι δύο ομάδες παρουσίασαν όμοια ποσοστά έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 (περίπου 44%). Αμφότεροι οι υγιείς ιστοί ήταν αρνητικοί. Η στατιστική ανάλυση της συσχέτισης της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με διάφορες ιστολογικές και κλινικές παραμέτρους της ομάδας μελέτης, κατέδειξε σημαντική σχέση με την ηλικία των ασθενών ($p=0.027$) (Πίνακας 7.21). Συγκεκριμένα, αυξανόμενης της ηλικίας του ασθενούς, αύξανε και η πιθανότητα έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 στο αντίστοιχο καρκινικό δείγμα. Δεν φάνηκε όμως να υπάρχει συσχέτιση με την κατάσταση και το βαθμό κακοήθειας των δειγμάτων.



Χαμηλής κακοήθειας	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων που εκφράζουν το mRNA της KLK7
Μηνιγγιώματα	24	12 (50%)
Νευρινώματα	5	2 (40%)
Επενδυώματα (βαθμού I)	1	0
Αστροκυτώματα (βαθμού I)	2	0
Αιμογλιοβλαστώματα	1	1 (100%)
Οστεώματα	1	0
Λιπώματα	1	0
Θήλωμα του χοριοειδούς πλέγματος	1	0
Σύνολο	36	16 (44.4%)
Υψηλής κακοήθειας		
Γλιοβλαστώματα	16	7 (43.75%)
Μυελοβλαστώματα	2	1 (50%)
Επενδυώματα (βαθμού II)	1	0
Αστροκυτώματα (βαθμού II ή III)	6	4 (66.6%)
B λυμφώματα non-Hodgkin	1	0
Ολιγοδενδρογλιώματα	3	1 (33.3%)
Σύνολο	29	13 (44.8%)
Μεταστάσεις από άλλους ιστούς	8	2 (25%)

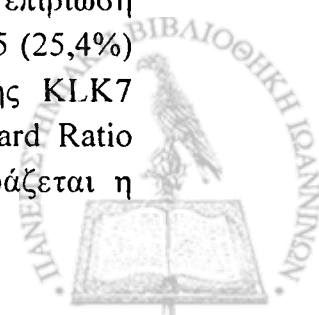
Πίνακας 7.20: Κατάταξη των ενδοκρανιακών όγκων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη της έκφρασης του mRNA της καλλικρεΐνης 7, σύμφωνα με την κατάσταση ιστολογικής κακοήθειας.



Μεταβλητή	Ασθενείς	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		KLK7- αρνητικοί	KLK7- θετικοί	
<i>Ηλικία (έτη)</i>				
<20	9	6 (66.7)	3 (33.3)	0.027 ¹
20-40	12	5 (41.7)	7 (58.3)	
40-60	18	15 (83.3)	3 (16.7)	
>60	22	7 (31.8)	15 (68.2)	
χ	6			
<i>Βαθμός κακοήθειας</i>				
I	34	20 (58.8)	14 (41.2)	0.92 ¹
II	4	2 (50.0)	2 (50.0)	
III	4	2 (50.0)	2 (50.0)	
IV	20	10 (50.0)	10 (50.0)	
χ	5			
<i>Επίπεδο κακοήθειας</i>				
Χαμηλό	34	20 (58.8)	14 (41.2)	0.81 ²
Υψηλό	28	14 (50.0)	14 (50.0)	
χ	5			
<i>Ιστολογικός τύπος</i>				
Μηνιγγίωμα	24	12 (50.0)	12 (50.0)	0.97 ¹
Γλιοβλάστωμα	14	7 (50.0)	7 (50.0)	
Όλιγοδενδρογλίωμα	3	2 (66.7)	1 (33.3)	
Μυελοβλάστωμα	2	1 (50.0)	1 (50.0)	
Αστροκύτωμα	9	5 (55.6)	4 (44.4)	
Νευρίνωμα	5	3 (60.0)	2 (40.0)	
Διάφορα	6	4 (66.7)	2 (33.3)	
Μεταστατικός όγκος από άλλους ιστούς	7	5 (71.4)	2 (28.6)	
χ	4			

Πίνακας 7.21: Συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του mRNA της KLK7 και τις κλινικές ή ιστολογικές παραμέτρους των όγκων από 73 ασθενείς με ενδοκρανιακούς όγκους. Χαμηλό επίπεδο: $\leq 0,18$, υψηλό επίπεδο: $> 0,18$, x: άγνωστη κατάσταση. ¹ Τεστ χ^2 , ² Fisher's Exact Test, χ: άγνωστη κατάσταση.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης (ελευθέρως νόσου και ολικής), με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών (Cox, 1972), όπου συμπεριλήφθηκε η μεταβλητή της έκφρασης της KLK7 και όλες οι διαθέσιμες κλινικές και ιστολογικές-μορφολογικές παράμετροι (η ηλικία και ο βαθμός διαφοροποίησης των όγκων) (Πίνακας 7.22). Στοιχεία για την επιβίωση ήταν διαθέσιμα για 59 ασθενείς. Από αυτούς, 19 (32,2%) απεβίωσαν και 15 (25,4%) υποτροπίασαν. Στην ανάλυση μίας μεταβλητής, η υψηλή έκφραση της KLK7 παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με μικρότερη ολική επιβίωση (Hazard Ratio =3,00, p=0,045). Οι ασθενείς δηλαδή με όγκους στους οποίους εκφράζεται η



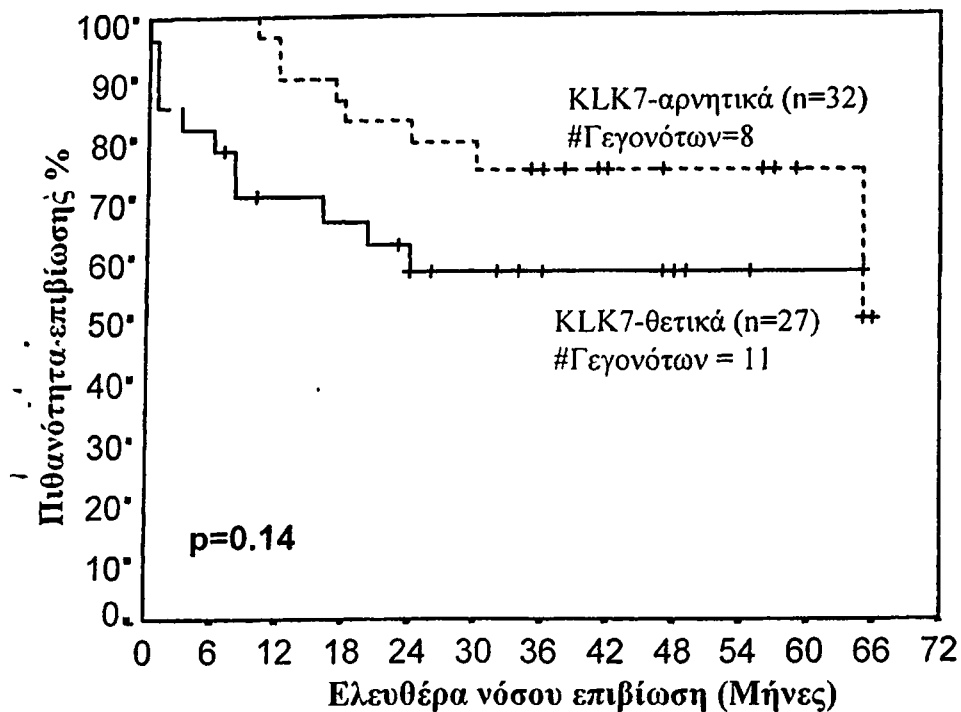
καλλικρεΐνη 7 διατρέχουν 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου από τους ασθενείς με όγκους στους οποίους δεν εκφράζεται η καλλικρεΐνη 7. Η ανάλυση πολλών μεταβλητών, όταν αυτή προσαρμόστηκε για την ηλικία των ασθενών και το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων, δεν αποκάλυψε κάποια σημαντική συσχέτιση με την ελεύθερα νόσου ή την ολική επιβίωση.

	<u>Ελεύθερα νόσου επιβίωση</u>			<u>Ολική επιβίωση</u>		
	HR ^a	95% CI ^b	p value	HR ^a	95% CI ^b	p value
Ανάλυση μίας μεταβλητής (n=59)						
<i>Έκφραση KLK7</i>						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	2.09	0.83-5.22	0.11	3.00	1.02-8.82	0.045
Βαθμός	2.16	1.46-3.21	<0.001	2.30	1.43-3.71	0.001
Ηλικία (έτη)	1.029	1.002-1.058	0.039	1.044	1.00-1.082	0.017
Ανάλυση πολλών μεταβλητών¹ (n=58)						
<i>Έκφραση KLK7</i>						
Αρνητική	1.00			1.00		
Θετική	2.02	0.74-5.55	0.17	3.16	0.90-11.15	0.072
Βαθμός	2.24	1.51-3.32	<0.001	2.34	1.45-3.76	<0.001
Ηλικία (έτη)	1.031	1.003-1.060	0.03	1.034	1.001-1.068	0.044

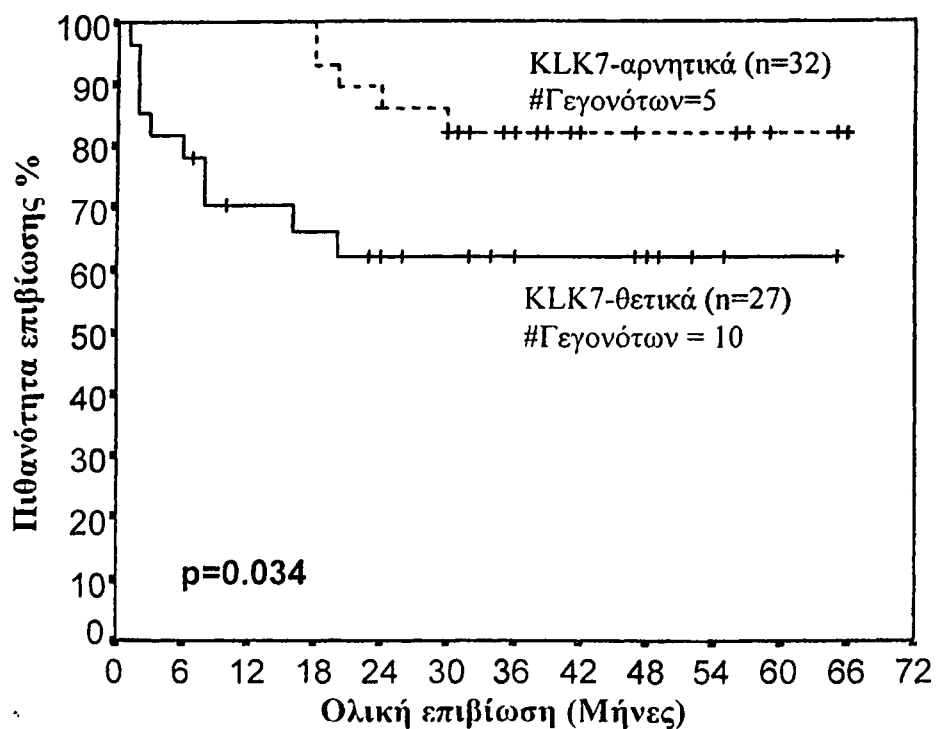
Πίνακας 7.22: Ανάλυση επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με την ελεύθερα νόσου και ολική επιβίωση, με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών.¹ Μοντέλο πολλών μεταβλητών, που συμπεριλαμβάνει το επίπεδο έκφρασης της KLK7, την ηλικία και το βαθμό διαφοροποίησης, ² hazard ratio (HR) που υπολογίστηκε με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox, ³ διάστημα εμπιστοσύνης (CI) του υπολογιζόμενου hazard ratio.

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier μίας μεταβλητής επιβεβαίωσε την σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς με όγκους που εκφράζουν το mRNA της καλλικρεΐνης 7 σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν αρνητική έκφραση, ως προς την ολική επιβίωση (log rank test: p=0,034) (Σχήμα 7.10). Για την ελεύθερα νόσου επιβίωση, αντίθετα, δεν αποδείχθηκε συσχέτιση με την έκφραση της καλλικρεΐνης 7 (log rank test: p=0,14).





A.



B.

Σχήμα 7.10: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του mRNA της καλλικρεΐνης 7 σε ασθενείς με ενδοκρανιακούς όγκους. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής δείχνει ότι ασθενείς με αρνητική KLK7 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (A) ή θανάτου (B) σε σχέση με τους ασθενείς με όγκους θετικούς για KLK7.



7.6. Ανοσοϊστοχημικός κυτταρικός εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7

Οι περισσότερες καλλικρεΐνες εκφράζονται σε διάφορους καρκινικούς ή φυσιολογικούς ιστούς. Σε όλες τις περιπτώσεις όπου έχει μελετηθεί ο εντοπισμός τους, ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα καρκινικών ή φυσιολογικών κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης (Petraiki *et al*, 2003, Borgono *et al*, 2003, Petraiki *et al*, 2003).

Μελετήθηκε ο κυτταρικός εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7 με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης, σε μεμονωμένα δείγματα από καρκινικούς ιστούς μαστού, ωοθήκης, ενδομητρίου, εντέρου και εγκεφάλου.

Η καλλικρεΐνη 7 εντοπίστηκε ανοσοϊστοχημικά στα αδενώδη επιθηλιακά κύτταρα των όγκων. Το κυτταρόπλασμα αυτών των κυττάρων επέδειξε έντονη χρώση, σε αντίθεση με τα κύτταρα του στρώματος, που ήταν αρνητικά (Σχήματα 7.11, 7.12, 7.13). Η κατανομή του αντιγόνου ήταν παρόμοια σε όλους τους καρκινικούς ιστούς που μελετήθηκαν. Αντικατάσταση του πρωτογενούς μονοκλωνικού αντισώματος με ορό κουνελιού οδήγησε σε απώλεια της χρώσης, αποδεικνύοντας την ειδικότητα της αντίδρασης ανοσοχρώσης.

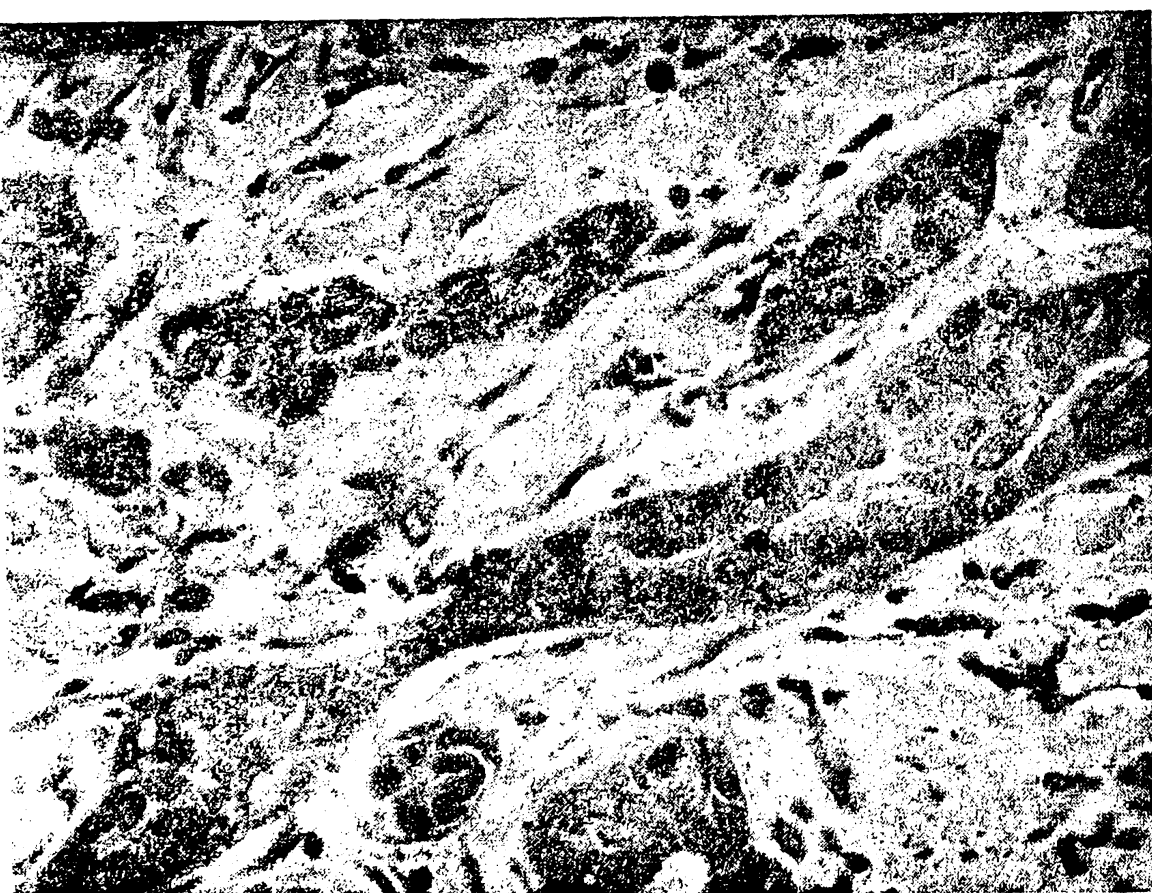
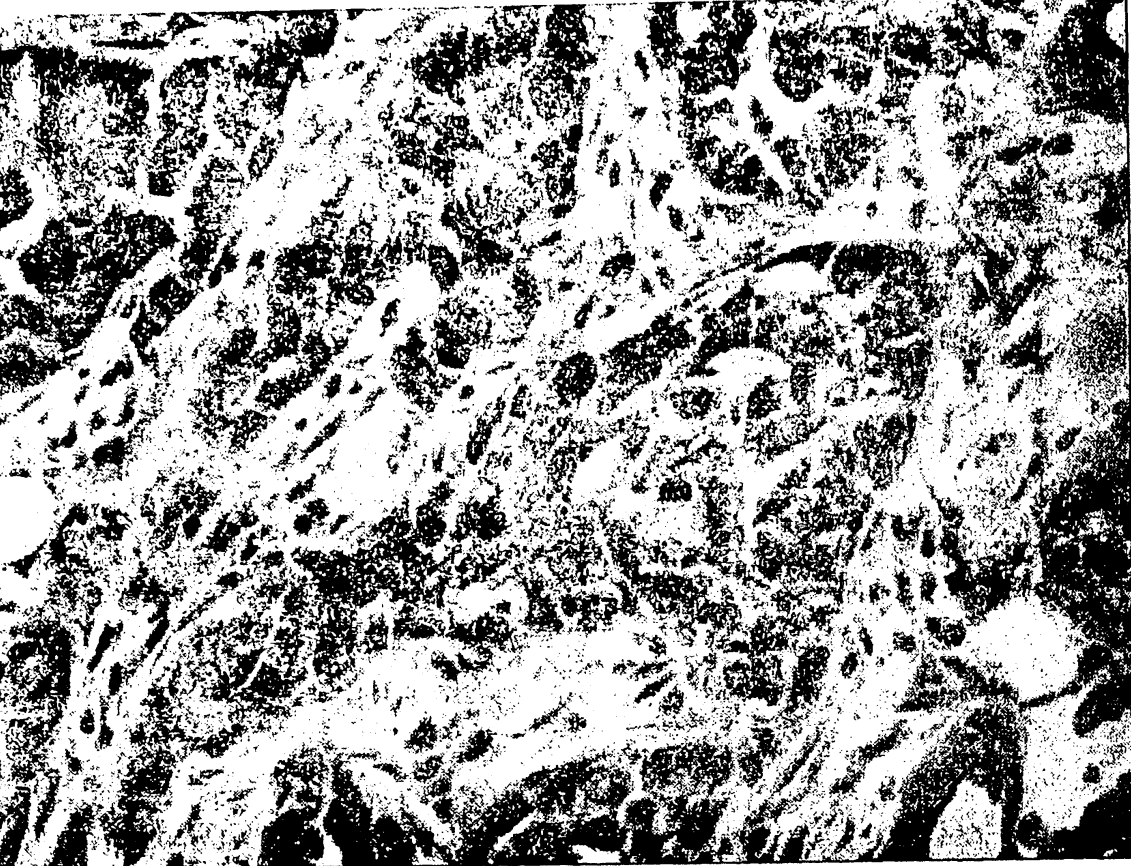
Στα καρκινικά δείγματα μαστού, κυτταροπλασματική ανοσοέκφραση της καλλικρεΐνης 7 εντοπίστηκε στα πλακώδη κύτταρα των ductal και lobuloalveolar δομών. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα δεν παρουσίασαν έκφραση. Luminal εκκρίσεις ήταν επίσης θετικές. Η χρώση ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις εντοπισμένη κατά εστίες (focal).

Στον καρκίνο του ενδομητρίου παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική έκφραση της καλλικρεΐνης 7 τόσο στο επιφανειακό, όσο και στο εσωτερικό αδενώδες επιθήλιο. Η χρώση ήταν ισχυρή αλλά εντοπισμένη σε εστίες. Στο εσωτερικό επιθήλιο, η χρώση ήταν περισσότερο διάχυτη από ότι στο επιφανειακό.

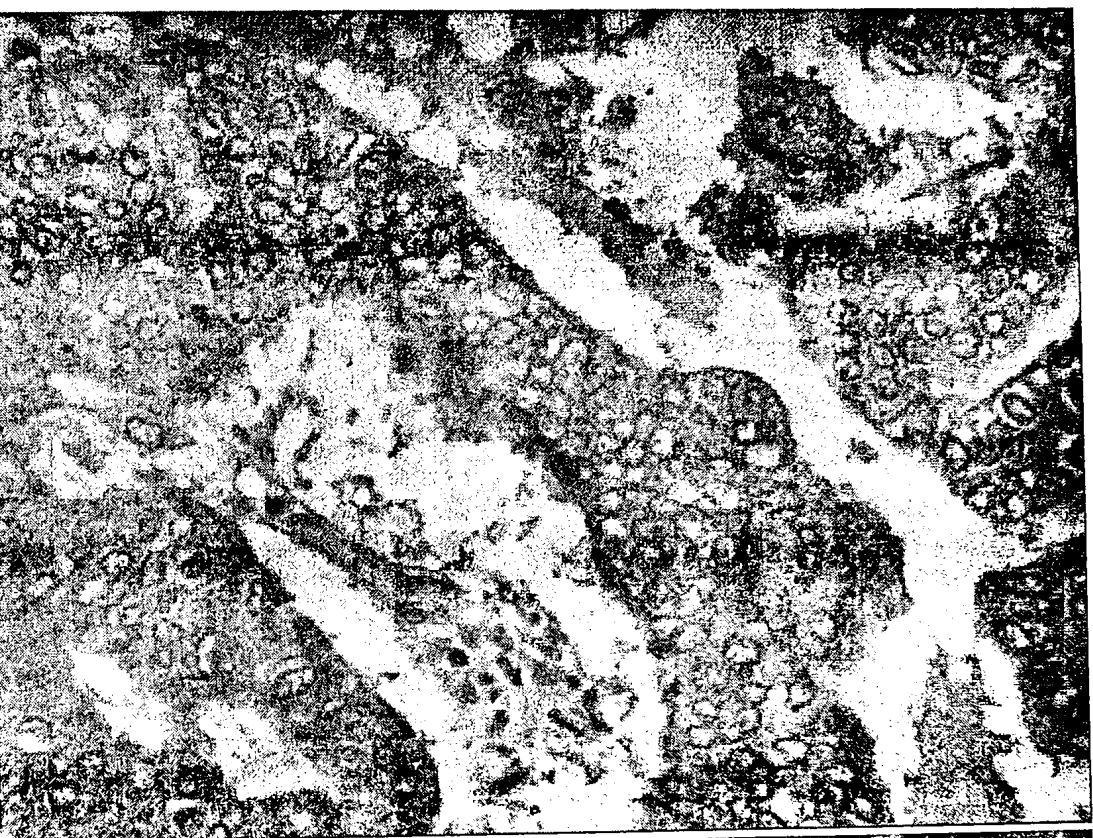
Παρόμοια ήταν η χρώση και στα καρκινικά δείγματα ωοθηκών, με έντονη χρώση του επιφανειακού επιθηλίου.

Ισχυρή και διάχυτη επιθηλιακή έκφραση της καλλικρεΐνης 7 παρατηρήθηκε και στο καρκίνο του παχέως εντέρου (Σχήμα 7.14).

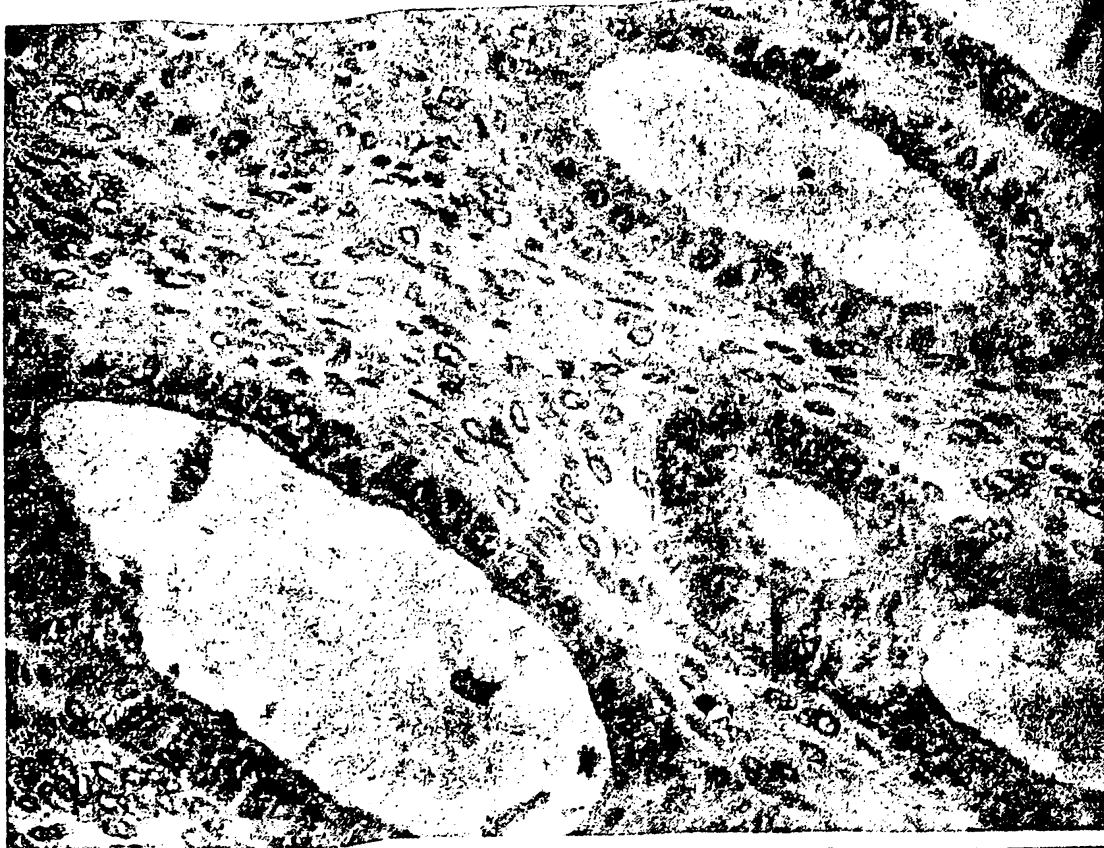




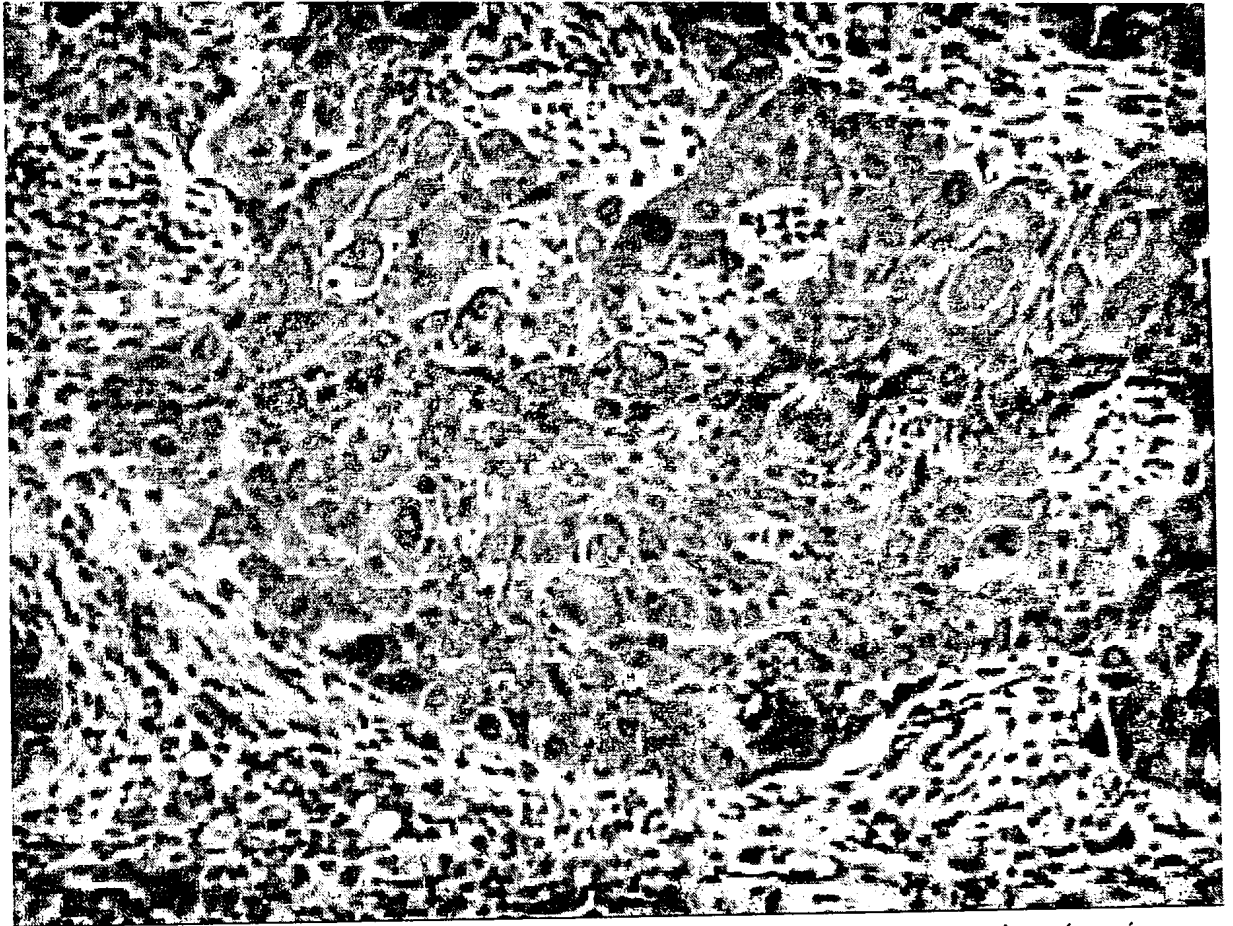
Εχθήμα 7.11: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7 σε καρκινικό ιστό μαστού (μεγέθυνση X400). Παρατηρήθηκε έντονη χρώση στα κύτταρα του πορώδους και πλακώδους επιθηλίου του μαστού.



Σχήμα 7.12: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της καλλικρεΐνης σε καρκινικό ιστό ενδομητρίου (μagnification X400).



Σχήμα 7.13: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της καλκικρεΐνης 7 σε αδενοκαρκίνωμα ωοθήκης (μεγέθυνση Χ400). Παρατηρήθηκε έντονη χρώση στα κύτταρα του πορώδους και πλακώδους επιθηλίου της ωοθήκης.



Σχήμα 7.14: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7 σε καρκινικό ιστό εντέρου (μεγέθυνση X400).

7.8. Μελέτη της δράσης της καλλικρεΐνης 7 και άλλων καλλικρεΐνών στον καρκίνο

Η διαφορετική έκφραση πολλών μελών της οικογένειας των ιστικών καλλικρεΐνών σε διάφορους τύπους καρκίνου σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, δείχνει ότι οι αυτές οι πρωτεΐνες ίσως αποτελούν μέρος ενός πρωτεολυτικού καταρράκτη που λαμβάνει χώρα στα καρκινικά κύτταρα και συνεισφέρει στην αύξηση του διηθητικού δυναμικού τους (Clements *et al*, 2004, Yousef and Diamandis, 2002).

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης (μεμονωμένης ή σε συνδυασμό) της καλλικρεΐνης 7 και άλλων μελών της οικογένειας των ιστικών καλλικρεΐνών, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, ωθηκών και εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδρασή τους στην ικανότητα πολλαπλασιασμού και *in vitro* διήθησης των καρκινικών κυττάρων. Μελετήθηκε επίσης η αλλαγή στην καρκινική ανάπτυξη και εξάπλωση που προκαλείται από την υπερέκφραση των καλλικρεΐνών σε καρκινικά κύτταρα ωθηκών, με χρήση *in vivo* μοντέλου ξενομοσχεύματος (xenograft) ποντικίου.

7.8.1. Διαμόλυνση και έκφραση μελών της οικογένειας των καλλικρεΐνών σε καρκινικά κύτταρα

Το πλήρες cDNA των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών 4, 5, 6, 7 και 8 απομονώθηκε με εφαρμογή αντίδρασης PCR σε δύο γύρους (nested PCR) από ιστούς καρκίνου των ωθηκών. Ειδικά για την *KLK8*, εφαρμόστηκε η μέθοδος της επικαλυπτόμενης PCR (overlapping PCR). Ως εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν τα μόρια που απεικονίζονται στον πίνακα 6.2. Η ταυτότητα και η σωστή αλληλουχία των προϊόντων επιβεβαιώθηκε με αντίδραση αλληλούχισης (sequencing) και τα cDNAs κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης θηλαστικών pRc/RSV (Invitrogen). Εν συνεχεία, επιλεγμένες ανθρώπινες καρκινικές σειρές, που δεν εκφράζουν φυσιολογικά τα αντίστοιχα ένζυμα, διαμολύνθηκαν με μεμονωμένους φορείς ή συνδυασμούς φορέων έκφρασης που έφεραν τα cDNAs των καλλικρεΐνών 4, 5, 6, 7 και 8. Στον πίνακα 7.23 παρουσιάζονται οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, οι φορείς έκφρασης με τους οποίους διαμολύνθηκαν και οι χαρακτηρισμοί των προκυψάντων διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η διαμόλυνση ήταν επιτυχής, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων των καλλικρεΐνών σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου της *KLK7* μετρήθηκε με ποσοτική μέθοδο RT-PCR (Σχήμα 7.15), ενώ για τις υπόλοιπες καλλικρεΐνες, η μελέτη της έκφρασης έγινε με ποιοτική μέθοδο PCR. Παρατηρήθηκε ότι το mRNA κάθε γονιδίου εκφράστηκε μόνο στην κυτταρική σειρά που είχε διαμολυνθεί με τον αντίστοιχο φορέα, ενώ τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το φορέα ελέγχου δεν παρουσίασαν αλλαγή στην έκφραση σε σχέση με τις αρχικές κυτταρικές σειρές. Εν συνεχεία, η έκφραση του mRNA των καλλικρεΐνών και η σύνθεση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στις σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές επιβεβαιώθηκε με εφαρμογή δοκιμασιών ELISA, ευαίσθητων για τις καλλικρεΐνες 4-8. Παρατηρήθηκε ότι οι διαμολυσμένες με το cDNA των καλλικρεΐνών κυτταρικές σειρές συνέθεταν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες (Σχήματα 7.16 έως 7.20). Η μέτρηση με ELISA πραγματοποιήθηκε εκτός από τα κύτταρα και στο θρεπτικό μέσο των καλλιέργειών τους, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο, ότι οι καλλικρεΐνες 4, 5, 6, 7 και 8 όχι



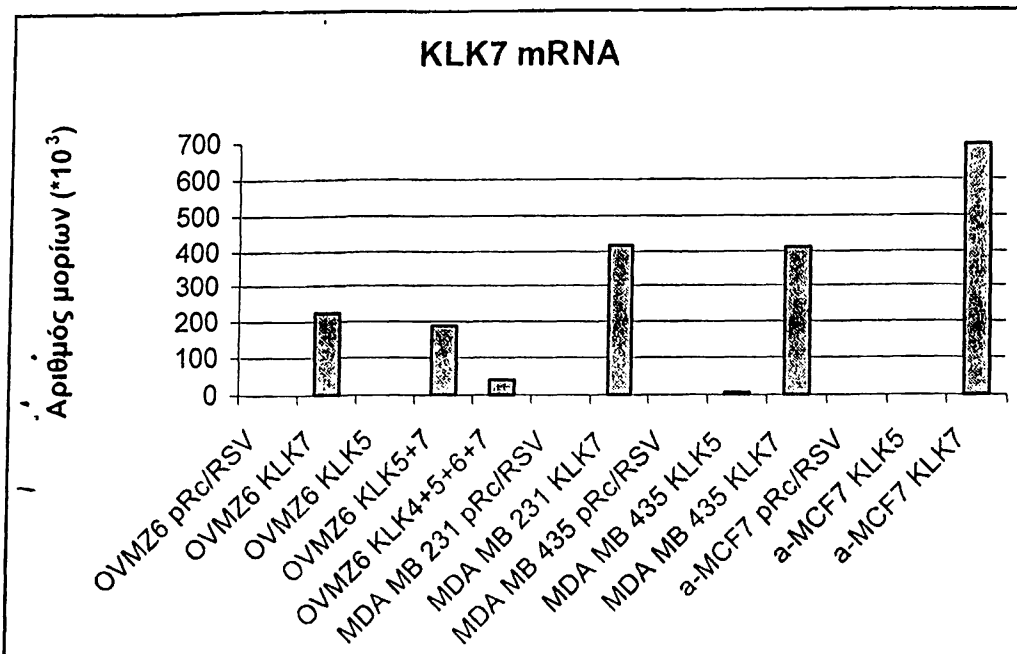
μόνο εκφράζονται και συντίθενται, αλλά και εκκρίνονται στο περιβάλλον από τις αντίστοιχες διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές.

Παρατηρήθηκε ότι στις κυτταρικές σειρές 231-KLK5, 435-KLK5 και aMCF7-KLK5, η αυξημένη έκφραση της καλλικρεΐνης 5 σε σχέση με τις αντίστοιχες σειρές ελέγχου συνοδεύτηκε και από έκφραση της καλλικρεΐνης 7 (Σχήμα 7.21). Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να αποδοθεί σε διασταυρούμενη αντίδραση (cross-reactivity) της μεθόδου, καθώς η ELISA για την καλλικρεΐνη 5 είναι υψηλής ειδικότητας.

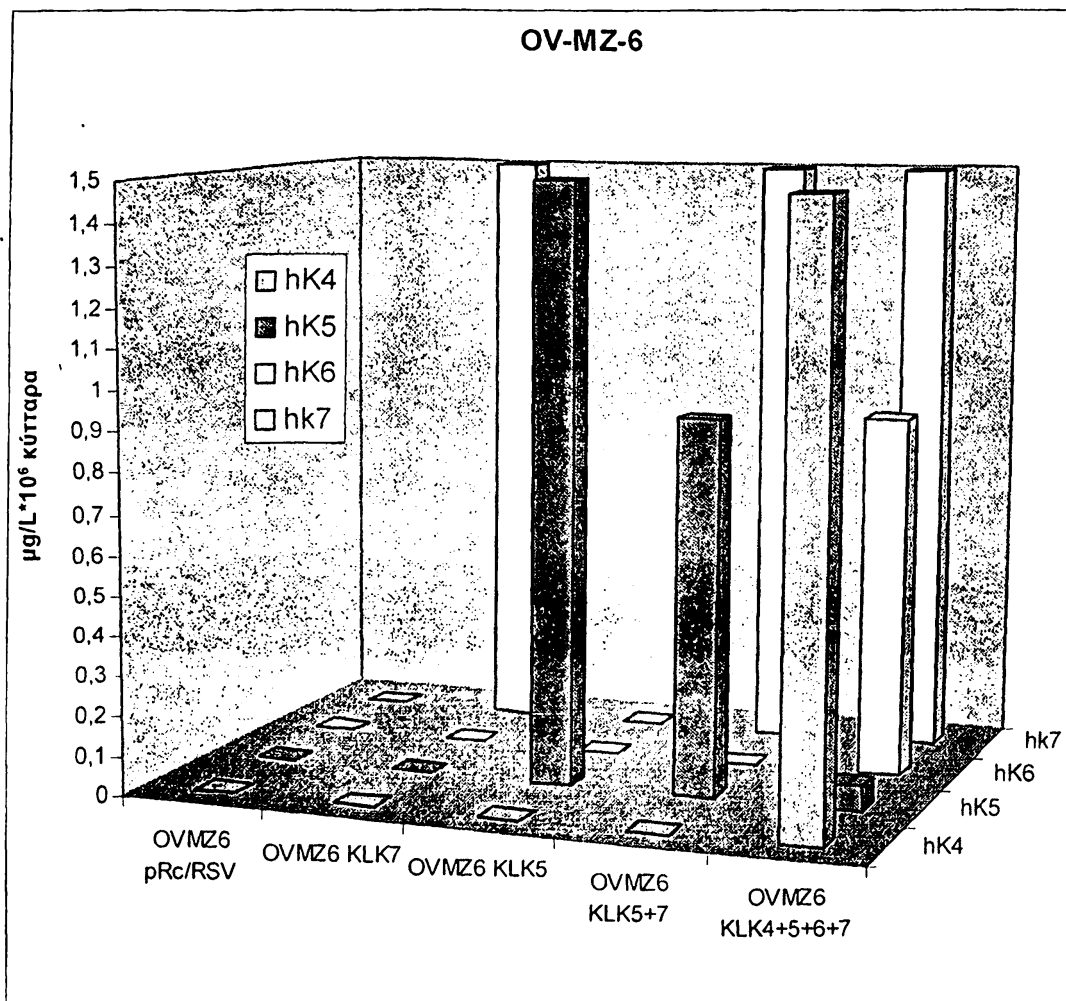
Κυτταρική Σειρά	Φορείς Έκφρασης	Χαρακτηρισμός Κυττ. Σειράς
OV-MZ-6	pRc/RSV	OV-pRc/RSV
	pRc/RSV-KLK5	OV-KLK5
	pRc/RSV-KLK7	OV-KLK7
	pRc/RSV-KLK5 pRc/RSV-KLK7	OV-KLK5+7
	pRc/RSV-KLK4 pRc/RSV-KLK5 pRc/RSV-KLK6 pRc/RSV-KLK7	OV-KLK4+5+6+7
a-MCF-7	pRc/RSV	aMCF7-pRc/RSV
	pRc/RSV-KLK5	aMCF7-KLK5
	pRc/RSV-KLK7	aMCF7-KLK7
MDA 435	pRc/RSV	435-pRc/RSV
	pRc/RSV-KLK5	435-KLK5
	pRc/RSV-KLK7	435-KLK7
MDA 231	pRc/RSV	231-pRc/RSV
	pRc/RSV-KLK5	231-KLK5
	pRc/RSV-KLK6	231-KLK6
	pRc/RSV-KLK7	231-KLK7
U-251-MG	pRc/RSV	U251-pRc/RSV
	pRc/RSV-KLK7	U251-KLK7
	pRc/RSV-KLK8	U251-KLK8

Πίνακας 7.23: Παρουσιάζονται οι κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης διαφόρων μελών της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών καθώς και οι ονομασίες που δόθηκαν στις κυτταρικές σειρές που προέκυψαν.



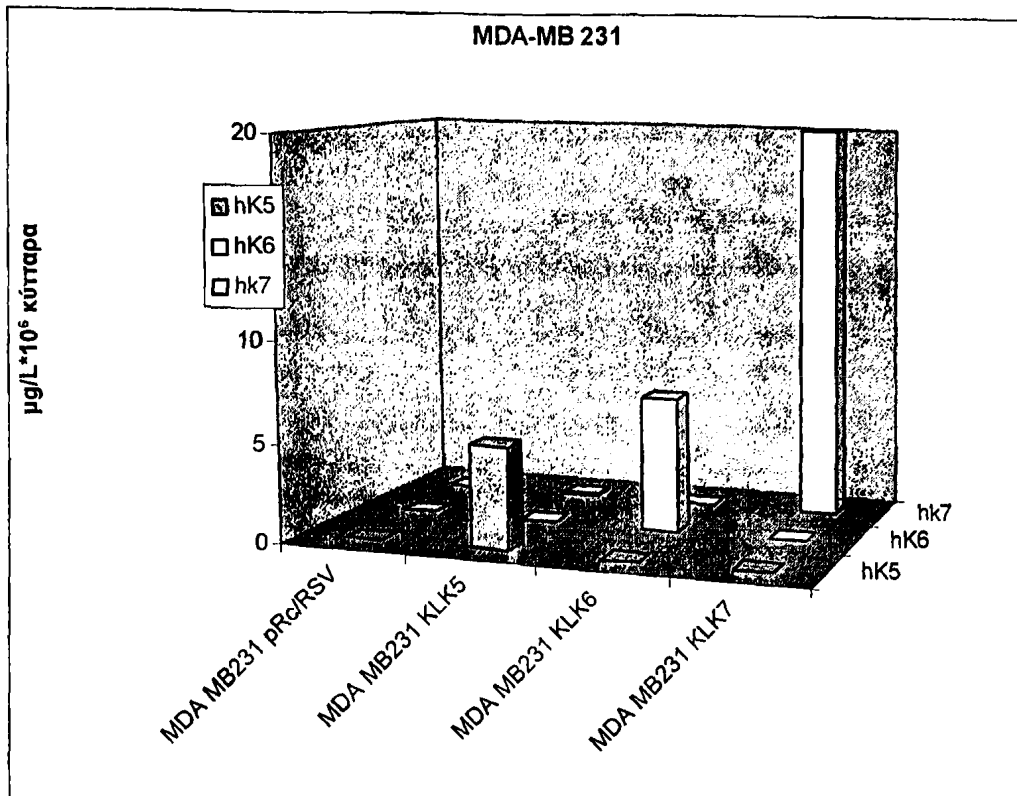


Σχήμα 7.15: Έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης pRc/RSV-KLK7 και με το φορέα ελέγχου pRc/RSV.

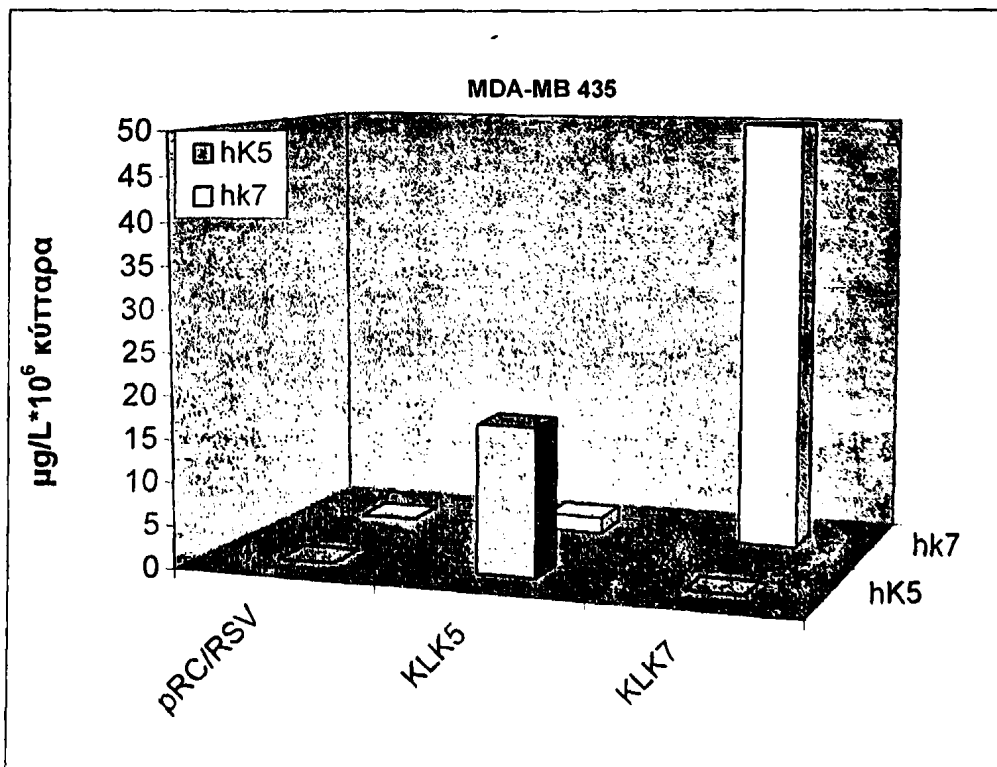


Σχήμα 7.16: Έκφραση της πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών 4, 5, 6 και 7 στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά OV-MZ-6 που διαμολύνθηκε με διάφορους συνδυασμούς των φορέων έκφρασης pRc/RSV-KLK4, pRc/RSV-KLK5, pRc/RSV-KLK6 και pRc/RSV-KLK7 και με το φορέα ελέγχου pRc/RSV. Οι μετρήσεις προέρχονται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκκριση των πρωτεϊνών.

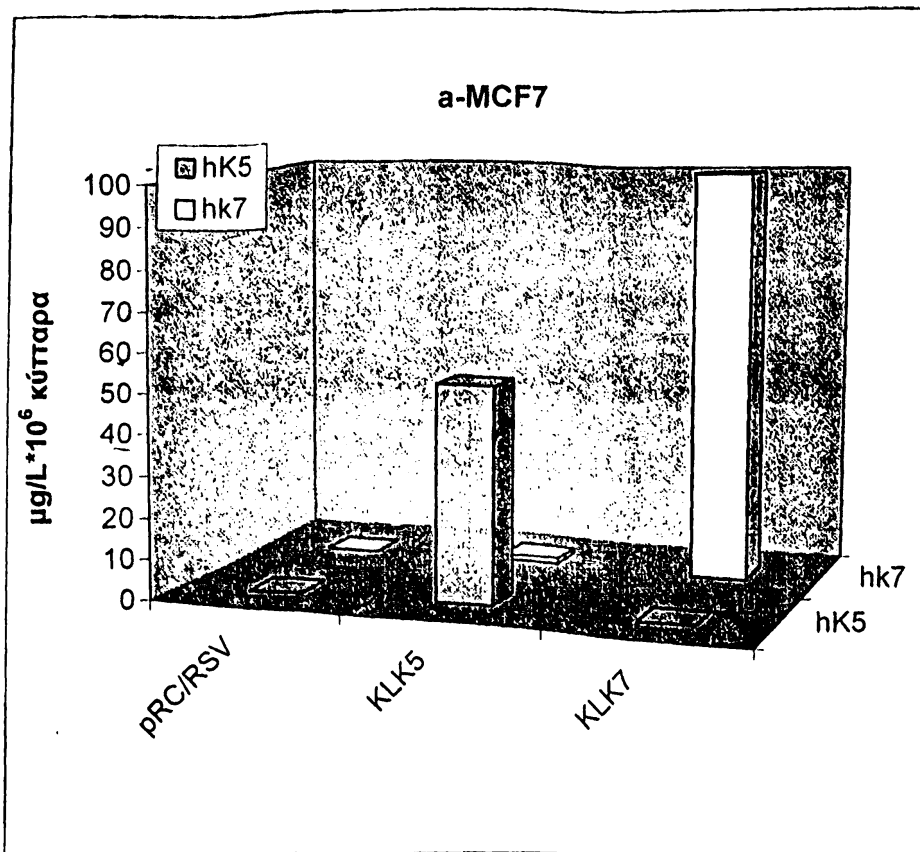




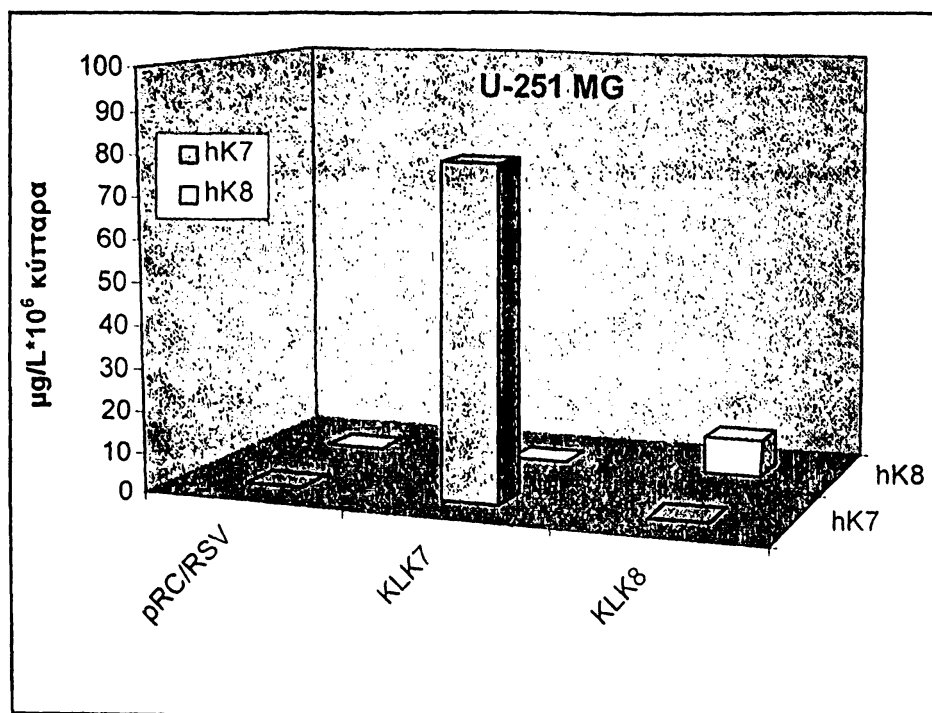
Σχήμα 7.17: Έκφραση της πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών 5, 6 και 7 στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB 231 που διαμολύνθηκε με τους φορείς έκφρασης pRc/RSV-KLK5, pRc/RSV-KLK6 και pRc/RSV-KLK7 και με το φορέα ελέγχου pRc/RSV. Οι μετρήσεις προέρχονται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκκριση των πρωτεϊνών.



Σχήμα 7.18: Έκφραση της πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών 5 και 7 στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB 435 που διαμολύνθηκε με τους φορείς έκφρασης pRc/RSV-KLK5 και pRc/RSV-KLK7 και με το φορέα ελέγχου pRc/RSV. Οι μετρήσεις προέρχονται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκκριση των πρωτεϊνών.

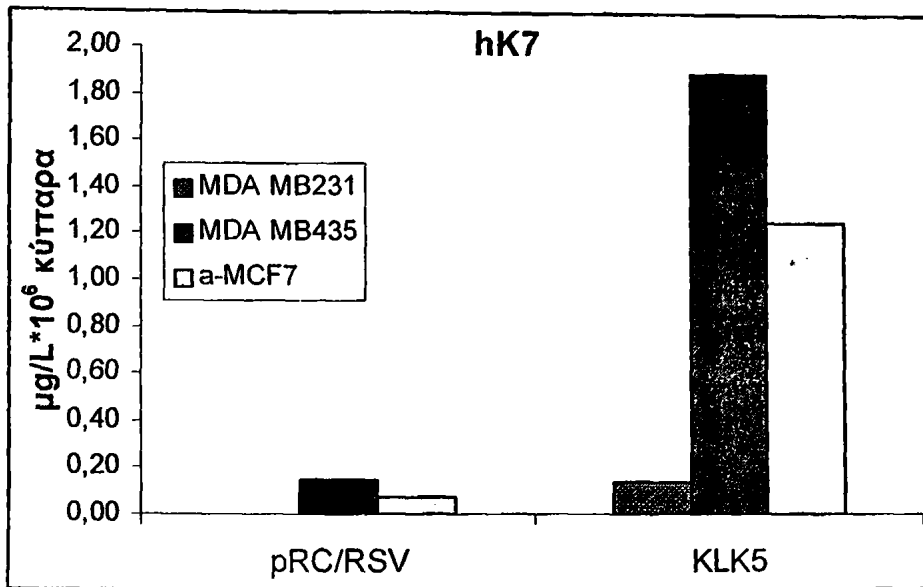


Σχήμα 7.19: Έκφραση της πρωτεΐνης των καλλιкреϊνών 5 και 7 στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά a-MCF7 που διαμολύνθηκε με τους φορείς έκφρασης pRc/RSV-KLK5 και pRc/RSV-KLK7 και με το φορέα ελέγχου pRc/RSV. Οι μετρήσεις προέρχονται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκκριση των πρωτεϊνών.



Σχήμα 7.20: Έκφραση της πρωτεΐνης των καλλιкреϊνών 7 και 8 στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά U-251 MG που διαμολύνθηκε με τους φορείς έκφρασης pRc/RSV-KLK7 και pRc/RSV-KLK8 και με το φορέα ελέγχου pRc/RSV. Οι μετρήσεις προέρχονται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκκριση των πρωτεϊνών.

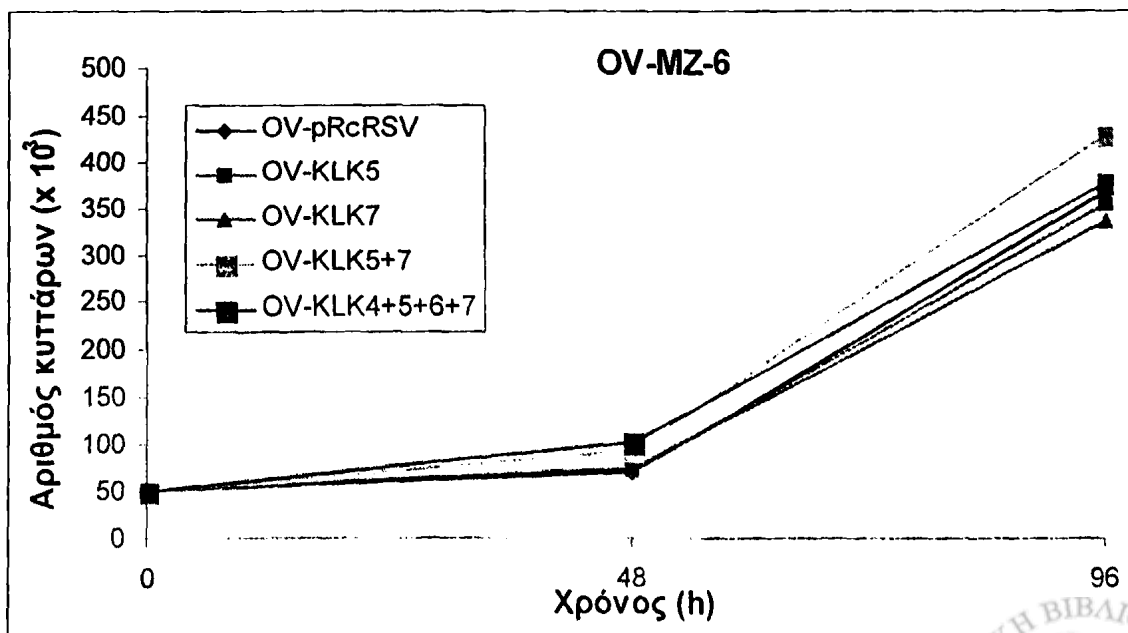




Σχήμα 7.21: Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA MB231, MDA MB435 και aMCF7, που διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης pRc/RSV-KLK5.

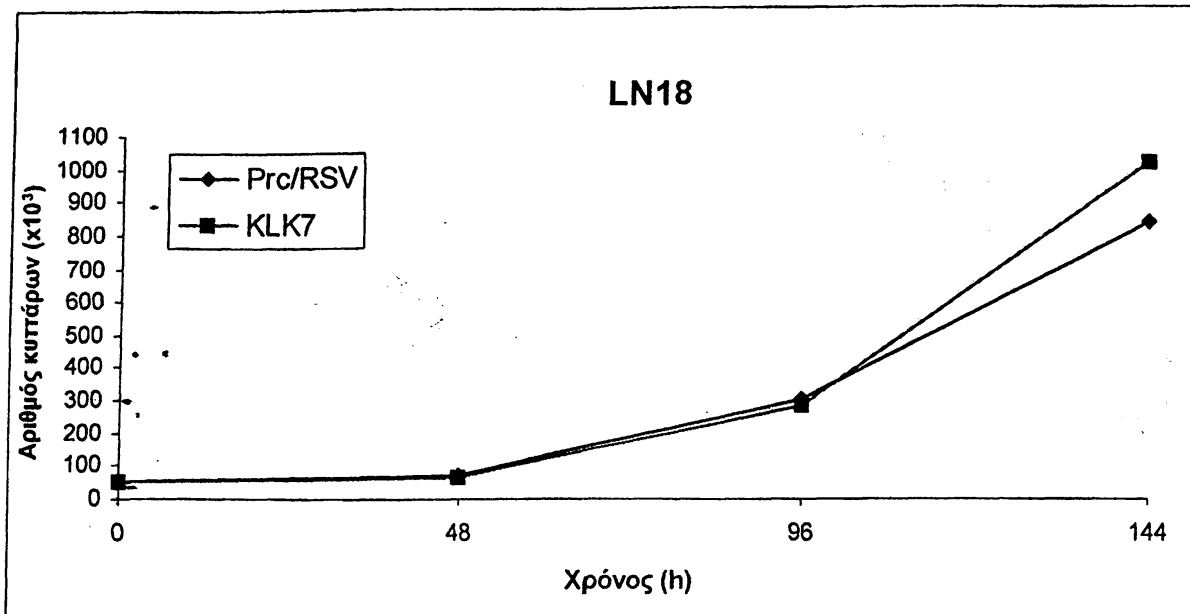
7.8.2. Επίδραση της υπερέκφρασης των καλλικρεΐνων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Μελετήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των διαμολυσμένων κυτταρικών που υπερεξέφραζαν τις ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες και συγκρίθηκε με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών που είχαν διαμολυνθεί με το φορέα έκφρασης μόνο (σειρές ελέγχου). Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε δοκιμασία πολλαπλασιασμού (ενότητα 6.17). Δεν παρατηρήθηκε όμως σημαντική διαφοροποίηση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού μεταξύ των δύο ομάδων κυττάρων (σχήματα 7.22 έως 7.27).

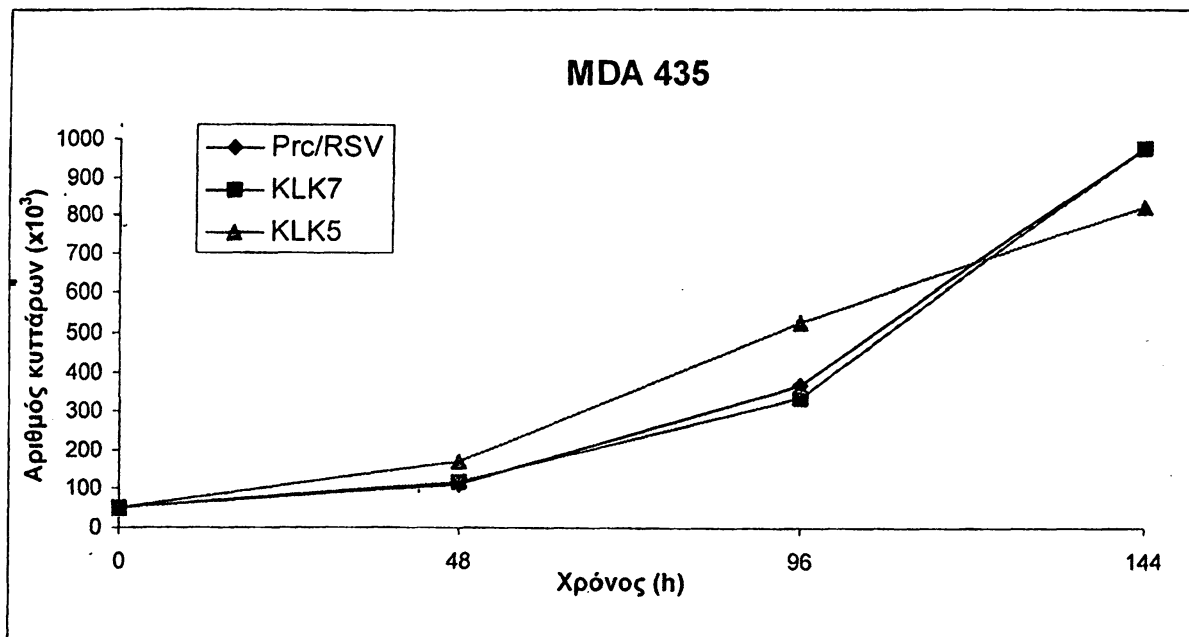


Σχήμα 7.22: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων OV-MZ-6, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεΐνες (hK5, hK7, hK5+hK7, hK4+hK5+hK6+hK7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο.



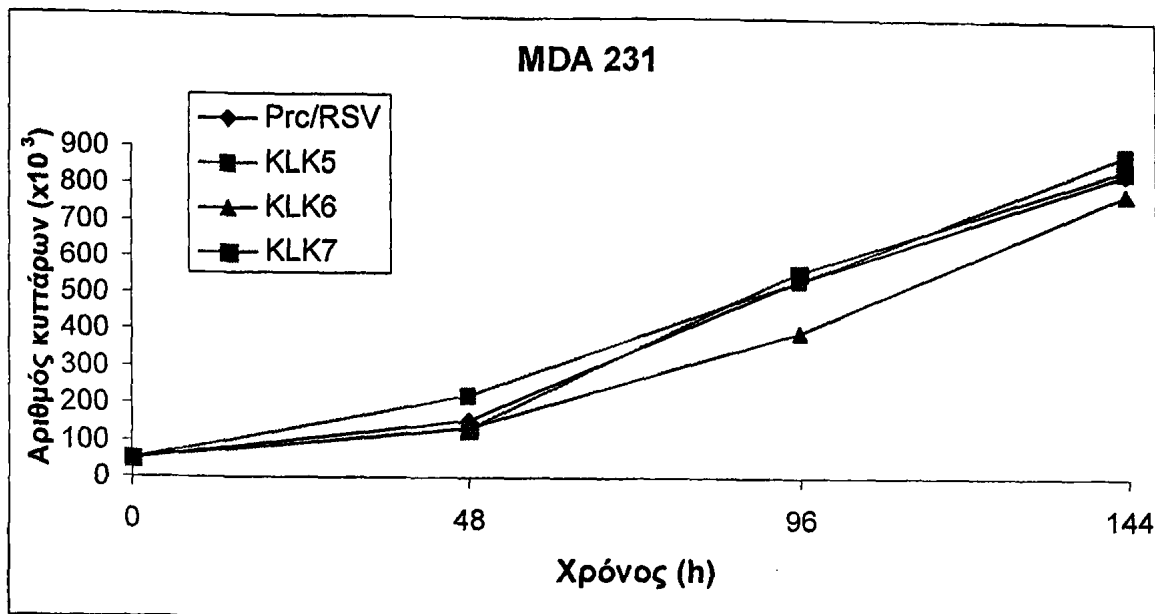


Σχήμα 7.23: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων LN18, που εκφράζουν την καλλικρεΐνη 7 ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο.

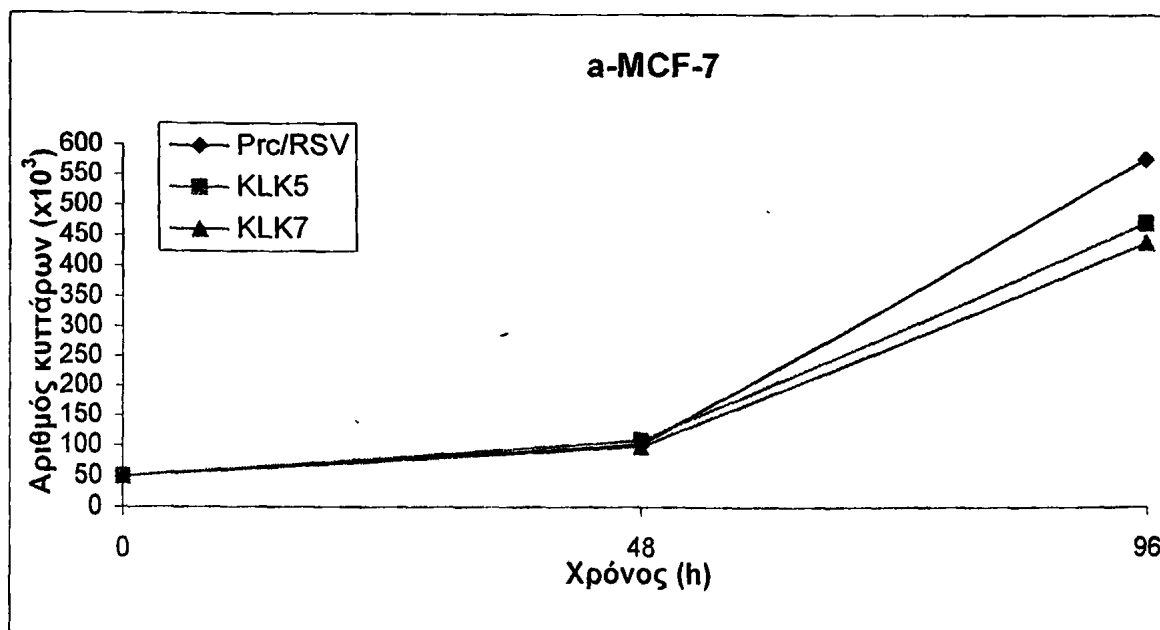


Σχήμα 7.24: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων MDA 435, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεΐνες (hK5 ή hK7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο.

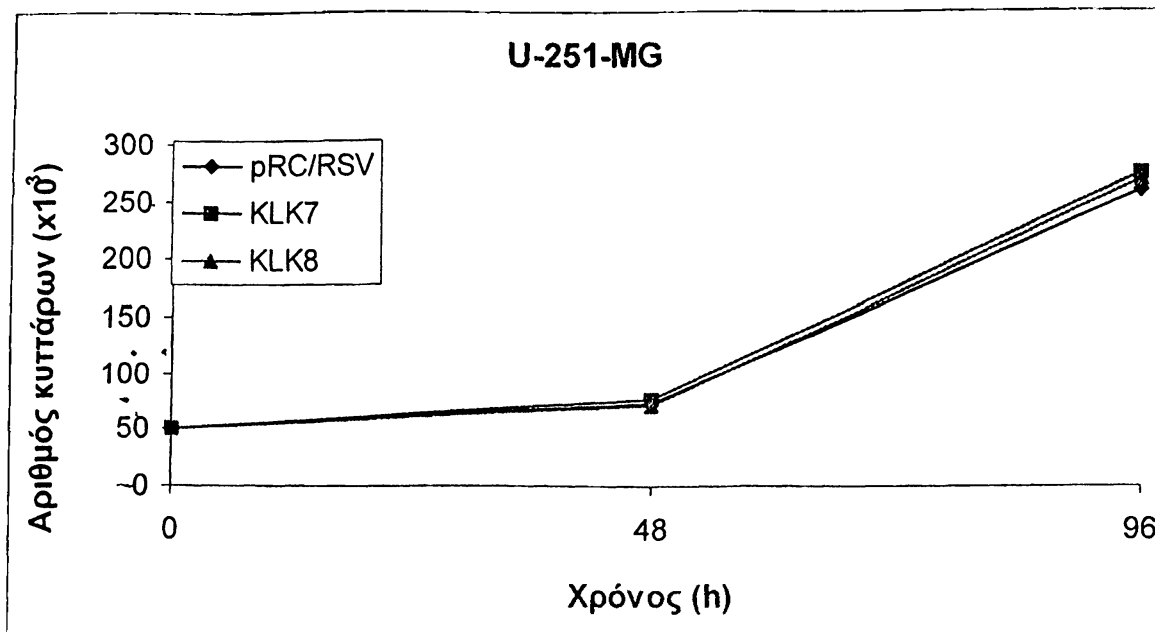




Σχήμα 7.25: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων MDA 231, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεϊνές (hK5, hK6 ή hK7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο.



Σχήμα 7.26: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων aMCF-7, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεϊνές (hK5 ή hK7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο.



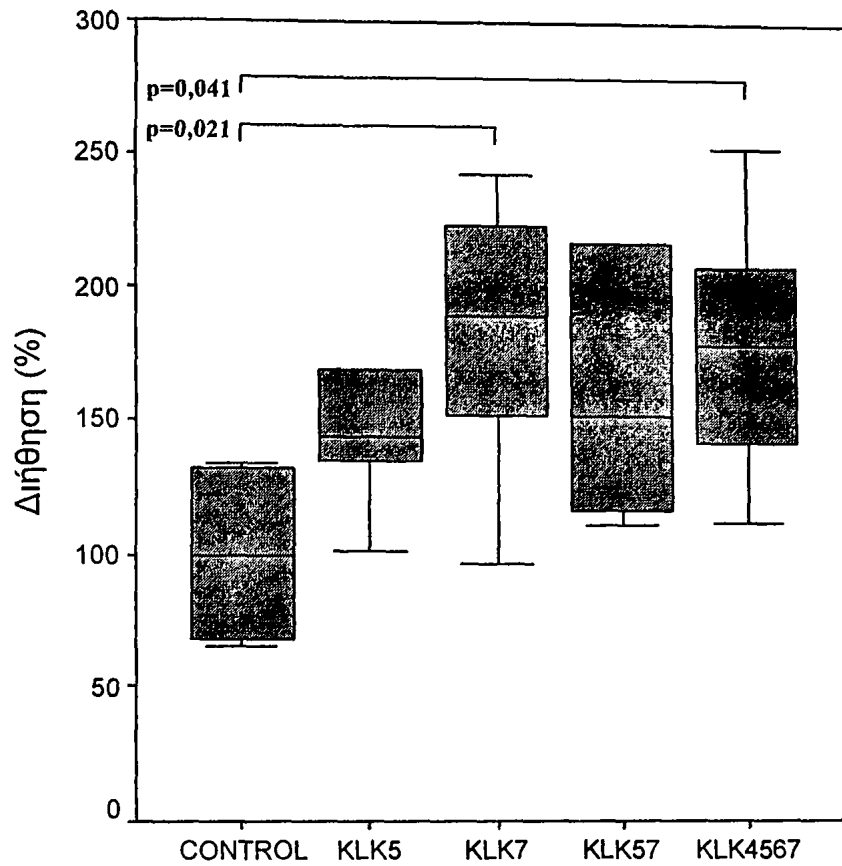
Σχήμα 7.27: Ρυθμός πολλαπλασιασμού κυττάρων U-251-MG, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεΐνες (hK7 ή hK8) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο.

7.8.3. Επίδραση της υπερέκφρασης των καλλικρεΐνων στη δυνατότητα διήθησης του κυτταρικού περιβάλλοντος

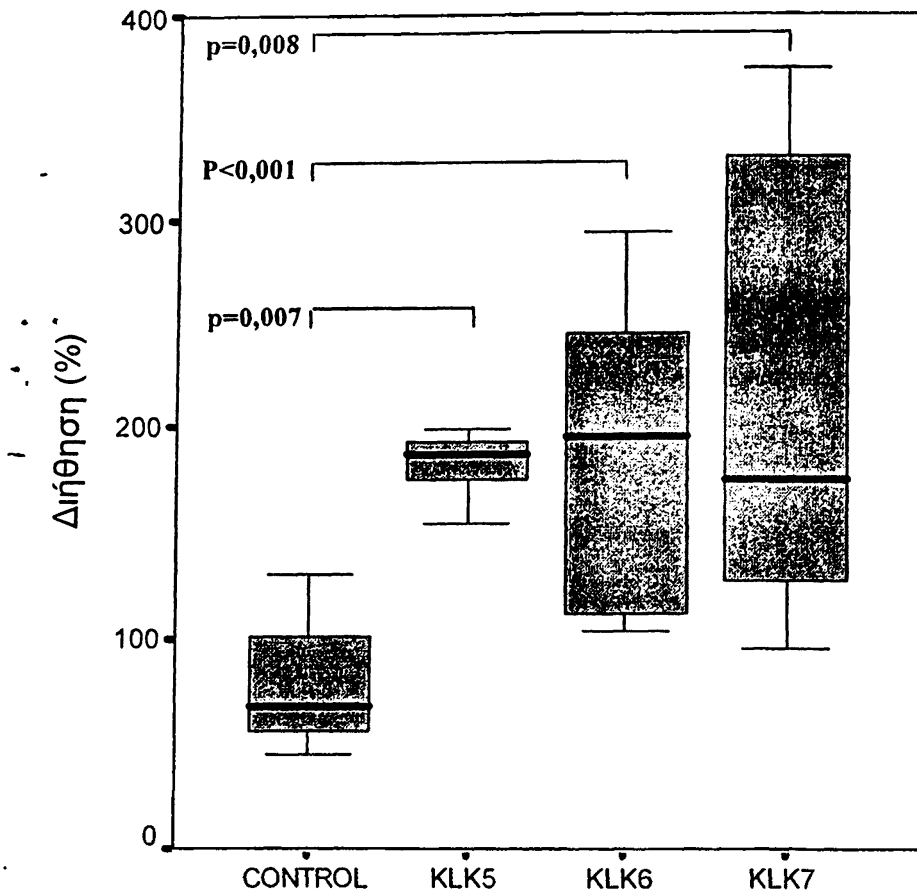
Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο η υπερέκφραση διαφόρων καλλικρεΐνών σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να επηρεάσει τη δυνατότητα διήθησης του κυτταρικού στρώματος από τα τελευταία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *in vitro* Matrigel Assay (ενότητα 6.18). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για τις διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές OV-MZ-6, MDA 231 και U-251-MG.

Στην καρκινική κυτταρική σειρά ωοθηκών OV-MZ-6, παρατηρήθηκε αύξηση της δυνατότητας διήθησης όλων των σειρών που υπερεξέφραζαν κάποια/ες καλλικρεΐνες (Σχήμα 7.28), σε σχέση με την κυτταρική σειρά ελέγχου. Η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν από 150% (για την OV-KLK5), έως και 200% (για την OV-KLK7). Μάλιστα, για τις σειρές OV-KLK7 και OV-KLK4+5+6+7, η αύξηση της διηθητικής ικανότητας ήταν στατιστικά σημαντική, όταν μελετήθηκε με το *paired samples T test* ($p=0,021$ και $p=0,041$, αντίστοιχα).

Στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MDA MB 231, παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της δυνατότητας διήθησης όλων των σειρών που υπερεξέφραζαν κάποια καλλικρεΐνη (Σχήμα 7.29), σε σχέση με την κυτταρική σειρά ελέγχου. Η μέση αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν από 142% (για την OV-KLK5), έως και 187% (για την OV-KLK6). Μάλιστα, και για τις τρεις σειρές 231-KLK5, 231-KLK6 και 231-KLK5, η αύξηση της διηθητικής ικανότητας ήταν στατιστικά σημαντική, όταν μελετήθηκε με το *paired samples T test* ($p=0,007$, $p=0,001$ και $p=0,008$, αντίστοιχα).

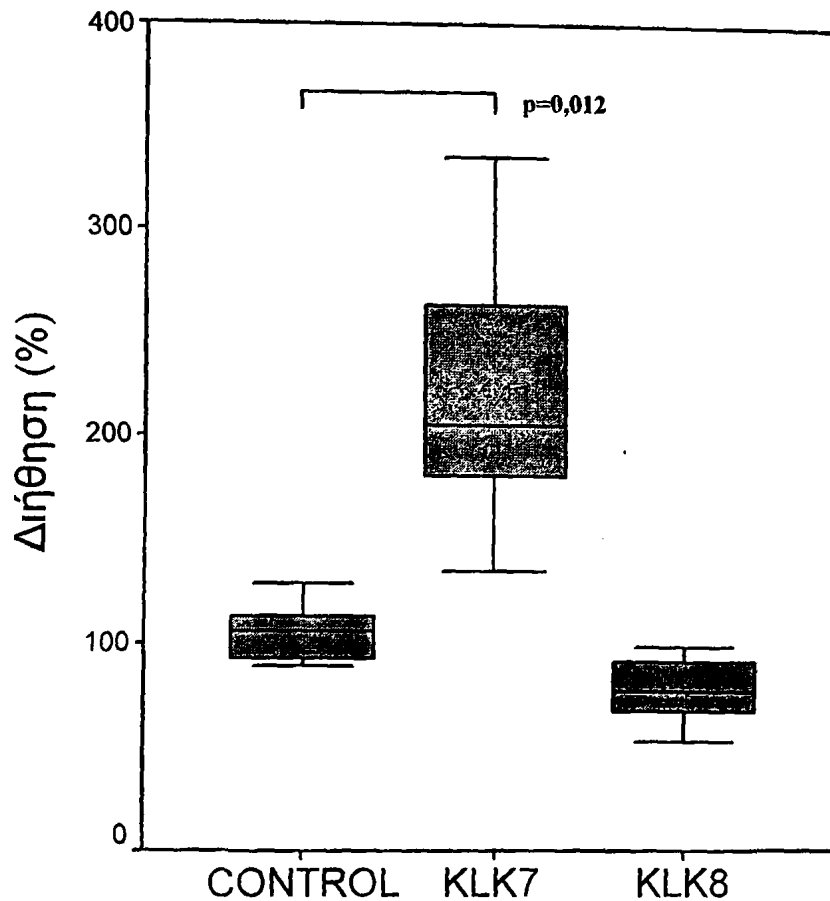


Σχήμα 7.28: Δοκιμασία *in vitro* Matrigel Assay σε κύτταρα OV-MZ-6, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεΐνες (hK5, hK7, hK5+7 ή hK4+5+6+7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο. Τα κόκκινα ορθογώνια αντιπροσωπεύουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος, που περιλαμβάνει το 50% των τιμών. Η οριζόντια γραμμή στο εσωτερικό των ορθογωνίων καταδεικνύει τη μέση τιμή και οι οριζόντιες γραμμές εκτός των ορθογωνίων καταδεικνύουν τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *paired samples T test*.



Σχήμα 7.29: Δοκιμασία *in vitro* Matrigel Assay σε κύτταρα MDA MB 231, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεΐνες (hK5, hK6, ή hK7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο. Τα κώκκινα ορθογώνια αντιπροσωπεύουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος, που περιλαμβάνει το 50% των τιμών. Η οριζόντια γραμμή στο εσωτερικό των ορθογωνίων καταδεικνύει τη μέση τιμή και οι οριζόντιες γραμμές εκτός των ορθογωνίων καταδεικνύουν τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *paired samples T test*.

Στην καρκινική κυτταρική σειρά εγκεφάλου U-251-MG, παρατηρήθηκε αύξηση της δυνατότητας διήθησης στη σειρά που υπερεξέφραζε την καλλικρεΐνη 7, αλλά μείωση στη σειρά που υπερεξέφραζε την καλλικρεΐνη 8 (Σχήμα 7.30), σε σχέση με την κυτταρική σειρά ελέγχου. Η μέση αύξηση που παρατηρήθηκε στη σειρά U251-KLK7 ήταν 233%, ενώ στη σειρά U251-KLK8 παρατηρήθηκε μείωση κατά 22%. Μάλιστα, για τη σειρά U251-KLK7, η αύξηση της διηθητικής ικανότητας ήταν στατιστικά σημαντική, όταν μελετήθηκε με το *paired samples T test* ($p=0,017$).



Σχήμα 7.30: Δοκιμασία *in vitro* Matrigel Assay σε κύτταρα U-251-MG, που εκφράζουν διάφορες καλλικρεΐνες (hK5, hK6, ή hK7) ή έχουν διαμολυνθεί με το φορέα pRc/RSV μόνο. Τα κόκκινα ορθογώνια αντιπροσωπεύουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος, που περιλαμβάνει το 50% των τιμών. Η οριζόντια γραμμή στο εσωτερικό των ορθογωνίων καταδεικνύει τη μέση τιμή και οι οριζόντιες γραμμές εκτός των ορθογωνίων καταδεικνύουν τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *paired samples T test*.

7.8.4. Επίδραση της υπερέκφρασης των καλλικρεΐνων στην καρκινική ανάπτυξη

Η αύξηση στη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων που παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης κάποιων εκ των μελών της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνων γέννησε το ερώτημα κατά πόσον μπορούν οι καλλικρεΐνες αυτές να επηρεάσουν την καρκινική ανάπτυξη και εξάπλωση *in vivo*. Για το λόγο αυτό, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές OV-KLK7, OV-KLK5+7, OV-KLK4+5+6+7 και η σειρά ελέγχου OV-pRc/RSV, εμβολιάστηκαν στην περιτοναϊκή κοιλότητα ποντικών, προκαλώντας την ανάπτυξη ενδοπεριτοναϊκών όγκων. Όταν παρήλθαν 64 ημέρες από την εισαγωγή των καρκινικών σειρών, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν και τα σπλάχνα τους αφαιρέθηκαν (σχήμα 7.31). Οι όγκοι ήταν εμφανείς ως οζίδια κάτω από το ήπαρ, στο μεσεντέριο και ως στρώματα καρκινικών κυττάρων ή αποικίες κατά μήκος του διαφράγματος και του εσωτερικού κοιλιακού τοιχώματος (*peritoneum parietalis*). Το πρότυπο κατανομής των όγκων ήταν κοινό σε όλες τις ομάδες ποντικών. Ήταν, ωστόσο, εμφανές πως οι όγκοι στην ομάδα ελέγχου ήταν λιγότεροι και μικρότεροι από ό,τι στις υπόλοιπες ομάδες. Εν συνεχεία, αφαιρέθηκαν οι όγκοι που είχαν σχηματιστεί στα σπλαχνικά όργανα και μετρήθηκε η ολική μάζα των καρκινικών όγκων και η ολική μάζα των σπλάχνων ανά ζώο. Υπολογίστηκε ο λόγος των δύο

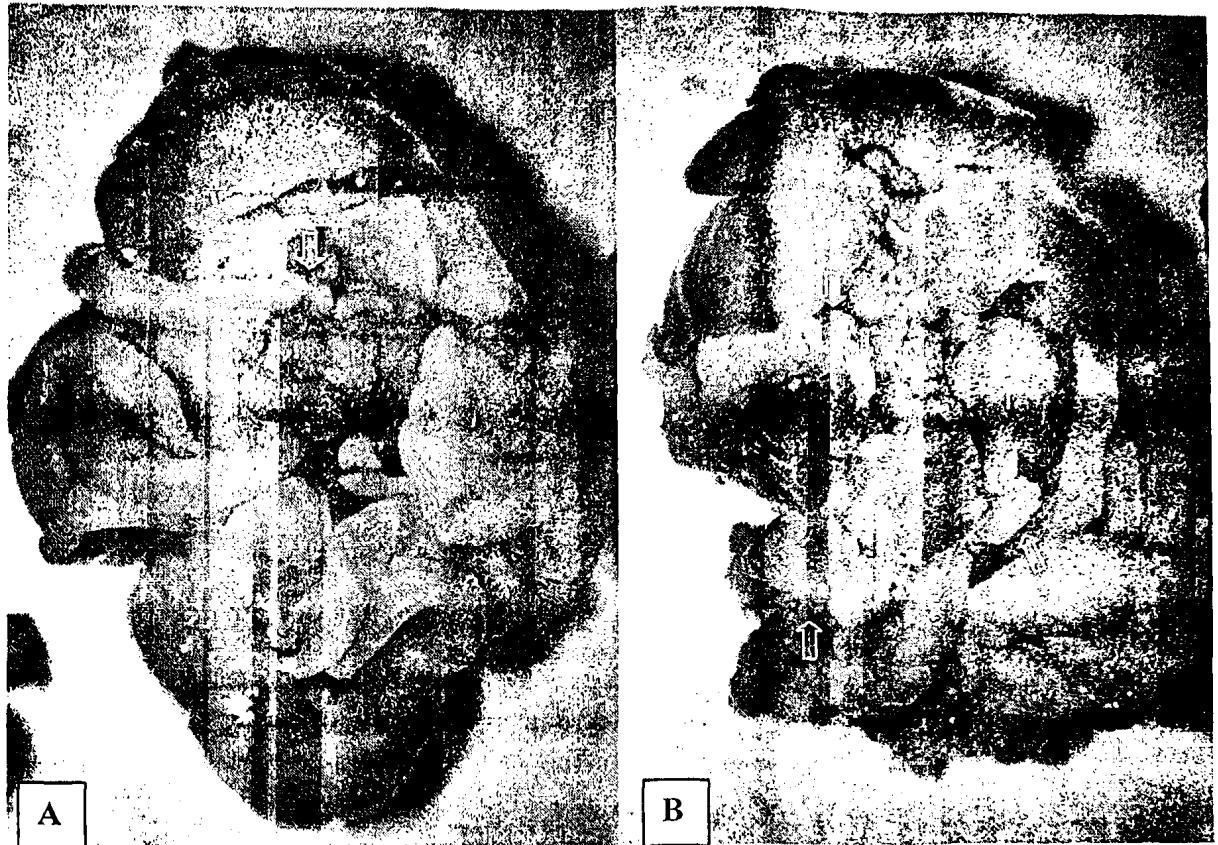
αριθμών και παρατηρήθηκε ότι και στις τρεις ομάδες ζώων που είχαν εμβολιαστεί με κύτταρα που υπερεξέφραζαν κάποια ή κάποιες καλλικρεΐνες, η συνολική καρκινική μάζα ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στα ζώα που είχαν εμβολιαστεί με την κυτταρική σειρά ελέγχου (σχήμα 7.32).

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα αποτελέσματα οφείλονται στην αυξημένη έκφραση των καλλικρεΐνών, μετρήθηκαν με ELISA τα επίπεδα έκφρασης των καλλικρεΐνών 4, 5, 6 και 7 στους αφαιρεθέντες όγκους και το ασκτικό υγρό από αντιπροσωπευτικά πειραματόζωα κάθε ομάδας (Πίνακας 7.24). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι επιλεγμένες καλλικρεΐνες εκφράστηκαν και απελευθερώθηκαν όπως έπρεπε. Εξαιρεση αποτέλεσε η καλλικρεΐνη 6, το επίπεδο έκφρασης της οποίας ήταν πολύ χαμηλό. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η hK6 ρυθμίζεται μέσω ενός αυτοπρωτεολυτικού μηχανισμού (Bayes *et al*, 2004). Αντίθετα, τα περισσότερα δείγματα όγκων και ασκτικού υγρού από την ομάδα ελέγχου ήταν αρνητικά ως προς την έκφραση των καλλικρεΐνών. Εξαιρεση αποτέλεσαν καρκινικοί όγκοι αυτής της ομάδας, οι οποίοι παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση των καλλικρεΐνών 4 και 7 (περίπου 10 φορές χαμηλότερη από ότι η ομάδα KLK4+5+6+7, πίνακας 7.24). Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται σε *de novo* σύνθεση των ενζύμων αυτών από τα καρκινικά κύτταρα κατά την ανάπτυξη του όγκου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με ELISA παρουσιάζονται γραφικά στα σχήματα 7.34 έως 7.36.

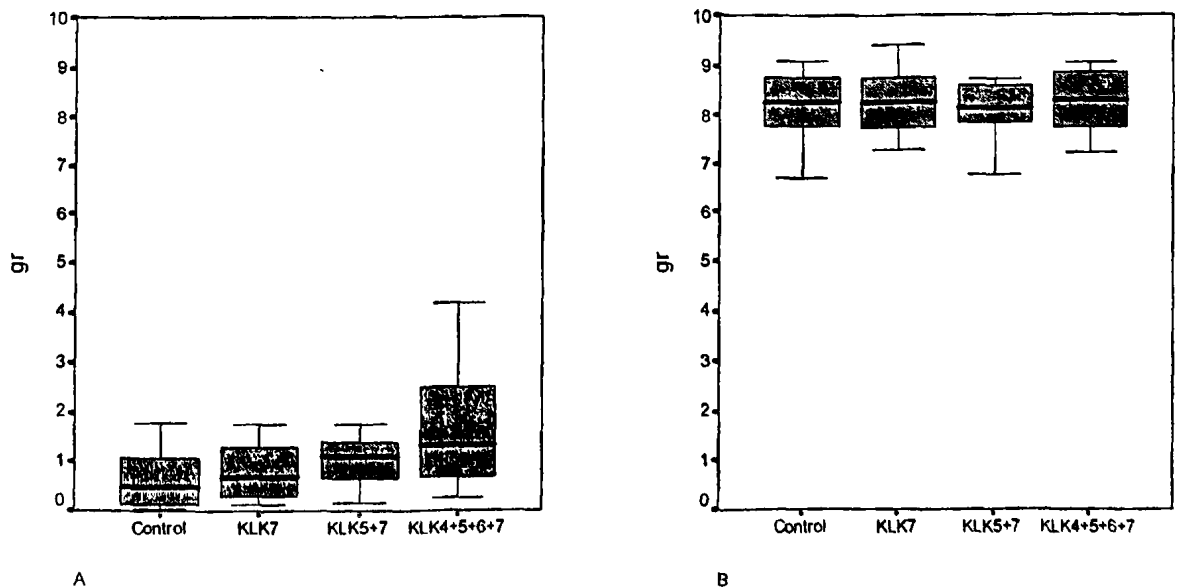
Συγκέντρωση πρωτεΐνης	hK4	hK5	hK6	hK7
<u>Στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας</u>				
(ng/ml) ¹				
OV-RSV	0	0,1	0,2	0,4
OV-KLK7	0	0	0	160,2
OV-KLK5+7	0	1,7	0	28,6
OV-KLK4+5+6+7	20,1	1,1	0,53	15,0
<u>Στον καρκινικό ιστό (ng/mg)²</u>				
OV-RSV (n=4)	0,5±0,2	0	0	0,5±0,3
OV-KLK7	0,6±0,15	0	0	11,4±6,1
OV-KLK5+7	0,6±0,2	0,73±0,6	0	7,6±3,8
OV-KLK4+5+6+7 (n=2)	4,4±1,2	1,24±0,5	0,06±0,03	6,7±2,2
<u>Στο ασκτικό υγρό (ng/ml)³</u>				
OV-RSV (n=11)	0	0	0	0
OV-KLK7(n=11)	0,07±0,06	0,04±0,07	0,06±0,05	19,4±18,8
OV-KLK5+7(n=9)	0,07±0,06	0,4±0,3	0,07±0,05	25,3±14,4
OV-KLK4+5+6+7 (n=13)	13,2±9,6	0,9±0,8	0,2±0,1	3,1±3,4

Πίνακας 7.24: Επίπεδα συγκέντρωσης των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών 4, 5, 6 και 7 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (τη στιγμή της ένεσης των κυττάρων στα πειραματόζωα), και στους καρκινικούς ιστούς και το ασκτικό υγρό των ποντικών, 64 ημέρες μετά την ένεση των διαμολυσμένων καρκινικών κυττάρων. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μετρήθηκε με ειδικές δοκιμασίες ELISA που ανιχνεύουν επιλεκτικά τις παραπάνω καλλικρεΐνες. Η ευαισθησία των δοκιμασιών για τις hK4, hK5 και hK6 είναι 0,01ng/ml και για την hK7 είναι 0,02 ng/ml. ¹Το επίπεδο των καλλικρεΐνών μετρήθηκε την ημέρα του εμβολιασμού των καρκινικών κυττάρων στα ποντίκια, στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων OV-MZ-6 που ήταν σταθερά διαμολυσμένα είτε με το πλασμίδιο pRc/RSV, είτε με τους φορείς έκφρασης pRc/RSV-KLK4, pRc/RSV-KLK5, pRc/RSV-KLK6 και pRc/RSV-KLK7. ²Το επίπεδο των καλλικρεΐνών μετρήθηκε στον καρκινικό ιστό που αφαιρέθηκε από τις τέσσερις ομάδες πειραματόζωων στις οποίες είχαν εισαχθεί αντίστοιχα οι καρκινικές σειρές OV-RSV, OV-KLK7, OV-KLK5+7 και OV-KLK4+5+6+7. ³Το επίπεδο των καλλικρεΐνών μετρήθηκε στο ασκτικό υγρό που αφαιρέθηκε από την περιτοναϊκή κοιλότητα των δύο ομάδων ποντικών.



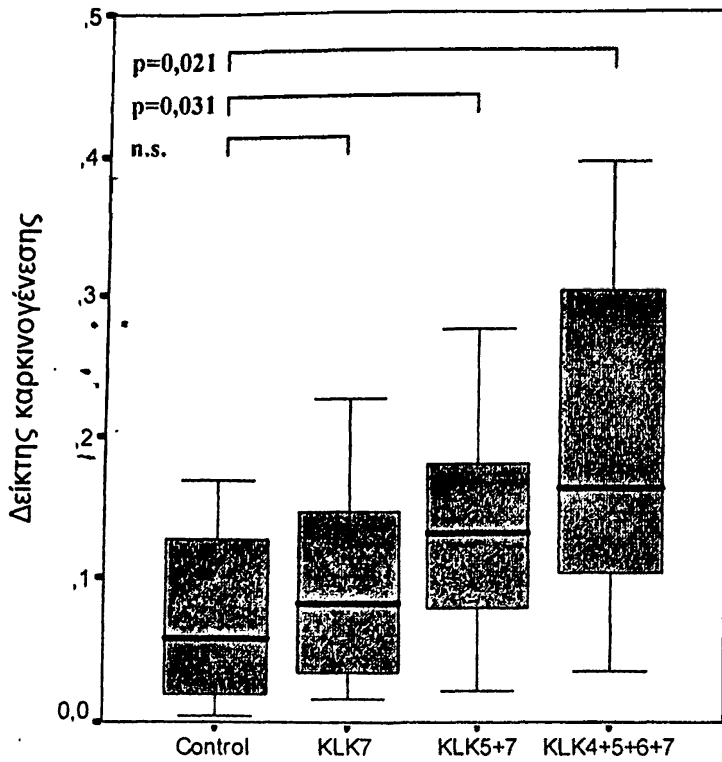


Σχήμα 7.31: Διασπορά των καρκινικών όγκων στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικές φωτογραφίες από τις ομάδες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα OV-RSV (A) και OV-KLK4+5+6+7(B). Το μέγεθος και ο αριθμός των όγκων (που παρουσιάζονται με βέλη) που αναπτύχθηκαν στα σπλάγχνα των ζώων αυξήθηκαν σημαντικά στη δεύτερη ομάδα.

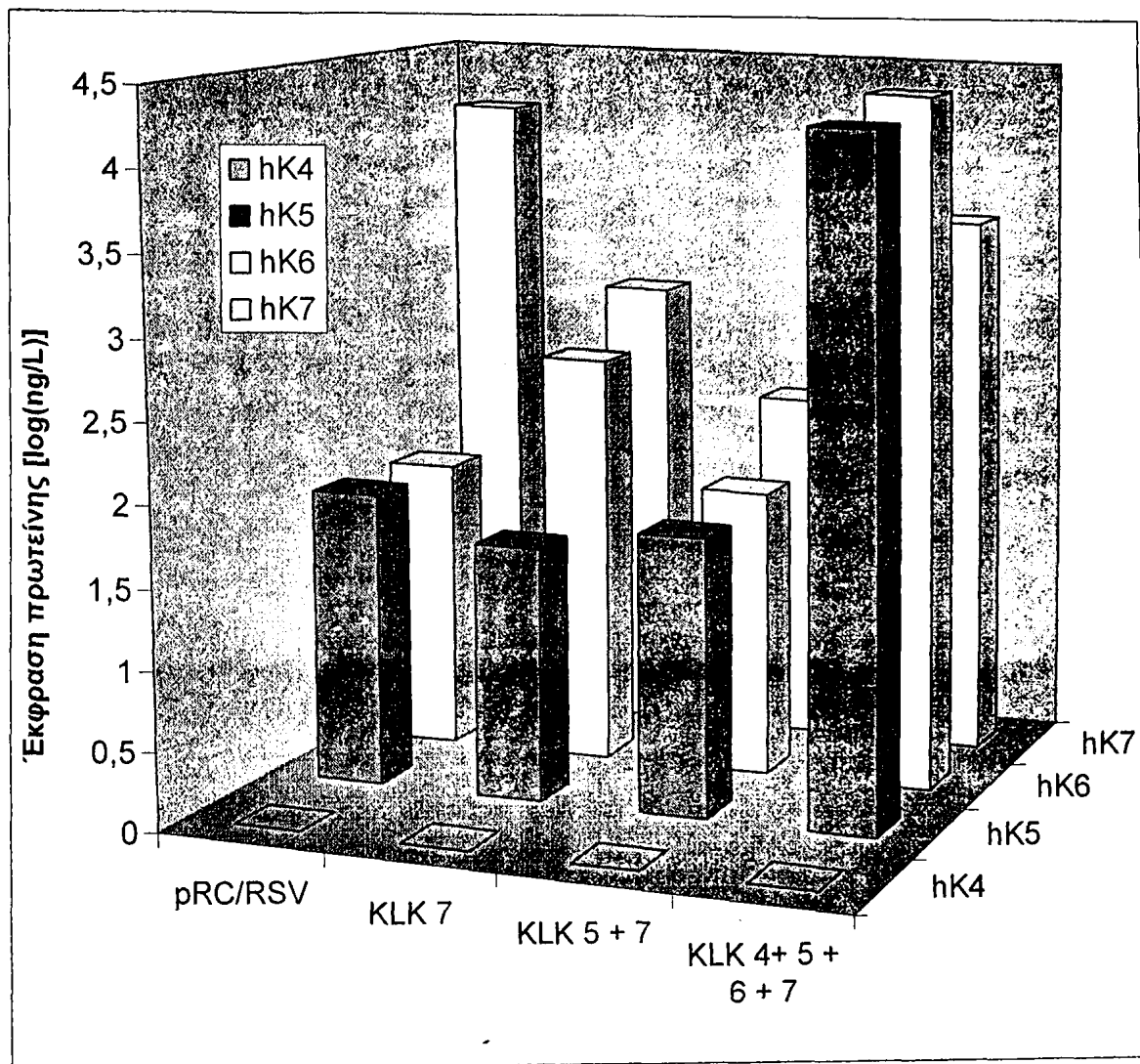


Σχήμα 7.32: Ολική μάζα όγκου (A) και ολική μάζα εσωτερικών οργάνων (B) στις τέσσερις ομάδες ποντικών.

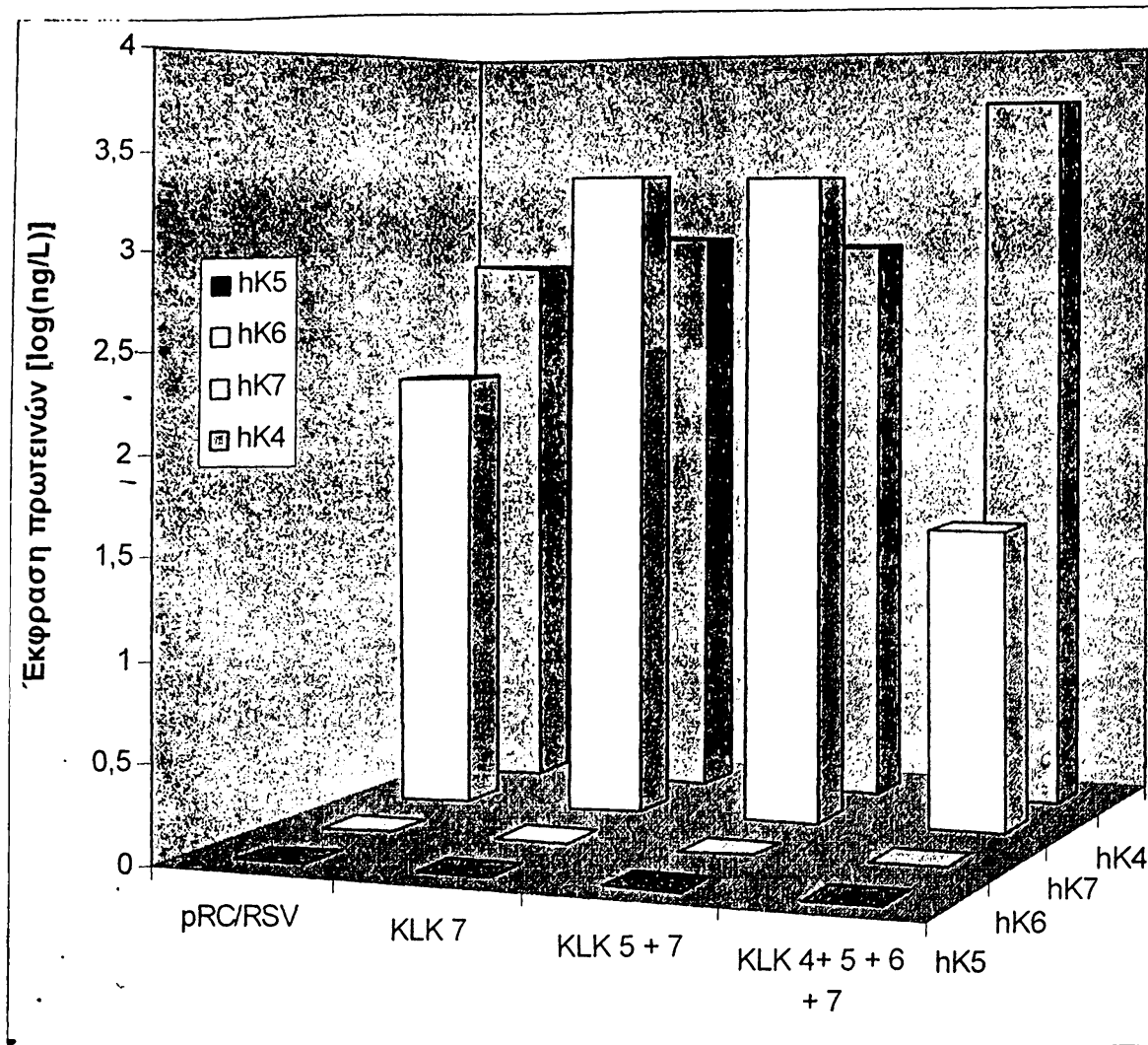




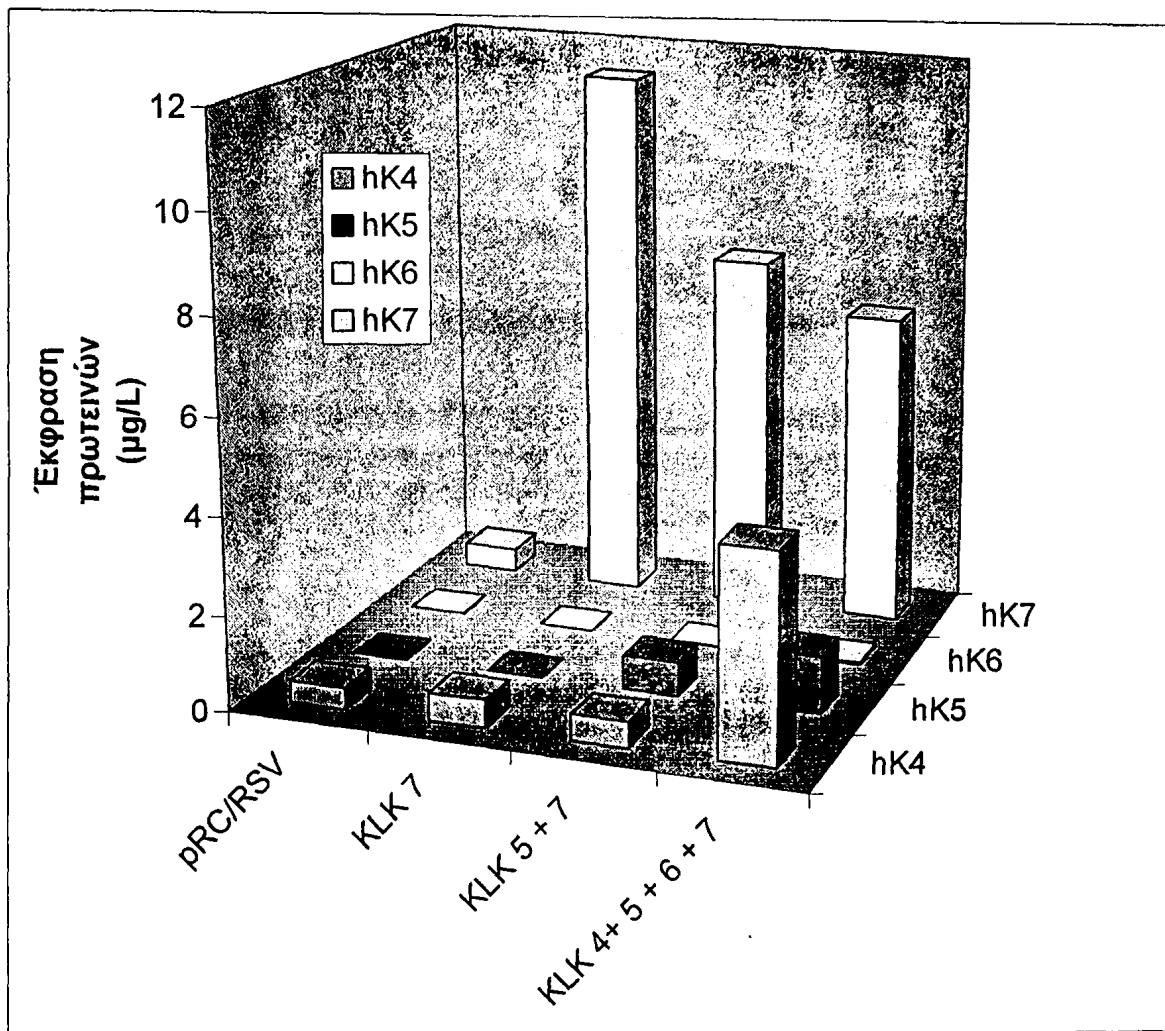
Σχήμα 7.33: Σχετική καρκινική μάζα (μάζα όγκων/ μάζα σπλάχνων). Τα κόκκινα ορθογώνια αντιπροσωπεύουν το ενδοτεταρτημοριακό εύρος, που περιλαμβάνει το 50% των τιμών. Η οριζόντια γραμμή στο εσωτερικό των ορθογωνίων καταδεικνύει τη μέση τιμή και οι οριζόντιες γραμμές εκτός των ορθογωνίων καταδεικνύουν τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *paired samples T test*.



Σχήμα 7.34: Μέση έκφραση της πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών 4, 5, 6 και 7 στο ασκίτικό υγρό των τεσσάρων ομάδων ποντικών που εμβολιάστηκαν με τις κυτταρικές σειρές OV-pRc/RSV, OV-KLK5, OV-KLK7 και OV-KLK4+5+6+7.



Σχήμα 7.35: Σχήμα 7.34: Μέση έκφραση της πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών 4, 5, 6 και 7 στον ορό του αίματος των τεσσάρων ομάδων ποντικών που εμβολιάστηκαν με τις κυτταρικές σειρές OV-pRc/RSV, OV-KLK5, OV-KLK7 και OV-KLK4+5+6+7.

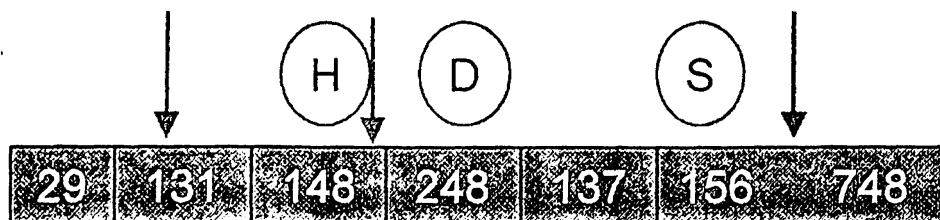


Σχήμα 7.36: Σχήμα 7.34: Μέση έκφραση της πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών 4, 5, 6 και 7 στους καρκινικούς όγκους των τεσσάρων ομάδων ποντικών που εμβολιάστηκαν με τις κυτταρικές σειρές OV-pRc/RSV, OV-KLK5, OV-KLK7 και OV-KLK4+5+6+7.

7.9. Μελέτη του υποκινητή της καλλικρεΐνης 7

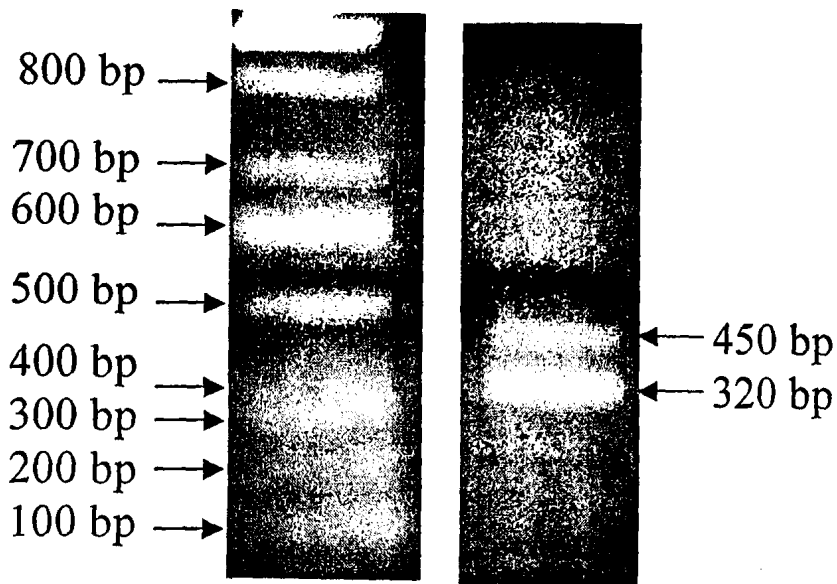
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του γονιδίου της KLK7 ρυθμίζεται από οιστρογόνα και γλυκοκορτικοειδή (Yousef *et al*, 2000). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός ρύθμισης προϋποθέτει την παρουσία στοιχείου απόκρισης στους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERE) στην περιοχή ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου, δηλαδή την αλληλουχία του υποκινητή ή του ενισχυτή της KLK7. Νεώτερες μελέτες, όμως, έχουν δείξει ότι η καλλικρεΐνη 7 μπορεί εκφράζεται ισχυρά ακόμη και σε μη ορμονο-εξαρτώμενους ιστούς ή τύπους καρκίνου (Planque *et al*, 2005) συνιστώντας ότι μπορεί να υπάρχει και άλλος τρόπος ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου.

Για το λόγο αυτό στα πλαίσια της παρούσης εργασίας πραγματοποιήθηκε εισαγωγική μελέτη της περιοχής του υποκινητή της KLK7. Αρχικά, με εφαρμογή της μεθόδου 5'RACE, ανιχνεύθηκε το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου (Σχήματα 7.37, 7.38). Από την τελική αντίδραση PCR προέκυψαν δύο προϊόντα. Η αντίδραση αλληλούχισης (sequencing) των προϊόντων αυτών κατέδειξε ότι δεν διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το νουκλεοτίδιο έναρξης της μεταγραφής, αλλά ως προς το εξόνιο 2. Δηλαδή το μικρότερο προϊόν προέρχεται από το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του mRNA της KLK7. Η θέση έναρξης της μεταγραφής εντοπίστηκε 124 bp άνωθεν του σημείου έναρξης της μετάφρασης.

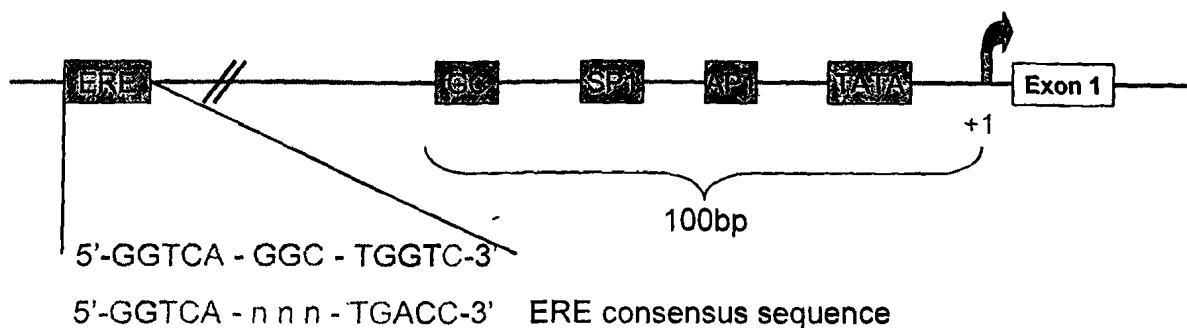


Σχήμα 7.37: Σχηματική παράσταση της κωδικής περιοχής της καλλικρεΐνης 7 όπου παρουσιάζονται τα σημεία έναρξης και λήξης της μετάφρασης για το φυσικό τύπο προϊόν (κόκκινα βέλη), το σημείο έναρξης της μετάφρασης για το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος (πράσινο βέλος) και η θέση υβριδισμού του ειδικού για το γονίδιο εκκινητή (*Gene Specific Primer*) που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του σημείου έναρξης της μεταγραφής με χρήση της μεθόδου 5'RACE.

Εν συνεχεία μελετήθηκε η αλληλουχία μήκους 5Kb που βρίσκεται άνωθεν του γονιδίου της KLK7 με το πρόγραμμα αναγνώρισης πιθανών αλληλουχιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων Genomatix. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύθηκαν διάφορες τέτοιες αλληλουχίες στην περιοχή πριν το γονίδιο της KLK7. Από αυτές, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μία πιθανή αλληλουχία ERE στη θέση -3151bp, και οι αλληλουχίες που βρίσκονται στην περιοχή του εγγύς υποκινητή, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και το στοιχείο TATA (TATA box) (Σχήματα 7.39 και 7.40).



Σχήμα 7.38: ανάλυση των προϊόντων της 5'RACE σε πηκτή αгарόζης.



Σχήμα 7.39: Σχηματική παράσταση της χρωμοσωμικής περιοχής άνωθεν του γονιδίου της καλλικρεΐνης 7, όπου παρουσιάζονται τα πιθανά στοιχεία ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή και μία πιθανή αλληλουχία ERE που ανιχνεύθηκε στην θέση -3151bp και διαφέρει από την τυπική αλληλουχία ERE κατά δύο βάσεις.

Η αλληλουχία με πιθανή δράση ERE παρουσιάζει 83% ομολογία με την τυπική (consensus) αλληλουχία ERE. Μία αναδρομή στη βιβλιογραφία έδειξε ότι αν και πολλές παραλλαγές της τυπικής αλληλουχίας έχουν ανιχνευθεί σε άλλα γονίδια, η συγκεκριμένη δεν έχει συναντηθεί ξανά. Το κατά πόσον η αλληλουχία αυτή αποτελεί ένα λειτουργικό στοιχείο ERE, είναι κάτι που πρέπει να διερευνηθεί στο μέλλον.

Το στοιχείο TATA ανιχνεύθηκε στη θέση -28bp. Παράλληλα, στον εγγύς υποκινητή του γονιδίου, ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τους μεταγραφικούς παράγοντες SP1 (-195bp και -41bp), GATA (-121bp), AP2 (-68bp) και AP4 (+25bp). Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες είναι πολύ γνωστοί και διαδομένοι, καθώς εμπλέκονται ενεργά στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων. Η λειτουργικότητα, ωστόσο, των συγκεκριμένων στοιχείων πρέπει να επιβεβαιωθεί στο μέλλον.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



8.1. Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε γυναικολογικούς και μη- τύπους καρκίνου

Εκτεταμένη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί κατά τις τελευταίες δεκαετίες με σκοπό την ανακάλυψη καρκινικών δεικτών που θα βοηθήσουν τον έλεγχο του πληθυσμού, τη διάγνωση, την παρακολούθηση και την πρόγνωση, με τελικό βέβαια αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης των ασθενών. Οι παραδοσιακοί, αλλά και οι πιο πρόσφατοι βιοδείκτες, αποτελούν παράγοντες που είτε εμπλέκονται στην καρκινογένεση, είτε είναι παραπροϊόντα του κακοήθους μετασχηματισμού, μπορούν δε να είναι ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, κυτταροκίνες, αγγειογενετικοί παράγοντες, υδρογονανθρακικά αντιγόνα, πρωτεολυτικά ένζυμα, νουκλεϊνικά οξέα, αυτό-αντισώματα, πρωτεΐνες προσκόλλησης και κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Chan and Schwartz, 2002).

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα, ιδιαίτερα, έχουν συγκεντρώσει μεγάλο μέρος της ερευνητικής προσπάθειας, εξαιτίας του σημαντικού τους ρόλου στην ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων (Duffy, 1991, Noel *et al*, 1997). Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες είναι ανάμεσα στα πρωτεολυτικά ένζυμα της τάξης της σερίνης που έχουν εμπλακεί στην καρκινογένεση (Diamandis *et al*, 2000, Yousef *et al*, 2001). Η οικογένεια αυτή περιέχει καθιερωμένους (hK3/PSA) αλλά και πιθανούς (hK2, hK5, hK6, hK8, hK10 και hK11) ορολογικούς καρκινικούς δείκτες, καθώς και δείκτες πρόγνωσης (Diamandis and Yousef, 2002). Ανάμεσα στους τελευταίους είναι και η καλλικρεΐνη 7, ένα ορμονο-ρυθμιζόμενο γονίδιο καλλικρεΐνης, που παρουσιάζει διαφορική έκφραση σε αρκετούς ορμονο-εξαρτώμενους και πιθανή προγνωστική σημασία για τον καρκίνο του μαστού (Taliari *et al*, 2004), των ωοθηκών (Kyriakopoulou *et al*, 2003) και άλλων τύπων καρκίνου.

Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του μαστού

Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η αυξημένη έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του μαστού συνδέεται με δυσμενή εξέλιξη της κατάστασης των ασθενών (Taliari *et al*, 2004). Άλλες όμως μελέτες δεν επιβεβαιώνουν την υπερέκφραση της καλλικρεΐνης 7 και των υπολοίπων μελών της οικογένειας των ιστικών καλλικρεΐνών σε ιστούς από καρκίνο του μαστού αλλά, αντιθέτως, δείχνουν κατωρύθμιση τουλάχιστον τεσσάρων γονιδίων (KLK5, KLK6, KLK8, KLK10) στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Yousef *et al*, 2004).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ποσοτικά η έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του μαστού. Σε αντίθεση με τη μοναδική προηγούμενη μελέτη της έκφρασης του mRNA του γονιδίου στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου (Taliari *et al*, 2004), παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου, σύμφωνα με την ανάλυση Cox παλινδρόμησης μίας ή πολλών μεταβλητών. Η διαφορά αυτή ίσως μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές παραμέτρους των δύο μελετών. Έτσι, πιθανώς οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Χαρακτηριστικό είναι ότι στην προηγούμενη μέθοδο (όπου η μελέτη έγινε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR), περισσότερα από το ήμισυ των δειγμάτων (54.3%) ήταν αρνητικά ως προς την έκφραση της καλλικρεΐνης 7, γεγονός που πιθανώς οφείλεται σε μειωμένη

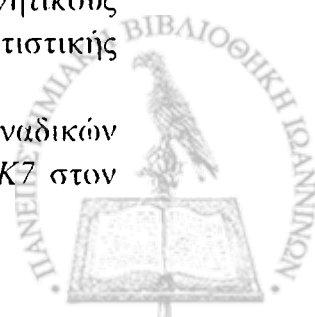
ευαισθησία, σε σχέση με την ποσοτική μέθοδο που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Παρόμοια αναντιστοιχία ως προς την έκφραση της καλλικρεΐνης 7 παρατηρήθηκε και στην ομάδα των μη καρκινικών δειγμάτων μαστού. Έτσι, στην προηγούμενη μελέτη το mRNA της *KLK7* δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από τους μη κακοήθεις ιστούς, ενώ αντίθετα, στην παρούσα μελέτη θετική έκφραση παρουσίασαν τα 9 από τα δέκα φυσιολογικά δείγματα μαστού που μελετήθηκαν. Η τελευταία παρατήρηση φαίνεται να είναι περισσότερο αξιόπιστη, καθώς συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που καταδεικνύουν χαμηλή έκφραση του RNA και της πρωτεΐνης της καλλικρεΐνης 7 σε μη κακοήθεις ιστούς μαστού (Yousef *et al*, 2000, Kishi *et al*, 2004).

Ο διαφορετικός σχεδιασμός της ποσοτικής μεθόδου PCR που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη σε σχέση με εκείνον της ποιοτικής μεθόδου που εφαρμόστηκε στην προηγούμενη εργασία (Taliari *et al*, 2004) προσφέρει μία ακόμη ερμηνεία για την αναντιστοιχία των αποτελεσμάτων. Στην παρούσα μελέτη, το αρχικό εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο στοχεύει στην αλληλουχία που σχηματίζεται από την ένωση των εξονίων 2 και 3 του mRNA της *KLK7*, ενώ το τελικό εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο υβριδίζει με μία αλληλουχία του εξονίου 3. Ο συνδυασμός αυτών των μορίων έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας που συναντάται αποκλειστικά στο πλήρους μήκους μετάγραφο της καλλικρεΐνης 7. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή είναι επιλεκτική για το συγκεκριμένο μετάγραφο, το οποίο είναι και το μόνο που κωδικοποιεί για λειτουργικό ένζυμο με δράση πρωτεάσης σερίνης. Αντίθετα, στην προηγούμενη μελέτη, τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του mRNA της καλλικρεΐνης 7 στόχευαν σε αλληλουχίες των εξονίων 4 και 5, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό, μη επιλεκτικά, τόσο του πλήρους μήκους μεταγράφου, όσο και του εναλλακτικού μεταγράφου από το οποίο απουσιάζει το εξόνιο 2. Το εναλλακτικό μάτισμα αποτελεί ένα πολύ συχνό φαινόμενο στο γενετικό τόπο των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών. Το σύνολό των μεταγράφων που έχουν παρατηρηθεί για όλη την οικογένεια ξεπερνά τα 82 (Kurlender *et al*, 2005). Αρκετά από τα μετάγραφα αυτά είναι ειδικά για κάποιους τύπους καρκίνου και, επομένως, αποτελούν εν δυνάμει καρκινικούς δείκτες (Borgono *et al*, 2004). Έτσι, ο συνδυασμένος πολλαπλασιασμός του πλήρους μεγέθους μεταγράφου του mRNA της *KLK7* και του ισχυρά εκφραζόμενου, καρκινο-συσχετιζόμενου εναλλακτικού μεταγράφου του, μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα από την επιλεκτική ενίσχυση του πλήρους μεγέθους μεταγράφου αποκλειστικά.

Στον καρκίνο του πνεύμονα, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης mRNA της καλλικρεΐνης 7 τείνουν να εμφανίζονται σε όγκους ασθενών που δεν παρουσιάζουν λεμφαδενικές ή άλλες μεταστάσεις (Planque *et al*, 2005). Αντίθετα, οι περισσότεροι μεταστατικοί όγκοι εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα. Η ίδια τάση εμφανίζεται και στην παρούσα μελέτη: χαμηλότερη έκφραση της *KLK7* εμφανίζεται σε καρκινικά δείγματα από ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες από ό,τι σε εκείνους με αρνητικούς λεμφαδένες, αν και η διαφορά αυτή μόλις προσεγγίζει το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.059$).

Μια τελευταία πιθανή εξήγηση της διαφοράς μεταξύ των δύο μοναδικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί για την έκφραση του mRNA της *KLK7* στον

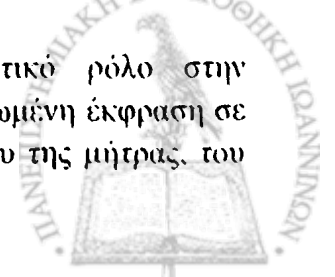


καρκίνο μπορεί να προσφέρει η διαφορά στην θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών. Για παράδειγμα, στη μελέτη από την Talieri *et al*, οι περισσότεροι (87 από τους 92 ή 94,6%) ασθενείς έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία (ορμονοθεραπεία ή χημειοθεραπεία), ενώ στην παρούσα μελέτη, 69 από τους 155 ασθενείς ή 44,5% δεν έλαβαν καμία συμπληρωματική θεραπεία. Επίσης, από την τελευταία αποκλείστηκαν ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία πριν από την χειρουργική αφαίρεση του όγκου (neoadjuvant θεραπεία), ενώ δεν συνέβη το ίδιο στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Talieri *et al*. Η neoadjuvant θεραπεία συνίσταται στην χορήγηση χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας, ορμονοθεραπείας ή μοριακής θεραπείας μεμονωμένα ή σε συνδυασμό μεταξύ τους, πριν από τη χειρουργική αντιμετώπιση, με σκοπό τη βελτίωση της έκβασης του ασθενούς (Garces *et al*, 2006). Η θεραπεία αυτή προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως αυξημένη αντι-νεοπλασματική δράση, καλύτερη ανοχή στη θεραπεία, πρώιμη αντιμετώπιση των μικρομεταστάσεων, πληροφωρία για την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα του όγκου, αλλά και την πιθανότητα πλήρους παθολογικής απόκρισης (Issels and Schlemmer, 2002, Gortzak *et al*, 2001). Όπως κάθε θεραπεία όμως, έχει και μειονεκτήματα, όπως καθυστέρηση της αντιμετώπισης του όγκου, στην περίπτωση που η θεραπεία δεν έχει αποτέλεσμα ή προκαλέσει τοξικότητα, δυσκολότερο καθορισμό του παθολογικού σταδίου της νόσου και αυξημένο κίνδυνο μετεγχειρητικών επιπλοκών (Phan and Patel, 2003, Cormier *et al*, 2004). Καθώς όμως αποτελεί μία προσέγγιση που προκαλεί πολλές διαταραχές στα καρκινικά κύτταρα (νέκρωση, απόπτωση, απορύθμιση κυτταρικού κύκλου) μπορεί να επηρεάσει τις ιστολογικές παραμέτρους ή την έκφραση διαφόρων βιολογικών παραγόντων (Nason *et al*, 2000). Για το λόγο αυτό, συνίσταται να μη συμπεριλαμβάνονται ασθενείς που έχουν λάβει προ-εγχειρητική θεραπεία σε μελέτες έκφρασης κυτταρικών παραγόντων, όπως πρωτεολυτικά ένζυμα. Αντίθετα, ελάχιστες διαφορές υπήρχαν ανάμεσα στις δύο μελέτες ως προς την κατανομή των ασθενών σε σχέση με την κατάσταση των λεμφαδένων ή των ορμονικών υποδοχέων.

Έχει βρεθεί ότι η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 αυξάνεται σε καρκινικά κύτταρα μαστού από οιστρογόνα και γλυκοκορτικοειδή (Yousef *et al*, 2000). Η έκφραση της KLK7 έχει επίσης συσχετισθεί αντίστροφα με την ιστολογική διαβάθμιση του όγκου (grade) και την κατάσταση των υποδοχέων προγεστερόνης (PgR). Στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της KLK7 με τους παραπάνω παράγοντες, αλλά με το επίπεδο των οιστρογονικών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, υψηλότερες τιμές της καλλικρεΐνης 7 συσχετίστηκαν σημαντικά με αρνητική έκφραση των υποδοχέων αυτών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του πλήρους μεγέθους mRNA της KLK7 (και, συνεπώς, η έκφραση και του ενζύμου hK7) μπορεί να αποτελέσει δείκτη ευνοϊκής πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Αν και η δράση των πρωτεασών στην κακοήθεια θεωρείται ότι γενικά ευνοεί την καρκινική ανάπτυξη και τη μετάσταση (Van Kempen *et al*, 2006, Decock, *et al*, 2005), φαίνεται ότι αυτό δεν ισχύει πάντα. Σε μερικές πρωτεάσες, όπως η μεταλλοπρωτεάση 9 του στρώματος (MMP-9), έχει αποδοθεί στο παρελθόν ρόλος δείκτη ευνοϊκής πρόγνωσης των ασθενών (Scorilas *et al*, 2001).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα καλλικρεΐνης με αντιφατικό ρόλο στην κακοήθεια αποτελεί η καλλικρεΐνη 10. Η KLK10 παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε πολλές καρκινικές σειρές μαστού και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του

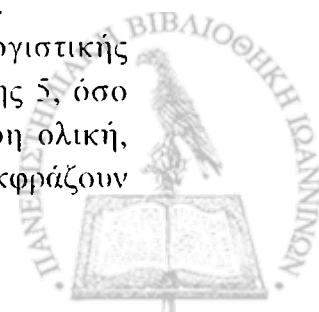


προστάτη και την οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Όταν μάλιστα διαμολύνθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού προκάλεσε μείωση της καρκινικής ανάπτυξης. Αντίθετα, η έκφρασή της αυξάνεται στον καρκίνο των ωοθηκών. Φαίνεται ότι η στον καρκίνο η μείωση της έκφρασής της επιτυγχάνεται μέσω υπερμεθυλίωσης (Li *et al*, 2001, Zhang *et al*, 2006), χρειάζονται ωστόσο περαιτέρω μελέτες για να διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός ρύθμισης, καθώς και ο ρόλος της KLK10 στον καρκίνο.

Ιδιαίτερη σημασία για την αξιολόγηση της προγνωστικής και διαγνωστικής σημασίας αλλά και του βιολογικού ρόλου των καλλικρεϊνών έχει και η μελέτη του σταδίου της καρκινικής εξέλιξης στο οποίο εκφράζονται. Έτσι, έχει παρατηρηθεί ότι κάποιες καλλικρεΐνες εκφράζονται λιγότερο σε όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ενώ η έκφρασή τους αυξάνει σε περισσότερους επιθετικούς όγκους (Petraiki *et al*, 2006).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι καλλικρεΐνες 5 και 7 εκφράζονται παράλληλα στα κύτταρα της επιδερμίδας (Komatsu *et al*, 2002, 2003). Η hK7 μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την hK5, η οποία έχει προταθεί και ως φυσιολογικός ενεργοποιητής της (Eckholm and Egelrud, 2000b, Brattsand *et al*, 2005). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφρασή των δύο καλλικρεϊνών στον καρκίνο των ωοθηκών είναι συντονισμένη (Dong *et al*, 2003). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση των δύο καλλικρεϊνών σε μία ομάδα 80 δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο του μαστού, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κοινό πρότυπο έκφρασης των δύο γονιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλλικρεΐνη 7 εκφράζεται σε δείγματα που εκφράζουν και την καλλικρεΐνη 5, με στατιστικά μεγάλη βεβαιότητα. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση και στο επίπεδο έκφρασης των δύο γονιδίων, αν και η συγκεκριμένη μελέτη ήταν κυρίως ποιοτική. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, με βάση τα οποία φαίνεται η hK5 να δρα άνωθεν (*upstream*) της hK7 και, πιθανώς, ως ενεργοποιητής της. Η συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με τις λοιπές ιστολογικές και παθολογικές παραμέτρους έδειξε, σε συμφωνία με την προηγούμενη ποσοτική μελέτη, ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων συσχετίζονται αρνητικά με την έκφραση της καλλικρεΐνης 7. Συγκεκριμένα, στην ποσοτική μελέτη βρέθηκε ότι οι όγκοι με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα KLK7. Η ποιοτική μελέτη έδειξε ότι οι όγκοι με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων είναι συνήθως αρνητικοί για KLK7, ενώ εκείνοι που έχουν αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων είναι συνήθως θετικοί για KLK7. Οι δύο αυτές μελέτες έρχονται σε πλήρη αντίθεση με την υπόθεση του ορμονικού μηχανισμού ρύθμισης για την καλλικρεΐνη 7 και επιβάλλουν την αναζήτηση εναλλακτικού μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασής της. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για την καλλικρεΐνη 5, καθώς φαίνεται ότι η υπο-ομάδα των όγκων που την εκφράζουν χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη έκφραση τόσο των οιστρογονικών υποδοχέων όσο και των υποδοχέων προγεστερόνης, σε σύγκριση με τους όγκους που είναι αρνητικοί για το mRNA της KLK7. Υπάρχει δηλαδή συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της KLK5 και την χαμηλή έκφραση των ορμονικών υποδοχέων. Η έλλειψη ορμονο-εξάρτησης θεωρείται δείκτης κακής πρόγνωσης για τις ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Κατά την ανάλυση επιβίωσης με ανάπτυξη μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης μίας μεταβλητής η θετική έκφραση τόσο της καλλικρεΐνης 5, όσο και της καλλικρεΐνης 7 παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με μικρότερη ολική, αλλά και ελευθέρα νόσου επιβίωση. Οι ασθενείς, δηλαδή, που εκφράζουν



οποιοδήποτε από τα δύο γονίδια, διατρέχουν σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου σε σχέση με εκείνες που δεν τα εκφράζουν. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier μίας μεταβλητής για την KLK5 οδήγησε στο ίδιο συμπέρασμα, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς που εκφράζουν το mRNA πλήρους μήκους της καλλικρεΐνης 5.

Η συνδυασμένη αξιολόγηση, ωστόσο, της έκφρασης των δύο γονιδίων, δεν προσφέρει κάποια επιπλέον κλινική, διαγνωστική ή προγνωστική πληροφορία, σε σχέση με τη μελέτη εκάστου εξ' αυτών, τουλάχιστον στα πλαίσια της παρούσης μελέτης.

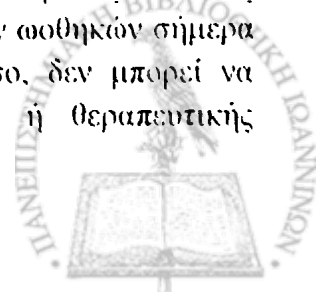
Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου, αν και αποτελεί τον τέταρτο συνηθέστερο τύπο γυναικολογικού καρκίνου, δεν έχει μελετηθεί ως προς την κλινική αξία της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων (Santin *et al*, 2004). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ομάδα 43 δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο του ενδομητρίου, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το γονίδιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον καρκίνο αυτόν. Παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου και την κατάσταση των λεμφαδένων των ασθενών. Συγκεκριμένα, Η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 είναι σημαντικά συχνότερη στους ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες. Πλην τούτου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 με άλλη κλινική ή ιστολογική-μορφολογική παράμετρο. Η ανάλυση επιβίωσης με ανάπτυξη μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας ή πολλών μεταβλητών, αλλά η ανάλυση κατά Kaplan-Meier, δεν κατέδειξε την ύπαρξη συσχέτισης της έκφρασης του mRNA της καλλικρεΐνης 7 με την ελευθέρα νόσου ή την ολική επιβίωση.

Φαίνεται λοιπόν ότι η KLK7 δεν παρουσιάζει κάποιο ενδιαφέρον για την κλινική αξιολόγηση του καρκίνου του ενδομητρίου, αν και η μοναδική υπάρχουσα μελέτη είχε δείξει αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε μερικές κυτταρικές σειρές. Το μέγεθος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν επαρκεί για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, δίνει εντούτοις κάποιες αρχικές ενδείξεις για την κλινική αξιολόγηση της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του ενδομητρίου. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία.

Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η γυναικολογική ογκολογία. Καθώς οι περισσότερες ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικές έως ότου ο όγκος πραγματοποιήσει μεταστάσεις, η νόσος ανιχνεύεται συνήθως σε προηγμένο στάδιο, με αποτέλεσμα ο καρκίνος των ωοθηκών να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη θνησιμότητα από όλους τους γυναικολογικούς καρκίνους (Holschneider and Berek, 2000). Ο μόνος κλινικός δείκτης με αξιολογή σημασία για τη διαχείριση του καρκίνου των ωοθηκών σήμερα είναι το καρκινο-εμβρυϊκό αντιγόνο, CA125, το οποίο, ωστόσο, δεν μπορεί να λειτουργήσει ως ξεκάθαρο κριτήριο διάγνωσης, πρόγνωσης ή θεραπευτικής



προσέγγισης (Meyer and Rustin, 2000, Chi *et al*, 2000). Είναι συνεπώς απαραίτητη η ανακάλυψη νέων καρκινικών δεικτών για τον καρκίνο των ωοθηκών.

Στην προσπάθεια ανεύρεσης νέων καρκινικών δεικτών που θα δίνουν πιο αξιόπιστη πληροφορία για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, έχουν εμπλακεί τα περισσότερα μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών. Συγκεκριμένα, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι (είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης είτε σε επίπεδο mRNA) οι KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10 και KLK15 συνδέονται με δυσοίωνη πρόγνωση για τις ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, ενώ οι KLK9, KLK11, KLK13 και KLK14 συνδέονται με ευνοϊκή πρόγνωση (Borgono *et al*, 2005).

Για την καλλικρεΐνη 7 έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου σε όγκους από καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς. Η αύξηση παρατηρήθηκε σε όλους τους υποτύπους (ορώδες, βλεννώδες, ενδομητριώδες, clear cell) και στάδια καρκινώματος (Tanimoto *et al*, 1999). Πρόσφατα, η έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 συσχετίστηκε με δυσοίωνη πρόγνωση για ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών (Kyriakopoulou *et al*, 2003, Dong *et al*, 2003, Yousef *et al*, 2003), ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφρασή της σε αυτόν τον καρκίνο είναι συντονισμένη με την έκφραση της hK5 (Dong *et al*, 2003).

Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας αξιολογήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ομάδα 25 δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο των ωοθηκών. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του mRNA της KLK7 με το στάδιο κακοήθειας του όγκου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η KLK7 εκφράζεται συχνότερα σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο (III) της νόσου.

Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 στον καρκίνο του παχέως εντέρου

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες για τον πιθανό ρόλο των καλλικρεϊνών γενικότερα και της καλλικρεΐνης 7 ειδικότερα στον καρκίνο, έχουν πραγματοποιηθεί σε καρκίνους που επηρεάζονται από τις στεροειδείς ορμόνες (καρκίνο ωοθηκών, μαστού, προστάτη, αλλά και τραχήλου της μήτρας) (Obiezu *et al*, 2005). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο σημαντικό ρόλο που παίζουν οι στεροειδείς ορμόνες του φύλλου στη ρύθμιση της μεταγραφής των καλλικρεϊνών.

Εσχάτως, όμως, αυξανόμενος αριθμός μελετών δείχνουν ότι πιθανώς η ορμονική ρύθμιση δεν αποτελεί το μοναδικό μηχανισμό που καθορίζει την μεταγραφή των γονιδίων της οικογένειας. Παράλληλα, έχει αρχίσει να διαφαίνεται ότι οι καλλικρεΐνες εμπλέκονται και σε ορμόνο-ανεξάρτητους τύπους καρκίνου. Στο πλαίσιο αυτό, αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της έκφρασης μελών της οικογένειας των καλλικρεϊνών σε τέτοιους τύπους κακοήθειας.

Προκειμένου να εντοπιστούν ποιοι τύποι καρκίνου παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη μελέτη της καλλικρεΐνης 7, μελετήθηκε η έκφραση του mRNA της τελευταίας σε μία σειρά ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών ποικίλης ιστολογικής προελεύσεως. Βρέθηκε ότι και οι τρεις κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέως εντέρου που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη (HT-29, HCT116 και HTB161), παρουσίαζαν σημαντική έκφραση της καλλικρεΐνης 7. Έτσι, τέθηκε το ερώτημα κατά πόσον η μελέτη της έκφρασης της καλλικρεΐνης 7 στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου παρουσιάζει κάποιο ιδιαίτερο διαγνωστικό ή προγνωστικό ενδιαφέρον.



Εξετάστηκε μία ομάδα 105 δειγμάτων από καρκίνο του παχέως εντέρου, για 54 από τα οποία ήταν επίσης διαθέσιμος ο αντίστοιχος φυσιολογικός γειτονικός εντερικός ιστός. Αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη της σημασίας της καλλικρεΐνης 7 στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντικά υψηλότερη έκφραση του εν λόγω γονιδίου στον καρκινικό σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, η συσχέτιση της έκφρασης με τις λοιπές ιστολογικές και παθολογικές παραμέτρους των όγκων έδειξε ότι η καλλικρεΐνη 7 στον καρκίνο του παχέως εντέρου εκφράζεται στους περισσότερο επιθετικούς και κακοήθεις όγκους. Συγκεκριμένα, υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 7 και το στάδιο του όγκου κατά TNM και κατά Duke, αλλά και με την ιστολογική διαβάθμιση. Η ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι οι ασθενείς με όγκους που εκφράζουν σε υψηλό βαθμό το γονίδιο KLK7 παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε τόσο με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας μεταβλητής, αλλά και με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox πολλών μεταβλητών όταν αυτό προσαρμόστηκε για την ηλικία των ασθενών και το μέγεθος του όγκου. Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι οι ασθενείς που εκφράζουν υψηλά επίπεδα του γονιδίου παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη ελευθέρα νόσου αλλά και ολική επιβίωση. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση της συμμετοχής της καλλικρεΐνης 7 στην αυξημένη επιθετικότητα και κακοήθεια του όγκου, αλλά και την πιθανή αξία της ως βιολογικού δείκτη κακής πρόγνωσης για ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου.

Πειράματα στο εργαστήριό μας έχουν δείξει ανάλογα αποτελέσματα και για την έκφραση της καλλικρεΐνης 6 στον καρκίνο του παχέως εντέρου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί με ποιοτική μέθοδο RT-PCR ότι η KLK6 εκφράζεται σημαντικά συχνότερα σε όγκους παχέως εντέρου σε σχέση με τους φυσιολογικούς γειτονικούς ιστούς. Επίσης, η έκφρασή της συσχετίζεται με περισσότερο κακοήθεις όγκους (σύμφωνα με το σύστημα TNM), αλλά και με σημαντικά συντομότερη ελευθέρα νόσου και ολική επιβίωση. Φαίνεται λοιπόν ότι και η καλλικρεΐνη 6 συσχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου. Στο πλαίσιο αυτό, προφανώς αποκτά ενδιαφέρον η μελέτη της έκφρασης και άλλων μελών της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών στον καρκίνο του παχέως εντέρου, προκειμένου να βρεθεί εάν πραγματοποιείται συνολική απορύθμιση της έκφρασης της οικογένειας και ποια είναι, στην περίπτωση αυτή, η κλινική της σημασία.

Έκφραση της καλλικρεΐνης 7 σε ενδοκρανιακούς καρκίνους

Ο καρκίνος του ΚΝΣ παρουσιάζει μία από τις υψηλότερες θνησιμότητες ανάμεσα σε όλους τους τύπους καρκίνου (Landis, 1998). Οι καλλικρεΐνες έχει βρεθεί να εμπλέκονται στην φυσιολογία του κεντρικού νευρικού συστήματος (Yousef *et al.*, 2003), αλλά και σε νευρο-εκφυλιστικές νόσους, όπως η νόσος του Parkinson (Diamandis *et al.*, 2000, Okui *et al.*, 2001), η νόσος Alzheimer (Shimizu-Okabe *et al.*, 2001), σκλήρυνση κατά πλάκας (Scarlsbrick *et al.*, 2002) ή φλεγμονές του ΚΝΣ (Blaber *et al.*, 2004). Η καλλικρεΐνη 7 έχει βρεθεί να εκφράζεται στον εγκέφαλο, τη σπονδυλική στήλη και την παρεγκεφαλίδα (Yousef *et al.*, 2000). Στην τελευταία, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση της έκφρασής της σε ασθενείς με frontotemporal άνοια (Diamandis *et al.*, 2004). Δεν έχει ωστόσο μελετηθεί η πιθανή σημασία των

καλλικρεϊνών στην κλινική εικόνα, τη διάγνωση και την πρόγνωση των κακοηθειών του ΚΝΣ.

Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας, μελετήθηκε με ποιοτική μέθοδο RT-PCR η έκφραση της καλλικρεϊνης 7 σε 73 ενδοκρανιακούς όγκους διαφόρων ιστολογικών τύπων. Αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη της σημασίας της καλλικρεϊνης 7 στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας των ιστολογικών τύπων κακοήθειας των ενδοκρανιακών όγκων, οι τελευταίοι διαχωρίστηκαν σε ομάδες χαμηλής ή υψηλής κακοήθειας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί μία περισσότερο αξιόπιστη στατιστική ανάλυση.

Οι δύο ομάδες κακοήθειας επέδειξαν παρόμοια ποσοστά έκφρασης της καλλικρεϊνης 7 (~44%). Η στατιστική συσχέτιση της έκφρασης του mRNA της καλλικρεϊνης 7 με τις λοιπές διαθέσιμες ιστολογικές και παθολογικές παραμέτρους του πληθυσμού μελέτης (βαθμός και επίπεδο κακοήθειας, ιστολογικός τύπος, ηλικία) δεν επέδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση, παρά μόνο με την ηλικία. Συγκεκριμένα, αυξανόμενη της ηλικίας του ασθενούς, αύξανε και η πιθανότητα έκφρασης της καλλικρεϊνης 7 στο αντίστοιχο καρκινικό δείγμα. Στην ανάλυση επιβίωσης (ελευθέρας νόσου και ολικής), με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας μεταβλητής, η υψηλή έκφραση της KLK7 παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με μικρότερη ολική επιβίωση. Οι ασθενείς δηλαδή με όγκους στους οποίους εκφράζεται η καλλικρεϊνη 7 διατρέχουν σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου από τους ασθενείς με όγκους στους οποίους δεν εκφράζεται η καλλικρεϊνη 7. Αντίθετα, η ανάλυση πολλών μεταβλητών, όταν αυτή προσαρμόστηκε για την ηλικία των ασθενών και το βαθμό διαφοροποιήσεως των όγκων, δεν αποκάλυψε κάποια σημαντική συσχέτιση με την ελευθέρα νόσου ή την ολική επιβίωση. Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier μίας μεταβλητής επιβεβαίωσε την σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς με όγκους που εκφράζουν το mRNA της καλλικρεϊνης 7 σε σχέση με εκείνους που παρουσιάζουν αρνητική έκφραση, ως προς την ολική επιβίωση. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η έκφραση της καλλικρεϊνης 7 μπορεί να αποτελέσει ένδειξη κακής πρόγνωσης και για τους ασθενείς με ενδοκρανιακούς όγκους.

Παράλληλη μελέτη της έκφρασης δύο άλλων μελών της οικογένειας των καλλικρεϊνών που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του ΚΝΣ, και συγκεκριμένα των KLK6 και KLK8, στον ίδιο πληθυσμό μελέτης, απέδωσε ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Η καλλικρεϊνη 6, σε φυσιολογικές συνθήκες, εκφράζεται υψηλά σε αρκετά όργανα του ΚΝΣ, όπως την σπονδυλική στήλη, τον ιππόκαμπο και τα βασικά γάγγλια (Scarlsbrick *et al*, 2001). Η έκφρασή της αυξάνει στα εγκεφαλικά κύτταρα ασθενών με νόσο Alzheimer (Anisowicz *et al*, 1996; Yamashiro *et al*, 1997), αλλά και στα ολιγοδενδροκύτταρα μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης (Terayama *et al*, 2004). Η καλλικρεϊνη 8 θεωρείται απαραίτητη σε πολλές νευρικές δραστηριότητες, και κλωνοποιήθηκε αρχικά από τον ιππόκαμπο (Yoshida *et al*, 1998). Εκφράζεται ισχυρά σε πολλές περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου, όπως η παρεγκεφαλίδα, ο εγκεφαλικός φλοιός, η αμυγδαλή, ο ιππόκαμπος και ο πρόσθιος λοβός, και πιθανώς παίζει ρόλο στην εγκεφαλική ανάπτυξη (Yousef *et al*, 2003). Έχει βρεθεί ότι η έκφρασή της αυξάνεται σημαντικά στον ιππόκαμπο ασθενών με νόσο Alzheimer (Shimizu-Okabe *et al*, 2001).



Η καλλικρεΐνη 6 βρέθηκε ότι εκφράζεται σημαντικά συχνότερα σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας. Επίσης, στην ανάλυση επιβίωσης (ελευθέρως νόσου και ολικής), με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox μίας μεταβλητής, η έκφραση της KLK6 συσχετίστηκε σημαντικά με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής των ασθενών. Τέλος, η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier φανέρωσε ότι οι ασθενείς με θετική έκφραση του mRNA της καλλικρεΐνης 6 παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερο διάστημα επιβίωσης χωρίς υποτροπή. Η μελέτη της καλλικρεΐνης 8 στους ενδοκρανιακούς όγκους έδειξε ότι η έκφραση του mRNA της συσχετίζεται ισχυρά με ορισμένους ιστολογικούς τύπους, όπως μηνιγγιώματα, γλιωβλαστώματα, μυελοβλαστώματα και αστροκυττώματα, αλλά δεν προσφέρει αξιόλογη προγνωστική πληροφορία για το σύνολο των ασθενών. Είναι, επομένως, πιθανό η KLK8 να παίζει κάποιο ρόλο σε ορισμένους ιστολογικούς τύπους ενδοκρανιακών όγκων, για τους οποίους μπορεί να έχει χρησιμότητα ως βιολογικού δείκτη. Η υπόθεση αυτή, ωστόσο, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7 με ανοσοϊστοχημεία

Μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση και ο εντοπισμός της καλλικρεΐνης 7 σε διάφορους τύπους καρκίνου (μαστού, ωθηκών, ενδομητρίου, εντέρου). Παρατηρήθηκε σχεδόν αποκλειστικά κυτταροπλασματική, επιθηλιακή έκφραση της πρωτεΐνης σε όλους τους προαναφερθέντες ιστούς. Αυτό το πρότυπο έκφρασης έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεΐνών, τόσο σε φυσιολογικούς (Petraiki *et al*, 2002, Petraiki *et al*, 2001), όσο και σε καρκινικούς (Petraiki *et al*, 2003, Petraiki *et al*, 2006) ιστούς. Όλες οι καλλικρεΐνες εκφράζονται ανοσοϊστοχημικά σε ένα μεγάλο εύρος ιστών, δείχνοντας ότι κανένα μέλος, πλην της hK2 και της hK3, δεν έχει ιστο-ειδική έκφραση. Η κυτταροπλασματική έκφραση των καλλικρεΐνών, κυρίως σε αδενώδη επιθήλια και τις εκκρίσεις τους συνιστά ότι τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται από τα κύτταρα. Οι περισσότερες καλλικρεΐνες εκφράζονται σε αδενοκαρκινώματα, όπως και σε όγκους προερχόμενους από ιστούς που τις εκφράζουν. Η ταυτόχρονη έκφραση πολλών μελών σε φυσιολογικούς ή καρκινικούς ιστούς συνιστά κοινό μηχανισμό ρύθμισης ή/και συντονισμένη δράση των πρωτεολυτικών αυτών ενζύμων.

Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες όμως δεν δείχνουν πάντα αύξηση της έκφρασης των καλλικρεΐνών στον καρκίνο. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί μείωση της συχνότητας έκφρασης των καλλικρεΐνών 5, 6, 10 και 11 σε καρκίνους του νεφρού (Renal Cell Carcinoma, RCC) σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό ιστό (Petraiki *et al*, 2006), δείχνοντας ότι μπορεί να έχουν αξία καρκινικού δείκτη ευνοϊκής πρόγνωσης για τον ασθενή.

8.2. Ρόλος των καλλικρεΐνών στην καρκινική ανάπτυξη

Ο αριθμός των ανθρώπινων πρωτεϊνών σερίνης στις οποίες δεν έχει αποδοθεί ακόμη συγκεκριμένη φυσιολογική λειτουργία είναι πολύ μεγάλος. Το ίδιο ισχύει και για τα 15 μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών. Αντίθετα, έχει ιδιαίτερα μελετηθεί η εμπλοκή τους στον καρκίνο. Έχει δε ιδιαίτερα μελετηθεί η

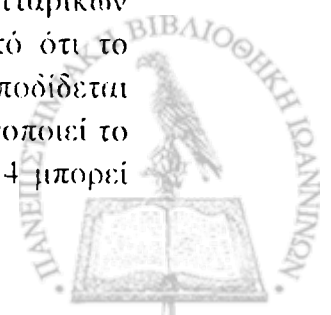
απορύθμιση της έκφρασής τους σε διάφορους τύπους καρκίνου. Οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων επάγεται η διαφορική έκφραση των καλλικρεϊνών, αλλά και ο ρόλος τους στην καρκινική ανάπτυξη δεν έχει ακόμη διαφωτιστεί πλήρως.

Καθώς τα περισσότερα μέλη της γονιδιακής οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση σε πολλούς τύπους καρκίνου σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, ενισχύεται η υπόθεση ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινική ανάπτυξη. Φαίνεται ότι η πιο σημαντική δράση τους εντοπίζεται σε ενζυμικά μονοπάτια που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτεολυτικής, και κατά συνέπεια, της διηθητικής και μεταστατικής ικανότητας των όγκων. Έχει επίσης προταθεί ότι εμπλέκονται και σε άλλες διεργασίες, όπως η συμμετοχή στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η αγγειογένεση και οι οστεοβλαστικές μεταστάσεις.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν οι συνέπειες της μεμονωμένης ή συντονισμένης έκφρασης της καλλικρεϊνης 7 και άλλων μελών της οικογένειας στην καρκινική συμπεριφορά ανθρώπινων καρκινικών σειρών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και την ικανότητα διήθησης *in vitro*, αλλά και η καρκινική ανάπτυξη *in vivo*. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού δεν επηρεάστηκε από καμία καλλικρεϊνή και σε καμία κυτταρική σειρά. Η σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών των ιστικών καλλικρεϊνών που υπερεκφράστηκαν μεμονωμένα ή συγχρονισμένα σε καρκινικά κύτταρα μαστού, ωοθηκών και εγκεφάλου οδήγησε σε αύξηση της δυνατότητας διήθησης του εξωκυττάριου στρώματος *in vitro*, εκτός από την καλλικρεϊνή 8 στην καρκινική σειρά εγκεφάλου U-251-MG.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν για πρώτη φορά οι *in vivo* επιδράσεις της έκφρασης μελών της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών σε καρκινικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της καλλικρεϊνης 7 προκάλεσε πολύ μικρή και στατιστικά μη σημαντική αύξηση της καρκινικής μάζας στην περιτοναϊκή κοιλότητα των πειραματοζώων. Αντίθετα, όταν συνοδεύτηκε από υπερέκφραση και άλλων πρωτεϊνών-μελών της οικογένειας των ιστικών καλλικρεϊνών (hK5 ή hK4+hK5+hK6), η αύξηση της καρκινικής ανάπτυξης ήταν σημαντικά μεγαλύτερη. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη της συνεργιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ διαφόρων ιστικών καλλικρεϊνών στον καρκίνο και τη φλεγμονή (Bhoola *et al.*, 2001, Yousef and Diamandis, 2002). Παράλληλα, το γεγονός ότι δεν επηρεάστηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων *in vitro*, αλλά αυξήθηκε η καρκινική ανάπτυξη *in vivo*, αποτελεί ένδειξη ότι η δραστηριότητα των ιστικών καλλικρεϊνών πιθανώς ρυθμίζεται από σήματα από το μικροπεριβάλλον του ξενιστή.

Η υπόθεση της αλληλεπίδρασης των καλλικρεϊνών σε ενζυμικά μονοπάτια ξεκίνησε από μελέτες της πρωτεολυτικής ενεργότητας στο ανθρώπινο δέρμα. Βρέθηκε ότι στο υγιές δέρμα λαμβάνει χώρα ένα μονοπάτι ενεργοποίησης των καλλικρεϊνών 5, 7 και 14 (Simon *et al.*, 2001, Ekholm *et al.*, 2000b; Caubet *et al.*, 2004) το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία της αποδόμησης των διακυτταρικών δεσμών και της απολέπισης των κερατινοκυττάρων. Είναι χαρακτηριστικό ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεολυτικής ενεργότητας στην κεράτινη στιβάδα αποδίδεται στην καλλικρεϊνή 7. Έχει επίσης βρεθεί ότι η καλλικρεϊνή 5 μπορεί να ενεργοποιεί το προένζυμο των καλλοκρεϊνών 7 και 14, αλλά και το δικό της, ενώ η hK14 μπορεί



επίσης να ενεργοποιεί την προ-hK5. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αυξημένη συγκέντρωση ενεργής hK7 στα επιφανειακά στρώματα της κεράτινης στιβάδας, η οποία συνοδεύεται από αύξηση του ρυθμού αποδόμησης των διακυτταρικών συνεκτικών δομών καθώς τα κερατινοκύτταρα κινούνται προς την επιφάνεια του δέρματος (Brattsand *et al*, 2005). Πρόσφατες μελέτες παρέχουν ενδείξεις για τη λειτουργία αντίστοιχου μονοπατιού και στη διαδικασία υγροποίησης του σπερματικού θρόμβου (seminal clot), με τη συμμετοχή των καλλικρεϊνών 2, 3 και 5 (Michael *et al*, 2006). Συγκεκριμένα, η καλλικρεϊνή 5 μπορεί αρχικά να ενεργοποιεί την προ-hK2 και την προ-hK3 και, εν συνεχεία, τα κόβει και να απενεργοποιεί τις ενεργές hK2 και hK3, μπορεί επίσης να αποικοδομεί τις σεμινογελίνες I και II, οι οποίες αποτελούν τα βασικά συστατικά του σπερματικού θρόμβου.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεολυτικών ενζύμων είναι σύνηθες φαινόμενο, καθώς συχνά ως υπόστρωμα ενός ενζύμου χρησιμοποιείται ένα ανενεργό προένζυμο (ζυμογόνο) που κόβεται και κατά συνέπεια ενεργοποιείται από τη δράση του πρώτου. Το ενεργοποιημένο ένζυμο μπορεί εν συνεχεία να ενεργοποιήσει κάποιο άλλο ζυμογόνο, κ.ο.κ. (Schultz and Liebman, 1997). Τέτοια ενζυμικά μονοπάτια με τη συμμετοχή πρωτεολυτικών ενζύμων έχουν μελετηθεί και τεκμηριωθεί στην λειτουργία της κυτταρικής απόπτωσης, του συμπληρώματος, της πήξης του αίματος και της φιμπρινόλυσης. Σε έναν ενζυμικό καταρράκτη, όπου η ενεργοποιημένη μορφή ενός ενζύμου καταλύει την ενεργοποίηση ενός άλλου, πολύ μικρές ποσότητες των αρχικών ενζύμων επαρκούν για την πυροδότηση του καταρράκτη, λόγω της ενζυμικής φύσης του φαινομένου. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των ενδιάμεσων αντιδράσεων είναι μία σημαντική ενίσχυση, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο ταχεία και ενισχυμένη απόκριση του κυττάρου στο αρχικό ερέθισμα (Silverthorn, 1995).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν *in vitro* και *in vivo* τα αποτελέσματα της ταυτόχρονης υπερέκφρασης δύο (hK5 και hK7) ή τεσσάρων (hK4, hK5, hK6 και hK7) μελών της οικογένειας των ιστικών καλλικρεϊνών. Είναι προφανές, ότι λόγω του σχεδιασμού της μελέτης, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα οι παρατηρούμενες επιδράσεις να οφείλονται σε κάποιο ή κάποια από τα ένζυμα που υπερεκφράστηκαν και όχι σε όλα. Έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα γαστρικών καρκίνων ότι η μείωση της έκφρασης μόνο της καλλικρεϊνής 6 με μικρό ανασταλτικό RNA (siRNA) είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διήθηση *in vitro* (Nagahara *et al*, 2005).

Στο μέλλον θα είναι χρήσιμο να σχεδιαστούν πιο αναλυτικά πειράματα, με κύτταρα που θα εκφράζουν μεμονωμένα όλες τις ιστικές καλλικρεϊνες, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του κάθε μέλους της οικογένειας, αλλά και διαφόρων συνδυασμών τους. Με τον τρόπο αυτό, θα είναι δυνατόν να φωτιστεί η συνεισφορά της κάθε ανθρώπινης ιστικής καλλικρεϊνής στο προτεινόμενο ενζυμικό μονοπάτι που σχετίζεται με την καρκινική ανάπτυξη.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι καλλικρεϊνες αυξάνουν την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων δεν έχει διαφωτιστεί ακόμη. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση της KLK 3 και της KLK4, αλλά όχι της KLK2, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PC-3 αλλάζει την κυτταρική μορφολογία από επιθηλιακή σε spindle-shaped, μειώνει σημαντικά την έκφραση της καντερίνης E, ενώ αυξάνει την έκφραση της βιμεντίνης και την κυτταρική μετανάστευση (Whitbread *et al*, 2006). Οι αλλαγές αυτές είναι

ενδεικτικές της μετάβασης από επιθηλιακή σε μεσεγγυματική κατάσταση (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Η μετάβαση αυτή αποτελεί μία διεργασία με σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και στην καρκινική εξέλιξη.

Η προτεινόμενη συμμετοχή των καλλικρεϊνών, αλλά και των πρωτεολυτικών ενζύμων γενικότερα, σε ενζυμικά μονοπάτια, έχει και μία άλλη συνέπεια. Προκειμένου να επιτευχθεί η καρκινική ανάπτυξη, απαιτείται η δράση πολλών πρωτεολυτικών ενζύμων. Συνεπώς, έχει πλέον διαφανεί ότι μεμονωμένοι καρκινικοί δείκτες δέν επαρκούν για ικανοποιητική διάγνωση του καρκίνου και πρόγνωση της εξέλιξης των ασθενών. Μελέτες του πρωτεωμικού προφίλ και εργαλεία βιοπληροφορικής οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός περισσότερων δεικτών για κάθε τύπο καρκίνου μπορεί να αυξήσει την ειδικότητα και την ευαισθησία διάγνωσης της νόσου (Rai *et al*, 2002)

8.3. Μελέτη του υποκινητή του γονιδίου KLK7

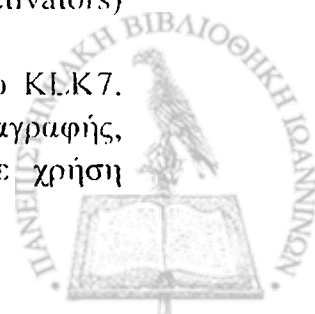
Η έκφραση όλων των γονιδίων ακολουθεί ένα ιστο- και κυτταροειδικό πρότυπο, που καθορίζει τη λειτουργία και μορφολογία των κυττάρων. Επιπλέον, όλα τα γεγονότα ανάπτυξης και διαφοροποίησης χαρακτηρίζονται από ένα μεταβλητό σχέδιο γονιδιακής έκφρασης. Συνεπώς, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία κάθε οργανισμού. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται σε πολλά επίπεδα, πρώτο εκ των οποίων είναι το επίπεδο της μεταγραφής.

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο της μεταγραφής είναι η πρόσδεση πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Η πρωτεΐνη αναγνωρίζει μία αλληλουχία που ονομάζεται στοιχείο δέσμευσης του DNA (DNA binding element). Οι αλληλουχίες αυτές μπορεί να βρίσκονται πλησίον του σημείου εκκίνησης της μεταγραφής, αρκετά απομακρυσμένα από αυτό, ή και εντός της μεταγραφόμενης περιοχής.

Εάν η ρυθμιστική αλληλουχία εντοπίζεται μακριά από το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής και η δράση τους είναι ανεξάρτητη από τον προσανατολισμό τους, ονομάζονται ενισχυτές (enhancers). Επιπλέον, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς συναντώνται και σύνθετες περιοχές ελέγχου (composite control regions), οι οποίες περιέχουν διάφορες αλληλουχίες πρόσδεσης πρωτεϊνών. Στις περιπτώσεις αυτές, απαιτείται συνεργασία αρκετών μεταγραφικών παραγόντων για την έναρξη της μεταγραφής. Παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού εμφανίζεται σε γονίδια που ελέγχονται από πυρηνικούς υποδοχείς.

Η αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας προϋποθέτει την ύπαρξη και άλλων ρυθμιστικών αλληλουχιών. Συχνά, η μεταγραφική ρύθμιση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από την συντονισμένη δράση αρκετών μεταγραφικών παραγόντων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να είναι ενεργοποιητές (activators) ή αναστολείς (repressors).

Πραγματοποιήθηκε εισαγωγική μελέτη του υποκινητή του γονιδίου KLK7. Με εφαρμογή της μεθόδου 5'RACE ανιχνεύθηκε το σημείο έναρξης της μεταγραφής, 37bp άνωθεν του πρώτου εξονίου του γονιδίου. Εν συνέχεια, και με χρήση



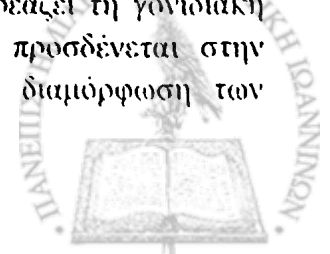
υπολογιστικών προγραμμάτων, αναζητήθηκαν και εντοπίστηκαν εν δυνάμει αλληλουχίες μεταγραφικού ελέγχου του γονιδίου. Εντοπίστηκε η περιοχή TATA, στη θέση -28bp. Ανιχνεύθηκαν επίσης στην περιοχή του εγγύς υποκινητή (200bp άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής) αλληλουχίες πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων SP1 (-195bp και -41bp), GATA (-121bp), AP2 (-68bp) και AP4 (+25bp). Ανιχνεύθηκε, επίσης μία αλληλουχία που αναγνωρίστηκε ως πιθανή αλληλουχία πρόσδεσης του οιστρογονικού υποδοχέα (Estrogen Response Element ERE), η οποία παρουσιάζει 83% ομολογία προς την τυπική (consensus) ERE αλληλουχία. Η θέση της είναι αρκετά πριν από το σημείο έναρξης μεταγραφής του γονιδίου της KLK7 (-3150bp) και, εφόσον αποτελεί λειτουργικό στοιχείο ρύθμισης της έκφρασης, εντάσσεται στην περιοχή του ενισχυτή (enhancer) του γονιδίου.

Η αλληλουχία TATA (TATA box) είναι μία αλληλουχία που καθορίζει τον ελάχιστο (minimal) υποκινητή από τον οποίο μπορεί να εκκινηθεί *in vitro* η μεταγραφή. Η κλασική αλληλουχία TATA βρίσκεται συνήθως 25-35bp πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Η πρωτεΐνη που προσδένεται στην αλληλουχία TATA (TATA box Binding Protein, TBP) και οι σχετιζόμενοι με αυτήν παράγοντες (TBP Associated Factors, TAFs) συμμετέχουν στα πρώτα στάδια έναρξης της μεταγραφής.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 είναι μία πρωτεΐνη πλούσια σε γλουταμίνη που δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής. Προσδένεται σε αλληλουχίες του υποκινητή που είναι πλούσιες σε GC.

Η ενεργοποιητική πρωτεΐνη 2 (Activating protein 2, AP-2) είναι ένας ιστοειδικός μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στο DNA και έχει μεγάλη σημασία για την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε όλα τα σπονδυλόζωα, αλλά και για την κακοήγη ανάπτυξη σε αρκετούς τύπους καρκίνου (Mitchel *et al*, 1991), πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων. Φαίνεται όμως πως η δράση του είναι αρκετά πολύπλοκη, καθώς σε άλλες περιπτώσεις του έχει αποδοθεί ογκο-κατασταλτική δράση (Karjalainen *et al*, 1998, Korpponen *et al*, 2001). Στον καρκίνο του μαστού, αλλά και σε άλλους καρκίνους, όπως ωοθηκών, τραχήλου της μήτρας, προστάτη, η μειωμένη έκφραση του AP-2 *in vivo* έχει συνδεθεί με την εξέλιξη της νόσου (Gee *et al*, 1999, Anttila *et al*, 2000, Hietala *et al*, 1997, Lipponen *et al*, 2000). Επιπλέον, φαίνεται ότι ο AP-2 εμπλέκεται στην ρύθμιση γονιδίων που παίζουν κρίσιμο ρόλο στον καρκίνο του μαστού, όπως το γονίδιο του υποδοχέα οιστρογόνων (estrogen receptor, ER) (McPherson and Weigel, 1999) και του HER-2/neu (Boscher *et al*, 1996). Η δράση του στην μεταγραφή των γονιδίων μπορεί να είναι κατά περίπτωση ενεργοποιητική ή κατασταλτική (Zeng *et al*, 1997, Huang *et al*, 1998, Gaubatz *et al*, 1995) και επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης σε μία πλούσια σε GC αλληλουχία DNA (Williams *et al*, 1991).

Ο AP-4 είναι ένας πολύ συχνά εκφραζόμενος μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να αλληλεπιδρά με μεγάλο εύρος άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Hu *et al*, 1990). Προσδένεται σε αλληλουχίες τόσο υποκινητών όσο και ενισχυτών και συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών γονιδίων (Mermod *et al*, 1988, Comb *et al*, 1988, Unk *et al*, 1994). Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου επηρεάζει τη γονιδιακή ρύθμιση δεν έχει διαλευκανθεί. Πιθανολογείται ότι ο AP-4 προσδένεται στην αλληλουχία-στόχο, ακόμη και όταν το DNA βρίσκεται στη διαμόρφωση των



νουκλεοσωμάτων, διευκολύνοντας έτσι την πρόσδεση και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Friez *et al*, 1999).

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA παίζει βασικό ρόλο σε ένα ευρύ πεδίο αναπτυξιακών λειτουργιών. Μέλη της είναι απαραίτητα για την φυσιολογική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων και των μεγακαρυοκυττάρων (Cantor, 2005) και την φυσιολογική διαδικασία της αιμοποίησης, αλλά εκφράζονται και σε πολλούς ιστούς μεσοδερμικής και ενδοδερμικής προέλευσης (Pikkarainen *et al*, 2004). Έχουν διπλή δυνατότητα, πρόσδεσης στο DNA και trans-ενεργοποίησης άλλων παραγόντων (Martin and Orkin, 1990).

Σε όλη την οικογένεια των καλλικρεϊνών περισσότερο έχει μελετηθεί η ρύθμιση των γονιδίων KLK6 και KLK10. Στην ρυθμιστική περιοχή άνωθεν του γονιδίου KLK3 έχουν ανιχνευθεί 3 λειτουργικά στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα (Androgen Response Elements, AREs), στις θέσεις -170, -400 και -4316 bp (Cleutjens *et al*, 1996, Schuur *et al*, 1996). Αντίστοιχα στοιχεία έχουν βρεθεί και σε άλλα 2 μέλη της οικογένειας που ρυθμίζονται από τα ανδρογόνα τις KLK2 και KLK4 (Yu *et al*, 1999, Obiezu *et al*, 2002). Ως προς τη ρύθμιση του γονιδίου της KLK10, οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι οιστρογόνα, ανδρογόνα και προγεστίνες αυξάνουν την έκφραση του, υπονοώντας την λειτουργία ορμονικής ρύθμισης. Ωστόσο, η μελέτη του υποκινητή του γονιδίου έδειξε ότι ο τελευταίος δεν υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο (Luo *et al*, 2003). Μία άλλη ανάλυση του υποκινητή της καλλικρεϊνης 10 κατέδειξε την παρουσία ενός λειτουργικού στοιχείου απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid Response Elements, RAREs), συνιστώντας ότι μπορεί να υπάρχει και άλλος τρόπος ρύθμισης της έκφρασης πλην του ορμονικού (Zeng *et al*, 2006), ενώ προτείνεται και ο μηχανισμός ρύθμισης μέσω μεθυλίωσης.

Διάφορες ερμηνείες έχουν προταθεί για την ανεξάρτητη από ορμόνες ρύθμιση γονιδίων της οικογένειας των ανθρώπινων καλλικρεϊνών των οποίων οι υποκινητές φέρουν HREs (Hormone Response Elements), ή, ανάποδα, την ρύθμιση από ορμόνες σε υποκινητές που δεν φέρουν HREs, αλλά και για την συντονισμένη γονιδιακή έκφραση πολλών μελών της οικογένειας. Η περισσότερο διαδεδομένη είναι αυτή που υποθέτει έναν μηχανισμό ρύθμισης των καλλικρεϊνών σε κατά ομάδες από μία ή περισσότερες περιοχές μεταγραφικού ελέγχου που εδράζονται στην χρωμοσωμική περιοχή 19q13.4 (Paliouras and Diamandis, 2006).

Ένας άλλος παράγοντας που εμπλέκεται στην ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής είναι η μεθυλίωση του DNA στο άτομο C5 καταλοίπων κυτιδίνης που εντοπίζονται σε αλληλουχίες CpG. Η μεθυλίωση εμπλέκεται στην καταστολή της μεταγραφής. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα μέλους της οικογένειας των καλλικρεϊνών που ρυθμίζεται με αυτόν το μηχανισμό αφορά στην KLK10, η οποία καταρρυθμίζεται στον καρκίνο του μαστού και τη λεμφοβλαστική λευχαιμία ως αοτέλεσμα μεθυλίωσης νησίδων CpG στο εξόνιο 3 του γονιδίου (Li *et al*, 2001, Sidiropoulos *et al*, 2005), ενώ υπάρχουν ενδείξεις για αντίστοιχο μηχανισμό ρύθμισης και για την KLK6 στον καρκίνο του μαστού (Paliouras and Diamandis, 2006)

Η μεταγραφή των γονιδίων όμως δεν αποτελεί το μοναδικό επίπεδο όπου ρυθμίζεται η έκφραση των πρωτεϊνών. Η ωρίμανση του μηνύματος RNA, όπως και η ρύθμιση της ενεργοποίησης του ενζύμου συμμετέχουν επίσης σε αυτήν τη διαδικασία. Η οικογένεια των καλλικρεϊνών χαρακτηρίζεται από μεγάλο πλήθος προϊόντων εναλλακτικής μεταγραφής, ματίσματος, πολυαδενυλίωσης της τριπλέτας



έναρξης της μετάφρασης AUG ή εσονίου (intron retention) για κάθε γονίδιο-μέλος της. Η μεγάλη πλειονότητα αυτών των μορίων δεν έχει μελετηθεί *in vivo*. Συνεπώς, δεν είναι γνωστό εάν τα εναλλακτικά μηνύματα RNA μεταφράζονται σε πρωτεΐνη (χωρίς ενεργότητα σερινικής πρωτεάσης όμως), εάν συμβάλλουν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων ή εάν αποτελούν απλώς «παραπροϊόντα» του μεταγραφικού μηχανισμού των κυττάρων (Kurlender *et al*, 2005, Tan *et al*, 2006, Michael *et al*, 2005).

8.4. Μελλοντικές προοπτικές στην μελέτη και κλινική αξιοποίηση των καλλικρεϊνών

Η μελέτη της γονιδιακής οικογένειας των καλλικρεϊνών έχει προσφέρει πολλές γνώσεις τα τελευταία χρόνια. Η διαφοροποιημένη τους έκφραση σε πολλούς τύπους καρκίνου μπορεί να οδηγήσει στην καθιέρωση νέων καρκινικών δεικτών με διαγνωστική ή προγνωστική αξία. Καθώς αυξάνεται η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης των γονιδίων και ανακαλύπτονται τα φυσιολογικά τους υποστρώματα, θα αναπτυχθούν στο άμεσο μέλλον νέα μοντέλα για την μελέτη και κατανόηση των φυσιολογικών ρόλων των ενζύμων αυτών. Επίσης, έχει αρχίσει να φωτίζεται ο ρόλος των καλλικρεϊνών στην βιολογία του καρκίνου, κυρίως σε σχέση με την διήθηση και την αγγειογένεση (επισκόπηση από Borgono and Diamandis, 2004). Μία άλλη πλευρά της μελέτης των καλλικρεϊνών φωτίζει την πιθανή σημασία τους στην ανάπτυξη νέων θεραπειών του καρκίνου. Ο μηχανισμός δράσης τους στην απολέπιση του δέρματος και την υγροποίηση του σπέρματος ακόμη δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Στο μέλλον θα δοθεί επίσης ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη της ικανότητας διαφόρων αναστολέων πρωτεασών σερίνης (σερπινών) να εμποδίζουν τη δράση των καλλικρεϊνών, αλλά και στην ανακάλυψη νέων ειδικών αναστολέων.

Η ιστοειδικότητα ορισμένων καλλικρεϊνών μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί για θεραπευτικές εφαρμογές. Για παράδειγμα, μελετάται σε προκλινικό επίπεδο η δυνατότητα μεταφοράς τοξικών γονιδίων που έχουν ενσωματωθεί σε αδενοϊικούς ή λιποσωμικούς φορείς και βρίσκονται υπό τη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου KLK3, προκειμένου να προκληθεί ο θάνατος καρκινικών κυττάρων προστάτη *in vitro* (Latham *et al*, 2000, Suzuki *et al*, 2001, Yoshimura *et al*, 2001).

Η μελέτη των υπολοίπων καλλικρεϊνών υπολείπεται βέβαια σε σχέση με τη KLK3. Για το λόγο αυτό θα καθυστερήσει και η αξιοποίησή τους στον τομέα της θεραπευτικής. Όμως, η πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών και η ανάπτυξη νέων βιοχημικών τεχνικών, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης και της βιολογικής δράσης τους, θα επιταχύνει την επίτευξη αυτού του στόχου. Οι προβλεπόμενες εφαρμογές θα είναι χρήσιμες όχι μόνο για την θεραπεία του καρκίνου, αλλά και άλλων μη καρκινικών διαταραχών.

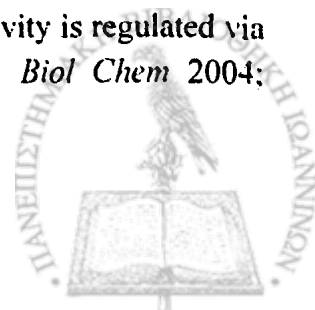


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

*B*ΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



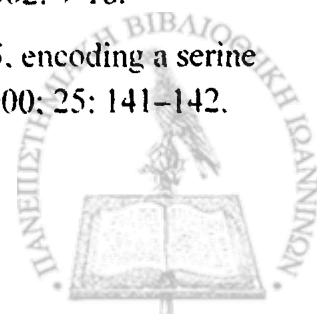
- Adam, B.L., Qu, Y., Davis, J.W., *et al.* Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609–3614.
- Allgayer, H., Heiss, M.M., and Schildberg, F.W. (eds.) *Molecular Staging of Cancer*. Springer, 2003.
- American Cancer Society. *Cancer facts and figures, 2006*. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
- American Cancer Society. *Breast Cancer facts and figures 2005-2006*. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2006. Boudreau, N. and Bissel, M. Regulation of gene expression by the extracellular matrix. (1996) In: Comper, W.E. (ed.), *Extracellular Matrix. Volume 2. Molecular Components and Interactions*, 246-261 Harwood Academic Publishers: Amsterdam.
- Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., *et al.* The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1–22.
- Angata, T., and Varki A. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of Silgec09, a new member of the CD33-related group of Silgecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 22127-22135.
- Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Stenman, G., *et al.* A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol Med* 1996; 2: 624-636.
- Anttila, M.A., Kellokoski, J.K., Moisio, *et al.* Expression of transcription factor AP-2 α predicts survival in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000; 82:1974–1983.
- Asakai, R., Davie, E.W., and Chung D.W. 1987 Organization of the gene for human Factor XI. *Biochemistry* 26:7221-7228.
- Attisano, L., and Wrana, J.L. Signal transduction by the TGF superfamily. *Science* 2002; 296:1646-1647.
- Babior, B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109:33–44.
- Bar-Sagi, D., and Hall, A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 2000; 103:227-238.
- Barrett, A. D., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (eds) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 1556–1558 (Elsevier Academic, London, 2004).
- Bayes, A. Tsetsenis, T., Ventura, S., *et al.* Human kallikrein 6 activity is regulated via an autoproteolytic mechanism of activation/inactivation. *Biol Chem* 2004; 385: 517–524.



- Bercham, G., Glondou, M., Gleizes, M., *et al.* Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps *in vivo*: Proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 5951–5955.
- Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K.M., *et al.* 1999. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284:808–812.
- Bennett, M. J., Blaber, S.I., Scarisbrick, I.A., *et al.* Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsinlike kallikrein is expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 2002; 277:24562–24570.
- Bervar, A., Zajc, I., Sever, *et al.* Invasiveness of transformed human breast epithelial cell lines is related to cathepsin B and inhibited by cysteine proteinase inhibitors. *Biol Chem* 2003; 384: 447–455.
- Bharaj, B.B., Luo, L.Y., Jung, K., *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in the human kallikrein 10 (*KLK10*) gene and their association with prostate, breast, testicular, and ovarian cancers. *Prostate* 2002; 51:35–41.
- Bharaj, B., Scorilas, A., Diamandis, E.P., *et al.* Breast cancer prognostic significance of a single nucleotide polymorphism in the proximal androgen response element of the prostate specific antigen gene promoter. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61:111–119.
- Bhattacharjee, A., Richards, W.G., Staunton, J., *et al.* Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13790–13795.
- Bhoola, K., Ramsaroop, R., Plendl, J., *et al.* Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem* 2001; 53: 245-282.
- Bitoun, E., Micheloni, A., Lamant, L., *et al.* LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2417–2430.
- Blaber, I.S., Ciric, B., Christophi, G.P., *et al.* Targeting kallikrein 6-proteolysis attenuates CNS inflammatory disease. *FASEB J* 2004; 18: 920-922.
- Boike, G., Lah, T., Sloane, B.F., *et al.* A possible role for cysteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumour cells. *Melanoma Res* 1992; 1:333–340.
- Bokhman, J. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology* 1983; 15: 10-17.
- Borgono, C.A., and Diamandis, E.P. The emerging roles of human kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 876-890.
- Borgono, C.A., Grass, L., Soosaipillai, A., *et al.* Human kallikrein14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 9032-9041.



- Bosher, J.M., Totty, N.F., Hsuan, J.J., *et al.* A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene* 1996; 13:1701–1707.
- Brattsand, M., and Egelrud, T. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 1999; 274: 30033–30040.
- Brattsand, M., steffansson, K., Lundh, *et al.* A Proteolytic Cascade of Kallikreins in the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 198-203.
- Brillard-Bourdet, M., Moreau, T. and Gauthier, F. Substrate specificity of tissue kallikreins: importance of an extended interaction site. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1246:47–52.
- Brinton, L.A., Gridley, G., Persson, I, *et al.* Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:572–579.
- Bristow, R. Endometrial Cancer. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 388-393.
- Bristow, R., Karlan, B.Y. Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertil Steril* 1996;66:499–507.
- Buck, M.R., Karustis, D.G., Day, N.A., *et al.* Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsins B from normal and tumor tissues. *Biochem J* 1992; 282: 273–278.
- Caduff, R.F., Johnston, C.M., and Frank, T.S. Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am J Pathol* 1995; 146:182-188.
- Cantor, A.B. GATA Transcription Factors in Hematologic Disease. *Int J Hematol* 2005; 81:378-384.
- Catasus, L., Matias-Guiu, X., and Prat, J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinico-pathologic correlations in a series of 42 cases. *Human Pathology* 1998; 29: 1160-1164.
- Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., *et al.* Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1235–1244.
- Cecil, Βασική Παθολογία 5^η Έκδοση, Πρόλογος-Επιμέλεια Μουτσόπουλος Χ. *Ιατρικές Εκδόσεις Αίτσας*, Αθήνα 2003.
- Chan, D.W., and Schwartz, M.K. Tumor Markers: Introduction and General Principles Diamandis, E.P., Fritsch, H.A., Lilja, H., Chan, D.W., and Schwartz, M.H. eds. Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications. AACC Press Washington, DC 2002: 9-18.
- Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., *et al.* Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 2000; 25: 141–142.



- Chi, D.S., Venkatraman, E.S., Masson, V., *et al.* The ability of preoperative serum CA-125 to predict optimal primary tumor cytoreduction in stage III epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 227–231.
- Christmann, M. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003; 193: 3-34.
- Christofiori, G. and Semb, H. The role of cell adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene. *Trends Bioch Sc* 1999;217:801-806.
- Chung, C.H., Parker, J.S., Karaca, G., *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 2004; 5:489–500.
- Clements, J., Hooper, J., Dong, Y., *et al.* The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organization, tissue-specific expression and potential functions. *Biol Chem* 2001; 382: 5-14.
- Clements, J., Willemsen, N.M., Myers, S.A., *et al.* The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 265–312.
- Cleutjens, K.B., van Eekelen, C.C., van der Korput, H.A., *et al.* Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 6379–6388.
- Cloutier, S.M., Kundig, C., Felber, L.M., *et al.* Development of recombinant inhibitors specific to human kallikrein 2 using phage-display selected substrates. *Eur J Biochem* 2004; 271:607–613.
- Cloutier, S.M., Chagas, J.R., Mach, J.P., *et al.* Substrate specificity of human kallikrein 2 (hK2) as determined by phage display technology. *Eur J Biochem* 2002; 269:2747–2754.
- Cohen, P., Graves, H.C., Peehl, D.M., *et al.* Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1046–1053.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 1999;23:255– 275.
- Comb, M., Mermod, N., Hyman, S.E., *et al.* Proteins bound at adjacent DNA elements act synergistically to regulate human proenkephalin cAMP inducible transcription. *EMBO J* 1988; 7:3793-3805.
- Cormier, J.N., Langstein, H.N., and Pisters, P.W. Preoperative therapy for soft tissue sarcoma. *Cancer Treat Res* 2004;120:43-63.
- Coussens, L.M., and Fingleton, B. Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295:2387–2392.



- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B* 1972; 34: 181-220.
- Cramer, D.W., Liberman, R.F., Titus-Ernstoff, L., *et al.* The risk of hereditary ovarian cancer. *New Engl J Med* 1998; 339:424-428.
- Cramer, S.D., Chen, Z. and Peehl, D.M. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated camp accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol* 1996; 156:526-531.
- D'Andrea, M.R., Derian, C.K., Santulli, R.J. *et al.* Differential expression of protease-activated receptors-1 and-2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol* 2001; 158:2031-2041.
- Dano, K., Romer, J., Nielsen, B., *et al.* Cancer invasion and tissue remodeling – cooperation of protease system and cell type. *APMIS* 1999; 107:120-127.
- Das, H.K., Jackson, C.L., Miller, D.A., *et al.* The human apolipoprotein C-II gene sequence contains a novel chromosome 19-specific minisatellite in its third intron. *J Biol Chem* 1987; 262: 4787-4793.
- Day, T.G.Jr, Gallager, H.S., and Rutledge, F.N. Epithelial carcinoma of the ovary: prognostic importance of histologic grade. *Natl Cancer Inst Monogr* 1975; 42: 15-21.
- Decock, J., Paridaens, R., and Cufer, T. Proteases and metastasis: clinical relevance nowadays? *Curr Opin Oncol* 2005; 17:545-550.
- DeFeo-Jones, D., Brady, S.F., Feng, D.M., *et al.* A prostate-specific antigen (PSA)-activated vinblastine prodrug selectively kills PSA-secreting cells *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 2002; 1:451-459.
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., *et al.* Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 1996; 15:3861-3870.
- Del Rosso, M., Fibbi, G., Pucci, M., *et al.* Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metast* 2002;19:193-207.
- Denmeade, S.R., Litvinov, I., Sokoll, L.J., *et al.* Prostate-specific antigen (PSA) protein does not affect growth of prostate cancer cells *in vitro* or prostate cancer xenografts *in vivo*. *Prostate* 2003; 56:45-53.
- Denmeade, S.R., Sokoll, L.J., Chan, D.W., *et al.* Concentration of enzymatically active prostate-specific antigen (PSA) in the extracellular fluid of primary human prostate cancers and human prostate cancer xenograft models. *Prostate* 2001; 48:1-6.



- Denmeade, S.R., Nagy, A., Gao, J., *et al.* Enzymatic activation of a doxorubicin-peptide prodrug by prostate-specific antigen. *Cancer Res* 1998; 58 :2537–2540.
- Denmeade, S.R., Jakobsen, C.M., Janssen, S., *et al.* Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 990–1000.
- Derynck, R.; Akhurst, R.J. and Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 2001; 29:117–129.
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monosov, E., *et al.* MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001; 263:209–223.
- Desrivieres, S., Lu, H., Peyri, N., *et al.* Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J Cell Physiol* 1993; 157: 587–593.
- Dhar, S., Bhargava, R., Yunes, M., *et al.* Analysis of Normal Epithelial Cell Specific-1 (NES1)/Kallikrein 10 mRNA Expression by *in Situ* Hybridization, a Novel Marker for Breast Cancer. *Clin Can Res* 2001;7:3393-3398.
- Diamandis, E.P., Okui, A., Mitsui, S., *et al.* Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62 : 295–300.
- Diamandis, E.P., Scorilas, A., Fracchioli, S., *et al.* Human kallikrein 6 (hK6): a new potential serum biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:1035–1043.
- Diamandis, E. P. Scorilas, A. Kishi, *et al.* Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Clin Biochem* 2004; 37: 230-237.
- Diamandis, E.P., and Yousef, G.M. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 2002; 48: 1855-1863.
- Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Clements, J., *et al.* New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin. Chem.* 2000; 46: 1855–1858.
- Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Luo, L.Y., *et al.* The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 54-60.
- Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Petraki, C., *et al.* Human kallikrein 6 as a biomarker of Alzheimer's disease. *Clin biochem* 2000; 33: 663-667.
- Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Soosaipillai, A.R. *et al.* Human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin): a new serum biomarker of ovarian carcinoma. *Clin Biochem* 2000; 33: 579–583.



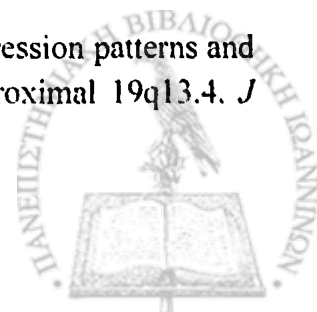
- Dong, Y., Kauschal, A., Brattsand, M., *et al.* Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial Ovarian Cancer produces Novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clin Cancer res* 2003;9:1710-1720.
- Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M., Friedman, S., *et al.* Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR): a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989;64:1914-1922.
- Duffy, M.G. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1991; 10: 145-155.
- Eckholm, E., Brattsand, M., and Egelrud, T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J invest Dermatol* 2000b; 114: 56-63.
- Eckholm, E., and Egelrud, T. Expression of stratum corneum cymotryptic enzyme in relation to other markers of epidermal differentiation in a skin explant model. *Exp Dermatol* 2000; 9: 65-70.
- Eckholm, E., and Egelrud, T. Stratum corneum cymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 195-200.
- Eder, J.P., Kantoff, P.W., Roper, K., *et al.* A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1632-1638.
- Egelrud, T., Brattsand, M., kreutzmann, P., *et al.* hK5 and hK7, two serine proteases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br J Dermatol* 2005; 153: 1200-1203.
- Egelrud, T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol* (Stockh) 2000; 208 (Suppl.): 44-45.
- Egelrud, T. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 200-204.
- Egelrud, T., and Lundström, A. A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Arch Dermatol Res* 1991; 283(2): 108-112.
- Egelrud, T., Regnier, M., Sondell, B., *et al.* Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in reconstructed human epidermis and its suppression by retinoic acid. *Acta Dermato-Venereol* 1993; 73: 181-184.
- Elit, L. Endometrial Cancer: Prevention, Detection, Management, and Follow up. *Can Fam Phys* 2000;46: 887-892.



- Emanuelli, C., Minasi, A., Zacheo, *et al.* Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2001; 103:125–132.
- Fini, M.E., Cook, J.R., Mohan, R., *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases gene expression. In: Parks, W., Mehan, R., editors. Matrix metalloproteinases. San diego (CA): *Academic Press* 1998: 300–356.
- Fitzpatrick, F.A. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:1651–1667.
- Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Sem Cancer Biol* 1992; 3:65–71.
- Fortier, A.H., Holaday, J.W., Liang, H., *et al.* Recombinant prostate specific antigen inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Prostate* 2003; 56: 212–219.
- Fortier, A.H., Nelson, B.J., Grella, D.K. *et al.* Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1635–1640.
- Franzke, C.W., Baici, A., Bartels, J., *et al.* Antileukoprotease Inhibits Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271(36): 12886–21890.
- Frenette, G., Tremblay, R.R., Lazure, C. *et al.* Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer* 1997; 71:897–899.
- Friez, M., Hermansen, R. and Milavetz, B. Chromatin structure of the simian virus 40 late promoter : a deletional analysis. *J Virol* 1999; 73:1990-1997.
- Gabrijelcic, D., Svetic, B., Spaic, D., *et al.* Cathepsin B, H and L in human breast carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30:69–74.
- Galliano, M.F., Toulza, E., Gallinaro, H., *et al.* A novel protease inhibitor of the alpha2-macroglobulin family expressed in the human epidermis. *J Biol Chem* 2006; 9: 5780-5789.
- Garces, C.A., McAuliffe, P.F., Hochwald, N.S., *et al.* Neoadjuvant Therapy in the Treatment of Solid Tumors. *Curr Prob Surg* 2006; 43:462-551.
- Garcia, M., Platet, N., Liaudet, E., *et al.* Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 1996; 14:642–650.
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., *et al.* Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J* 1995; 14:1508–1519.
- Gee, J.M., Robertson, J.F., Ellis, I.O., *et al.* Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J Pathol* 1999; 189:514–520.



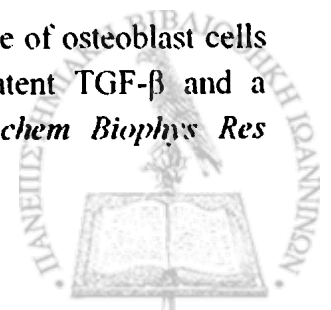
- Gilcrease, M.Z., and Sahin, A. Pathological evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Methods Mol Med* 2006;120:113-125.
- Gomis-Ruth, F.X., Bayes, A., Sotiropoulou, G., *et al.* The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family. *J Biol Chem* 2002; 277:27273–27281.
- Gortzak, E., Azzarelli, A., Buesa, J., *et al.* A randomised phase II study on neoadjuvant chemotherapy for “high-risk” adult soft-tissue sarcoma. *Eur J Cancer* 2001;37:1096-1103.
- Goyal, J., Smith, K.M., Cowan, J.M., *et al.* The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res* 1998;58:4782-4786.
- Grady, W.M. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metast Rev* 2004; 23:11-27.
- Grady, W.M., and Markowitz, S.D. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:101-128.
- Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., *et al.* Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7–33.
- Gupta, R.A., and DuBois, R. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:11-21.
- Halperin, R., Zehavi, S., Habler, L., *et al.* Comparative immunohistochemical study of endometrioid and serous papillary carcinoma of endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001; 22: 122-126.
- Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353–364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
- Hansson, L., Bergman, A., Ny, A., *et al.* Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Inv Dermatol* 2002; 18: 444-449.
- Hansson, L., Strömqvist, M., Bäckman, A., *et al.* Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 19420–19426.
- Hara, M., Koyanagi, Y., Inoue, T. *et al.* Some physico-chemical characteristics of “-seminoprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1971; 25: 322–324.
- Harvey, T.J., Hooper, J.D., Myers, S.A., *et al.* Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem* 2000; 275: 37397–37406.



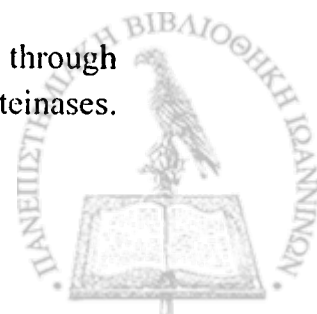
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., *et al.* Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; 298:29–32.
- Heidtmann, H.H., Nettelbeck, D.M., Mingels, A., *et al.* Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br J Cancer* 1999; 81:1269–1273.
- Heiser, A., Maurice, M.A., Yancey, D.R., *et al.* Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res* 2001; 61:3388–3393.
- Hietala, K.A., Kosma, V.M., Syrjanen, K.J., *et al.* Correlation of MIB-1 antigen expression with transcription factors Skn-1, Oct-1, AP-2, and HPV type in cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 1997; 183:305–310.
- Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284:99–110.
- Holcomb, K., Delatorre, R., Pedemonte, B., *et al.* E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 1290–1295.
- Holschneider, C.H., Berek, J.S. "Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors." *Seminars in Surgical Oncology* 2000; 19: 3–10.
- Hsu, T.C., Young, M.R., Cmarik, J., *et al.* Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1338–1348.
- Hu, Y.F., Luscher, B., Admon, A., *et al.* Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev* 1990; 4:1741–1752.
- Huang, E., Cheng, S.H., Dressman, H., *et al.* Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003; 361:1590–1596.
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., *et al.* Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* 1998; 17:4358–4369.
- Iacobuzio-Donahue, C.A., Ashfaq, R., Maitra, A., *et al.* Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res* 2003; 63:8614–8622.
- Ishii, K., Otsuka, T., Iguchi, K., *et al.* Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Lett* 2004; 207:79–87.



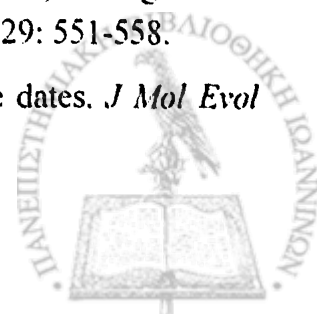
- Ishida-Yamamoto, A., Deraison, C., Bonnart, C., *et al.* LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 360-366.
- Ishidoh, K., Saido, T.C., Kawashima, S., *et al.* Multiple processing of procathepsin L to cathepsin L *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:202–207.
- Issels, R.D., and Schlemmer, M. Current trials and new aspects in soft tissue sarcoma of adults. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;49(Suppl 1):S4-8.
- Iwamura, M., Hellman, J., Cockett, A.T., *et al.* Alteration of the hormonal bioactivity of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a result of limited proteolysis by prostate-specific antigen. *Urology* 1996; 48:317–325.
- Jacobs, I., Stabile, I., Bridges, J., *et al.* Multimodal approach to screening for ovarian cancer. *Lancet* 1999:268– 71.
- Jacotot, E., Ferri, K.F., and Kroemer, G. Apoptosis and cell cycle: distinct checkpoints with overlapping upstream control. *Pathologia et Biochimie* 2000; 48:271-279.
- Jordan, V.C. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in the clinic. *Cancer Cell* 2004; 5:207-213.
- Kabesch, M., Carr, D., Weiland, S.K., *et al.* Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 340–345.
- Kagedal, K., Johansson, U., and Ollinger, K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB* 2001; 15:1592–1594.
- Kahari, V.M., and Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31:34–45.
- Kaplan, E.L., and Meier, P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.
- Karjalainen, J.M., Kellokoski, J.K., Eskelinen, M.J., *et al.* Downregulation of transcription factor AP-2 predicts poor survival in stage I cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* 1998; 16:3584–3591.
- Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. Defining the „S“ in SERMs. *Science* 2002; 295:2380-2381.
- Keen, J.C., and Davidson, N.E. The biology of breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97:825-833.
- Killian, C.S., Corral, D.A., Kawinski, E. *et al.* Mitogenic response of osteoblast cells to prostatespecific antigen suggests an activation of latent TGF- β and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:940–947.



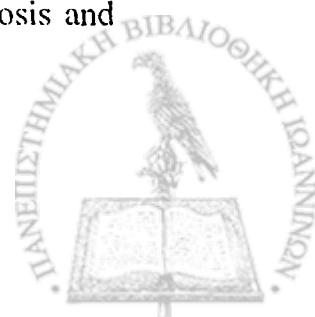
- Kim, H., Scorilas, A., Katsaros, D., *et al.* Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001;84:643-650.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
- Kirschke, H. In: Ansorge, S., Langner, J., editors, Cellular peptidases in immune functions and diseases, Lysosomal cysteine peptidases and malignant tumours, Plenum Press, New York, London 1997: 253-257.
- Kishi, T., Grass, L., Soosaipillai, A., *et al.* Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63 :2771-2774.
- Kishi, T. Soosaipillai, A. Grass, L. *et al.* Development of an immunofluorometric assay and quantification of human kallikrein 7 in tissue extracts and biological fluids. *Clin Chem* 2004;50:709-716.
- Koblinski, J.E., Ahram, M., and Sloane, B.F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000;291:113-135.
- Koehne, C.H., and Dubois, R.N. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004; 31 Suppl. 7:12-21.
- Köhler, T, Lerche, D, Meye, A, *et al.* Automated analysis of nucleic acids by quantitative PCR using coated ready-to-use reaction tubes. *J Lab Med* 1999; 23: 408-14.
- Komatsu, N., Saijoh, K., Sidiropoulos, M., *et al.* Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependance on age and gender. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1182-1189.
- Komatsu, N., Saijoh, K., Toyama, T., *et al.* Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *Br J Dermatol* 2005b; 153: 274-281.
- Komatsu, N., Takata, M., Otsuki, N., *et al.* Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 436-443.
- Komatsu, N., Takata, M., Otsuki, N., *et al.* Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 542-549.
- Koong, A.C., Denko, N.C., and Hudson, K.M. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 2000; 60:883-887.
- Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H., *et al.* Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 1999; 455:286-290.



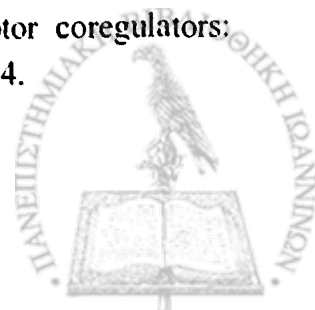
- Koul, A., Willen, R., Bendahl, P.O., *et al.* Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer* 2002; 94: 2369-2379.
- Krem, M.M. and Di Cera, E. Molecular markers of serine protease evolution, *EMBO J* 2001; 20: 3036-3045.
- Krepela E. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis. *Neoplasma* 2001: 48: 332-349.
- Kurlender, L., Borgono, C., Michael, I.P., *et al.* A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755: 1-14.
- Kurschaut, P. and Mauch, C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Derm* 2000; 25: 482-489.
- Kyriakopoulou, L. G., Yousef, G. M., Scorilas, A., *et al.* Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin Biochem* 2003; 36: 135-143.
- Lah, T.T., and Kos, J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 1998; 379: 125-130.
- Lai, L.C., Erbas, H., Lennard, T.W. *et al.* Prostate-specific antigen in breast cyst fluid: possible role of prostate-specific antigen in hormone-dependent breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 66: 743-746.
- Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S., *et al.* Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 6-29.
- Larsen, L.B., Boisen, A., and Petersen, T.E. Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH. *FEBS Lett* 1993; 319:54-58.
- Latham, J.P., Searle, P.F., Mautner, V. *et al.* Prostate-specific antigen promoter/enhancer driven gene therapy for prostate cancer: construction and testing of a tissue-specific adenovirus vector. *Cancer Res* 2000; 60:334-341.
- Lax, S.F. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: form a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 2004; 444: 213-223.
- Lax, S.F., Kendall, B., Tashiro, H., *et al.* The frequency of p53, K-ras mutations and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 2000; 88: 814-824.
- Lax, S.F., Pizer, E.S., Ronnett, B.M., *et al.* Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen and progesterone receptor expression. *Human Pathology* 1998; 29: 551-558.
- Lee, M.S. Molecular clock calibrations and metazoan divergence dates. *J Mol Evol* 1999; 49: 385-91.



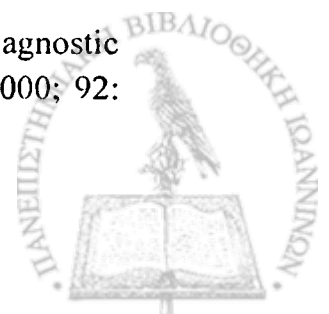
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386: 623-627.
- Lesk, A.M., and Fordham, W.D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol* 1996; 258: 501-37.
- Li, B., Goyal, J., Dhar, S., *et al.* CpG methylation as a basis for breast tumorspecific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res* 2001; 61: 8014-8021.
- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., *et al.* Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membranes. *Nature* 1980; 284: 67-68.
- Liotta, L.A. and Kohn, E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379.
- Lipponen, P., Aaltomaa, S., Kellokoski, J., *et al.* Expression of activator protein 2 in prostate cancer is related to tumor differentiation and cell proliferation. *Eur Urol* 2000; 37:573-578.
- Lovgren, J., Airas, K. and Lilja, H. Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). Substrate specificity and regulation by Zn²⁺ and extracellular protease inhibitors. *Eur J Biochem* 1999; 262 :781-789.
- Lovgren, J., Rajakoski, K., Karp, M., *et al.* Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238 :549-555.
- Ludwig, T. Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *BioEssays* 2005; 27: 1181-1191.
- Lundström, A., and Egelrud, T. Evidence that cell shedding from plantar stratum corneum in vitro involves endogenous proteolysis of the desmosomal protein desmoglein. *J Invest Dermatol* 1990; 94(2): 216-220.
- Lundström, A., and Egelrud, T. Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta Derm Venereol* 1991; 71(6): 471-474.
- Luo, L.Y., Grass, L., and Diamandis, E.P. The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene is up-regulated by steroid hormones in the breast carcinoma cell line BT-474. *Anticancer Res* 2000; 20: 981-986
- Luo, L.Y., Grass, L., and Diamandis, E.P. Steroid hormone regulation of the human kallikrein 10 (KLK10) gene in cancer cell lines and functional characterization of the KLK10 gene promoter. *Clin Chim Acta* 2003;337:115-126.
- Luo, L. Y., Katsaros, D., Scorilas, A., *et al.* The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res* 2003; 63: 807-811.



- Luo, L. Y., Katsaros, D., Scorilas, A., *et al.* Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2372–2379.
- Lustig, B., and Behrens, J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129:199-221.
- Luther, T., Kotzsch, M., Meye, A., *et al.* Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost* 2003 Apr; 89(4): 705-17.
- Lynch, H.T., and Smyrk, T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer* 1996; 78: 1149–1167.
- Mägert, H.J., Kreutzmann, P., Drögemüller, K., *et al.* The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role. *Eur J Med Res* 2002; 7: 49–56.
- Magklara, A., Brown, T.J. and Diamandis, E.P. Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer* 2002; 100:507–514.
- Magklara, A., Mellati, A.A., Wasney, G.A., *et al.* Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307 :948–955.
- Manne, U., Srivastava, R.G., and Srivastava, S. Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment. *DDT* 2005; 10: 965-976.
- Mantovani, G., Maccio, A., Madeddu, C., *et al.* Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms, and serum cytokine levels in cancer patients: Impact of an antioxidant treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003; 22: 17–28.
- Martin, D.I., and Orkin, S.H. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev* 1990;4:1886–1898.
- Matias-Guiu, X., Catusus, L., Bussaglia, E., *et al.* Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2001; 32 : 569-577.
- McDonald, N.D., Salvesen, H.B., Ryan, A., *et al.* Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Res* 2000; 60: 1750-1752.
- McDonnell, D.P., and Norris, J.D. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 2002; 296:1642-1644.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999; 20:321–344.



- McPherson, L.A., and Weigel, R.J. AP2 α and AP2 γ : a comparison of binding site specificity and *trans*-activation of the estrogen receptor promoter and single site promoter constructs. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:4040–4049.
- Mermod, N., Williams, T. J. and Tjian, R. Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* 1988; 332:557-561.
- Meyer, T., and Rustin, G.J. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1535–1538.
- Michael, I.P., Kurlender, L., Memari, N., *et al.* Intron retention: a common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem* 2005;51:33-44.
- Michael, I.P., Pampalakis, G., Mikolajczyk, S.M., *et al.* Human Tissue Kallikrein 5 is a Member of a Proteolytic Cascade Pathway Involved in Seminal Clot Liquefaction and Potentially in Prostate Cancer Progression. *J Biol Chem* 2006; 281:12743-12750.
- Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Kumar, A. *et al.* Prostatic human kallikrein 2 inactivates and complexes with plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Cancer* 1999; 81:438–442.
- Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Marker, K.M., *et al.* Ala217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2. *Eur J Biochem* 1997 ; 246:440–446.
- Milde-Langosch, K., and Riethdorf, S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2003; 196: 224-244.
- Mitchell, P.J., Timmons, P.M., Hebert, J.M., *et al.* Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 1991; 5:105–119.
- Mitsui, S., Okui, A., Kominam, ,K., *et al.* cDNA cloning and tissue-specific splicing variants of mouse hippostatin/TLSP (PRSS20). *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494: 206-10.
- Mitsui, S., Yamada, T., Okui, A., *et al.* A novel isoform of a kallikrein-like protease, TLSP/Hippostasin, (PRSS20), is expressed in the human brain and prostate. *Biochem Biophys Res Com* 2000; 272: 205-211.
- Moreno-Bueno, G., Sanchez-Estevez, C., Cassia, R., *et al.* Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 5697-5702.
- Mutter, G.L., Lin, M.C., Fitzgerald, J.I., *et al.* Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 924-930.



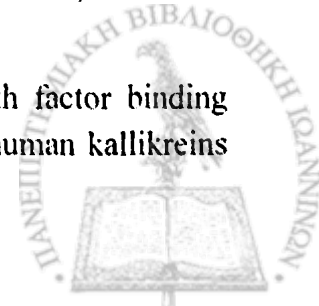
- Mutter, G.L. Pten, a protein tumor suppressor. *Am J Pathol* 2001; 158: 1895-1898.
- Nagahara, H., Mimori, K., Utsunomiya, T., *et al.* Clinicopathologic and Biological Significance of Kallikrein 6 Overexpression in Human Gastric Cancer. *Clin Can Res* 2005; 11:6800-6806.
- Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378:151-160.
- Nakashima, R., Fujita, M., Enomoto, T., *et al.* Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *Br J Cancer* 1999; 80: 458-467.
- Nakamura, T., Scorilas, A., Stephan, C., *et al.* The usefulness of serum human kallikrein 11 for discriminating between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res* 2003; 63:6543-6546.
- Nason, K.S., Anderson, B.O., Byrd, D.R., *et al.* Increased false negative sentinel node biopsy rates after preoperative chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer* 2000;89:2187-2194.
- Nelson, P.S., Gan, L., Ferguson, C., *et al.* Molecular cloning and characterization of protease, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 1999; 96: 3114-3119.
- Neuget, A.I., *et al.* Prevalence and incidence of colorectal adenomas and cancer in asymptomatic persons. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1997; 7, 387-399.
- Nguyen, H.N., Averette, H.E., Hoskins, W., *et al.* National survey of ovarian carcinoma. VI. Critical assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system. *Cancer* 1993; 72:3007-3011.
- Ni, X., Zhang, W., Huang, K.C., *et al.* Characterization of human kallikrein 6/protease M expression in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004; 91:725-731.
- Noel, A., Gilles, C., Bajou, K., *et al.* Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 1997; 17: 221-239.
- Nordstrom, B., Strang, P., Lindgren, A., *et al.* Endometrial carcinoma: the prognostic impact of papillary serous carcinoma (UPSC) in relation to nuclear grade, DNA ploidy and p53 expression. *Anticancer Res* 1996; 16: 899-904.
- Obiezu, C.V., and Diamandis, E.P. Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett* 2005; 224:1-22.
- Obiezu, C.V., Soosaipillai, A., Jung, K., *et al.* Detection of human kallikrein 4 in healthy and cancerous prostatic tissues by immunofluorometry and immunohistochemistry. *Clin Chem* 2002; 48:1232-1240.
- Ogawa, K., Utsunomiya, T., Mimori, K., *et al.* Clinical Significance of Human Kallikrein Gene 6 Messenger RNA Expression in Colorectal Cancer. *Clin Can Res* 2005; 11:2889-2893.



- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001; 107:789–800.
- Oka, T., Hakoshima, T., Itakura, M., *et al.* Role of loop structures of neuropsin in the activity of serine protease and regulated secretion. *J Biol Chem* 2002; 277: 14724–14730.
- Okamoto, T., Akaite, T., Nagano, T., *et al.* Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: A novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342:261–274.
- Okui, A., Kominati, K., Mitsui, U.H., *et al.* characterization of brain-related serine protease, neurosin (human kallikrein 6), in human cerebrospinal fluid. *Neuroreport* 2001; 12:1345-1350.
- Paliouras, M., and Diamandis, E.P. The kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. *Biol Chem* 2006; 387:643-652.
- Papadopoulos, I., Sivridis, E., Giatromanolaki, A. *et al.* I. Tumor angiogenesis is associated with MUC1 overexpression and loss of prostate-specific antigen expression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1533–1538.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-752.
- Perucho, M. Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat Genet* 1996; 14: 102-105.
- Pettersson, F. Ann report on the treatment in gynecological cancer. Stockholm: International Federation of Gynecology and Obstetrics, 1994.
- Petraki, C.D., Gregorakis, A.K., Papanastasiou, P.A., *et al.* Immunohistochemical localization of human kallikreins 6, 10 and 13 in benign and malignant prostatic tissues. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003; 6(3): 223-227.
- Petraki, C.D., Gregorakis, A.K., Vaslamatzis, M.M., *et al.* Prognostic Implications of the Immunohistochemical Expression of Human Kallikreins 5, 6, 10 and 11 in Renal Cell Carcinoma. *Tumor Biol* 2006; 27:1-7.
- Petraki, C.D., Karavana, V.N., Luo, L-Y., *et al.* Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(9): 1247-1261.
- Petraki, C.D., Karavana, V.N., Skoufogiannis, P.T., *et al.* The spectrum of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) expression in human tissues, as assessed by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1431-1442.



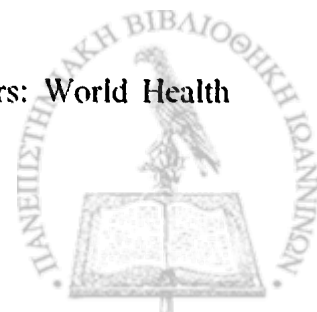
- Petricoin, E.F. Ardekani, A.M., Hitt, B.A., *et al.* Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002 ; 359: 572–577.
- Phan, A., and Patel, S. Advances in neoadjuvant chemotherapy in soft tissue sarcomas. *Curr Treat Options Oncol* 2003;4:433-439.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., *et al.* GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovascular Res* 2004; 63:196-207.
- Planque, C., de Monte, M., Guyetant, S., *et al.* KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329(4): 1260-1266.
- Pollak, M.N., and Foulkes, W.D. Challenges to cancer control by screening. *Nat Rev Cancer* 2003; 3, 297–303.
- Potischman, N., Hoover, R.N., Brinton, L.A., *et al.* Case – control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1127-1135.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M. *et al.* Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Rev. Genet.* 2003;4:544–558.
- Purdie, D., Green, A., Bain, C., *et al.* Reproductive and other factors and risk of epithelial ovarian cancer: an Australian case-control study. *Int J Cancer* 1995; 62:678–684.
- Rai, A.J., Zhanq, Z., Rosenweiq, J., *et al.* Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1518-1526.
- Rajah, R., Valentinis, B. and Cohen, P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272:12181–12188.
- Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., *et al.* A molecular signature of metastasis in primary tumors. *Nat Genet* 2003; 33: 49-54.
- Rawlings, N.D., and Barret, A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; 290: 205-18.
- Reddy, B.S., and Rao, C.V. Novel approaches for colon cancer prevention by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21:155-164.
- Reddy, K.B., Krueger, J.S., Kondapka, S.B., *et al.* Mitogenactivated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int J Cancer* 1999; 82:268–273.
- Rehault, S., Monget, P., Mazerbourg, S., *et al.* Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as potential physiological substrates for human kallikreins hK2 and hK3. *Eur J Biochem* 2001; 268:2960–2968.



- Riegman, P.H., Vlietstra RJ, Klaassen P, *et al.* The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein-1 gene are tandemly located on chromosome 19. *FEBS Lett.* 1989;247:123–126.
- Rifkin, D.B., Mazzeri, R., Munger, J.S., *et al.* Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 1999; 107:80–85.
- Risinger, J.I., Umar, A., Boyd, J., *et al.* Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat Genet* 1996; 14: 102-105.
- Rittenhouse, H.G., Finlay, J.A., Mikolajczyk, S.D. *et al.* Human Kallikrein 2 (hK2) and prostatespecific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998; 35:275–368.
- Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Agirre, X., *et al.* The normal epithelial cell-specific 1 (*NES1*) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18:362–365.
- Romanov, V.I., Whyard, T., Adler, H.L., *et al.* Prostate cancer cell adhesion to bone marrow endothelium: the role of prostate-specific antigen. *Cancer Res* 2004; 64: 2083–2089.
- Ropponen, K.M., Kellokoski, J.K., Pirinen, R.T. *et al.* Expression of transcription factor AP-2a in colorectal adenomas and adenocarcinomas; comparison of immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Clin Pathol* 2001; 54:533–538.
- Rossing, M.A., Daling, J.R., Weiss, N.S., *et al.* Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *New Engl J Med* 1994; 331: 771–776.
- Rubin, E. Βασική Παθολογική Ανατομική, Γενική επιμέλεια: Δάβαρης Π., Επιμέλεια ενοτήτων: Νακοπούλου Λ., Τσελένη Σ., Πατσούρης Σ., Αγαπητός Ε., Παρασκευάκου Ε., Αρώνη Κ. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*, Αθήνα 2002.
- Salvesen, H.B., and Akslen, L.A. (2002). Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *APMIS*, 110: 673-89.
- Santin, A. D. Cane, S. Bellone, S. *et al.* The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2004; 2: 283-288.
- Sato, S., Yokoyama, Y., Sakamota, T., *et al.* Usefulness of mass screening for ovarian carcinoma using transvaginal ultrasonography. *Cancer* 2000; 89: 585– 588.
- Scarisbrick, I.A., Isackson, P.J., Ciric, B., *et al.* MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system. *J Comp Neurol* 2001; 431: 347-361.



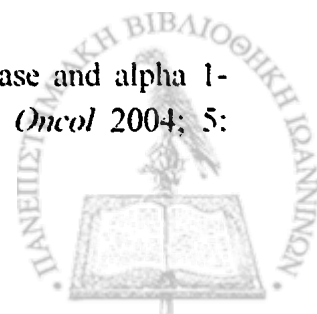
- Scarlsbrick, I.A., Blaber, S.I., Lucchinetti, C.F., *et al.* *Brain* 2002; 125:1283-1296.
- Schechter, N.M., Choi, E.J., Wang, J.M., *et al.* Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem* 2005; 386: 1173-1184.
- Schick, C., Pemberton, P.A., Shi, G.P., *et al.* Cross-class inhibition of the cysteine proteinases atepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: A kinetic analysis. *Biochemistry* 1998; 37:258-5266.
- Schildkraut, J.M., Schwingl, P.J., Bastos, E., *et al.* Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1996; 88:554-559.
- Schlosshauer, P.W., Ellenson, L.H., and Soslow, R.A. Betacatenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. *Mod Pathol* 2002; 15: 1032-1037.
- Schmitt, M., Janicke, F., Moniwa, N., *et al.* Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: Biological and clinical significance. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; 373:611-622.
- Schultz, R.M., and Liebman, M.N. (1997). Structure-function relationship in protein families. In: textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, T.M. Devlin, ed. (New York, USA: Wiley-Liss, Inc.), pp. 12-116.
- Schuur, E.R., Henderson, G.A., Kmetec, L.A., *et al.* Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J Biol Chem* 1996; 271:7043-7051.
- Scorilas, A., Karameris, A., Arnogiannaki, N., *et al.* Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001; 84:1488-1496.
- Scully, R.E., Chen, J., Plug, A., *et al.* Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88:265-275.
- Scully, R.E., Livingston, D.M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000; 408:429-432.
- Scully, R.E., Young, R.H., Clement, P.B. (eds): "Tumors of the ovary, fallopian tube, and broad ligament." 3rd series. Fascicle 23. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 1998.
- Sculz, W.A. *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer, 2005.
- Semczuk, A., Schneider-Stock, R., Berbec, H., *et al.* K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett* 2001; 164: 207-212.
- Serov, S.F., and Sorbin, L.H. *Histological typing of ovarian tumors: World Health Organization*. 1973.



- Shamamian, P., Schwartz, J.D., Pocock, B.J., *et al.* Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: A role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 189: 197-206.
- Shapiro, S.D. Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:602-608.
- Sherman, M.E., Bur, M.E., and Kurman, R.J. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human Pathology* 1995; 26: 1268-1274.
- Sherman, M.E., Sturgeon, S., Brinton, L.A., *et al.* Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Mod Pathol* 1997; 10: 963-968.
- Shibuya, K., Mathers, C.D., Boschi-Pinto, C., *et al.* Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002;2:37.
- Shigemasa, K., Tanimoto, H., Underwood, L.J., *et al.* expression of the protease inhibitor antileukoprotease and the serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE) is coordinated in ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 454-461.
- Shimizu-Okabe, C., Yousef G.M., Diamandis, E.P., *et al.* Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 2001; 12:2747-2751.
- Sidiropoulos, M., Pampalakis, G., Sotiropoulou, G., *et al.* Downregulation of human kallikrein 10 (*KLK10/NES1*) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. *Tumour Biol* 2005; 26:324-336.
- Siegel, P.M., and Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-820.
- Silverthorn, D.U. (1995). Human physiology. An integrated approach (New Jersey, USA: Prentice Hall).
- Simon, M., Jonca, N., Guerrin, M. *et al.* Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J Biol Chem* 2001; 276: 20292-20299.
- Simpkins, S.B., Bocker, T., Swisher, E.M., *et al.* MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 661-666.
- Sivridis, E., and Giatromanolaki, A. Prognostic aspects on endometrial hyperplasia and neoplasia. *Virchows Arch* 2001; 439: 118-126.



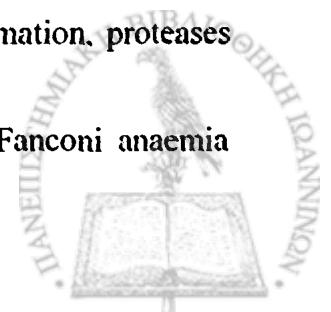
- Skrzydłewska, E., Sulkowska, M., Koda, M. *et al.* Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1261-1266.
- Skytt, Å., Strömquist, M., and Egelrud, T. Primary substrate specificity of recombinant human stratum corneum chymotryptic enzyme. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 211(2): 586-589.
- Smith, M.S., Lechago, J., Wines, D.R., *et al.* Tissue-specific expression of kallikrein family transgenes in mice and rats. *DNA Cell Biol* 1992; 11:345-358.
- Sondell, B., Dyberg, P., Anneroth, G.K., *et al.* Association between expression of stratum corneum chymotryptic enzyme and pathological keratinization in human oral mucosa. *Acta Dermato-Venereol* 1996; 76: 177-181.
- Sondel, B., Thornell, L.E., and Egelrud, T. Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 819-823.
- Sondel, B., Thornell, L.E., Stigbrand, T., *et al.* Immunolocalization of stratum corneum chymotryptic enzyme in human skin and oral epithelium with monoclonal antibodies: evidence of a proteinase specifically expressed in keratinizing squamous epithelia. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 459-465.
- Sotiropoulou, G., Rogakos, V., Tsetsenis, *et al.* Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer. *Oncol Res* 2003; 13:381-391.
- Southan, C. A genomic perspective on human proteases as drug targets. *Drug Discov. Today* 2001; 6: 681-688.
- Staebler, A., Lax, S.F., and Ellenson, L.H. Altered expression of hMLH1 and hMSH2 protein in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol* 2000; 31:354-358.
- Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., *et al.* Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317:909-916.
- Stenman, U.H. New ultrasensitive assays facilitate studies on the role of human glandular kallikrein (hK2) as a marker for prostatic disease. *Clin Chem* 1999; 45:753-754.
- Stern, D.F. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 2003; 284:89-98.
- Sun, X.Y., Donald, S.P. and Phang, J.M. Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2001; 22:1775-1780.
- Sun, Z., and Yang, P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* 2004; 5: 182-190.



- Sutinen, M., Kainulainen, T., Hurskainen, T., *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1998; 77:2239–2245.
- Sutkowski, D.M., Goode, R.L., Baniel, J., *et al.* Growth regulation of prostatic stromal cells by prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1663–1669.
- Suzuki, S., Tadakuma, T., Kunitomi, M., *et al.* Liposome-mediated gene therapy using HSV-TK/ganciclovir under the control of human PSA promoter in prostate cancer cells. *Urol Int* 2001; 67:216–223.
- Szabo, C.I., King, M.C.: "Population genetics of BRCA1 and BRCA2" [editorial]. *Am J Hum Genet* 1997;60:1013–1020.
- Taipale, J., and Beachy, P.A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001;411:349-354.
- Takada, Y., Skidgel, R.A. and Erdos, E.G. Purification of human urinary prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochem J* 1985; 232:851–858.
- Takayama, T.K., McMullen, B.A., Nelson, P.S., *et al.* Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 2001; 40:15341–15348.
- Takayama, T.K., Carter, C.A. and Deng, T. Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry* 2001; 40:1679–1687.
- Takayama, T.K., Fujikawa, K. and Davie, E.W. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen. Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chem* 1997; 272:21582–21588.
- Talieri, M., Diamandis, E.P., Gourgiotis, D., *et al.* Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors : a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost* 2004; 91: 180-186.
- Tan, O.L., Whitbread, A.K., Clements, J.A., *et al.* Kallikrein-related peptidase (KLK) family mRNA variants and protein isoforms in hormone-related cancers: do they have a function? *Biol Chem* 2006; 387:697-705.
- Tanimoto, H., Underwood, L.J., Shigemasa, K., *et al.* The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer* 1999; 86(10): 2074-2082.



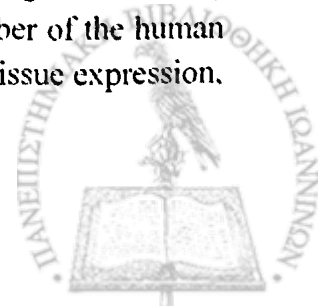
- Tashiro, H., Lax, S.F., Gaudin, P.B., Isacson, C., Cho, K.R., and Hedrick, L. Microsatellite instability is uncommon in uterine serous carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150: 75-79.
- Tavassoli, F.A., and Devilee, P. (eds.) Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, 2003.
- Terayama, R., Bando, Y., Takahashi, T., *et al.* Differential expression of neuropsin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. *Glia* 2004; 48:91-101.
- The Gale Encyclopedia of Cancer. A Guide to Cancer and its treatments. Michigan, Gale Group, 2002.
- Tian, X., Shigemasa, K., Hirata, E., *et al.* Expression of human kallikrein 7 (hK7/SCCE) and its inhibitor antileukoprotease (ALP/SLPI) in uterine endocervical glands and in cervical adenocarcinomas. *Oncol Rep* 2004; 12: 1001-1006.
- Tschesche, H., Michaelis, J., Kohnert, U., *et al.* Tissue kallikrein effectively activates latent matrix degrading metalloenzymes. *Adv Exp Med Biol* 1989; 247A:545-548.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. Lysosomes cysteine proteases; more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 98-111.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. Structural and functional aspects of papain-like proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 1997; 378:141-150.
- Ugarova, T.P., Ljubimov, A.V., Deng, L., *et al.* Proteolysis regulates exposure of the IICS-1 adhesive sequence in plasma fibronectin. *Biochemistry* 1996; 35: 10913-10921.
- Unk, I., Kiss-Toth, E. and Boros, I. Transcription factor AP-4 participates in activation of bovine leukemia virus long terminal repeat by p34 Tax. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4872-4875.
- Van der Stappen, J.W., Williams, A.C., Maciewicz, R.A., *et al.* Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* 1996; 67:547-554.
- Van de Vijver, M.J., He, Y.D., van't Veer, L.J., *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New Eng J Med* 2002; 347:1999-2009.
- Van Es, Barker, N., and Clevers, H. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Devel* 2003; 13: 28-33.
- Van Kempen, L.C.L., de Visser, K.E., and Coussens, L.M. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42:728-734.
- Venkitaraman, A.R. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:266-276.



- Venkitaraman, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2000; 108:171-182.
- Vinier, A., and McKee, P.H. Atlas of clinical dermatology. Sec. Ed., 1997, Gower Medical Publishing, London-New York.
- Vlahou, A. Laronga, C., Wilson, L., *et al.* A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003; 4: 203–209.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.
- Walley, A.J., Chavanas, S., Moffatt, M.F., *et al.* Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* 2001; 29: 175–178.
- Weiderpass, E., Adami, H.O., Baron, J.A., *et al.* Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1131-1137.
- Webber, M.M., Waghray, A. and Bello, D. Prostate-specific antigen, a serine protease, facilitates human prostate cancer cell invasion. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1089–1094.
- Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997;91:439–442.
- Westermarck, J., and Kähäri, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13:781–892.
- Whitbread, A.K., Veveris-Lowe, T.L., Lawrence, M.G., *et al.* The role of kallikrein-related peptidases in prostate cancer: potential involvement in an epithelial to mesenchymal transition. *Biol Chem* 2006; 387:707-714.
- Williams, T., and Tjian, R. Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 1991; 251:1067–1071, 1991.
- Winchester, D.J. and Winchester, D.P. Atlas of Clinical Oncology: Breast Cancer. American Cancer Society. London, B.C. Decker Inc., 2000.
- Wolf, W.C., Evans, D.M., Chao, L. *et al.* A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *Am J Pathol* 2001; 159:1797–1805.
- Wooster R, Weber BL (2003) Breast and ovarian cancer. *NEJM* 348, 2339-2347
- Xiao, X., Liu, D., Tang, Y., *et al.* Development of proteomic patterns for detecting lung cancer. *Dis. Markers* 2003; 19: 33–39.
- Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Kodama, S., *et al.* Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1350: 11-14.



- Yonou, H., Aoyagi, Y., Kanomata, N., *et al.* Prostate-specific antigen induces osteoplastic changes by an autonomous mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:1082–1087.
- Yoshida, S., Taniguchi, M., Hirata, A., *et al.* Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. *Gene* 1998;213: 9 – 16.
- Yoshimura, I., Suzuki, S., Tadakuma, T., *et al.* Suicide gene therapy o LnCaP human prostate cancer cells. *Int J Urol* 2001; 8:5-8.
- Yousef, G.M., Bharaj, B.S., Yu, H., *et al.* Sequence analysis of the human kallikrein gene locus identifies a unique polymorphic minisatellite element. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 1321-9.
- Yousef, G.M., Borgono, C.A., Popalis, S., *et al.* In-silico Analysis of Kallikrein Gene Expression in Pancreatic and Colon Cancers. *Anticancer Research* 2004; 24: 43-52.
- Yousef, G.M., and Diamandis, E.P. The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member, KLK-L3 (KLK9). *Genomics* 2000; 65: 184-194.
- Yousef, G.M. and Diamandis, E.P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001; 22: 184–204.
- Yousef, G.M. and Diamandis, E.P. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem* 2002; 383: 1045–1057.
- Yousef, G.M., Chang, A., Scorilas, A. *et al.* Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000; 276:125–133.
- Yousef, G.M., Kishi, T., and Diamandis, E.P. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* 2003; 329:1-8.
- Yousef, G.M., Obiezu, C.V., Luo, L.Y., *et al.* Prostase/KLK-L1 is a new member of the human kallikrein gene family, is expressed in prostate and breast tissues, and is hormonally regulated. *Cancer Res* 1999; 59: 4252–4256.
- Yousef, G.M., Polymeris, M.E., Grass, L., *et al.* Human kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63:3958–3965.
- Yousef, G.M., Polymeris, M.E., Yacoub, G.M., *et al.* Parallel Overexpression of Seven Kallikrein Genes in Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2003;63:2223-2227.
- Yousef, G.M., Scorilas, A., Magklara, A., *et al.* The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family – genomic characterization, mapping, tissue expression, and hormonal regulation. *Gene* 2000b; 254: 119-128.



- Yousef, G.M., Yacoub, G.M., Polymeris, M.E., *et al.* Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 167–172.
- Yu, D., Sakamoto, G.T., and Henderson, D.R. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res* 1999; 59:1498-1504.
- Yu, H., Bowden, D.W., Spray, B.J., *et al.* Identification of human plasma kallikrein gene polymorphisms and evaluation of their role in end-stage renal disease. *Hypertension* 1998; 31: 906-911.
- Yu, H., Gai, M., Diamandis, E.P., *et al.* Prostate-specific antigen is a new favourable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 2104–2110.
- Yu, H., Diamandis, E.P., Levesque, M., *et al.* Prostate specific antigen in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 40: 171–178.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 163–176.
- Yu, W.H., and Woessner, J.F. Jr. Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem* 2000; 275: 4183–4191.
- Zeng, Y.X., Somasundaram, K., and el-Deiry, W. S. AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet* 1997; 15:78–82.
- Zenq, M., Zhang, Y., Bhat, I., *et al.* The human kallikrein 10 promoter contains a functional retinoid response element. *Biol Chem* 2006;387:741-747.
- Zhang, Y., Bhat, I., Zenq, M., *et al.* Human kallikrein 10, a predictive marker for breast cancer. *Biol Chem* 2006;387:715-721.
- Zhu, X.Q., Kwon, C.H., Schlosshauer, P.W., *et al.* PTEN induces G1 cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4569-4575.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καρκινική ανάπτυξη εξαρτάται εν πολλοίς από τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς. Κυρίαρχος παράγοντας που καθορίζει την δυνατότητα αυτή αποτελεί η πρωτεόλυση του εξωκυττάρου στρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, έχει ιδιαίτερη σημασία για την ανακάλυψη νέων καρκινικών δεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων, η μελέτη των πρωτεολυτικών ενζύμων που εκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα.

Η οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών αποτελεί μία πολυγονιδιακή οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων με δραστικότητα ανάλογη της σερίνης, των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών τύπων. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια η μελέτη τους έχει κυρίως επικεντρωθεί στην αξιολόγηση του πιθανού τους ρόλου ως καρκινικών δεικτών, ιδιαίτερα σε καρκινικούς τύπους που επηρεάζονται από τις ορμόνες. Όντως, φαίνεται ότι ορισμένα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών παρουσιάζουν ιδιαίτερο διαγνωστικό/προγνωστικό ενδιαφέρον (π.χ. KLK3 στον καρκίνο του προστάτη, KLK6 και KLK10 στον καρκίνο των ωοθηκών). Πρόσφατες μελέτες όμως εμπλέκουν τις καλλικρεϊνες και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

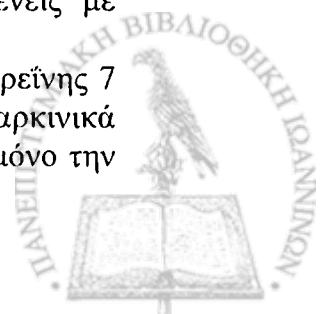
Η καλλικρεϊνή 7 αποτελεί ένα από τα λίγα μέλη της οικογένειας, για τα οποία έχει προταθεί συγκεκριμένος φυσιολογικός ρόλος, στη διαδικασία απολέπισης της κεράτινης στιβάδας του δέρματος. Οι πρώτες μελέτες για την KLK7 έδειξαν ορμονικό μηχανισμό ρύθμισης και διαφορική έκφραση του γονιδίου στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών.

Στόχος της παρούσης μελέτης ήταν 1) να διερευνηθεί η έκφραση της καλλικρεϊνης 7 σε διάφορους ορμονοεξαρτώμενους τύπους καρκίνου, και συγκεκριμένα, σε γυναικολογικούς καρκίνους, προκειμένου να αυξηθεί η διαθέσιμη πληροφορία για την πιθανή χρησιμότητά της ως διαγνωστικού/προγνωστικού δείκτη και 2) να μελετηθεί η επίδραση της έκφρασης του ενζύμου της καλλικρεϊνης 7 μεμονωμένου ή σε συνδυασμό με άλλες καλλικρεϊνες στα καρκινικά κύτταρα.

Έτσι, μελετήθηκε καταρχήν η έκφραση του mRNA της KLK7 σε καρκινικά δείγματα μαστού, ενδομητρίου και ωοθηκών. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τις διαθέσιμες ιστολογικές/παθολογοανατομικές παραμέτρους, καθώς και με την ολική και ελευθέρα νόσου επιβίωση των ασθενών. Στον καρκίνο του μαστού, η έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου αποτελεί δείκτη ευνοϊκής εξέλιξης της νόσου, ενώ συσχετίζεται σημαντικά και με την έκφραση της καλλικρεϊνης 5. Στους καρκίνους του ενδομητρίου και των ωοθηκών, παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με κάποιες ιστολογικές/παθολογοανατομικές παραμέτρους, αλλά όχι με την επιβίωση.

Παράλληλα, αρχικά πειράματα κατέδειξαν ότι η καλλικρεϊνή 7 εκφράζεται και σε μη ορμονοεξαρτώμενους όγκους, υποδεικνύοντας την ύπαρξη και διαφορετικού μηχανισμού ρύθμισης του γονιδίου. Έτσι, αποφασίστηκε η μελέτη της έκφρασής της στον καρκίνο του παχέως εντέρου και σε ενδοκρανιακούς όγκους. Στον καρκίνο του παχέως εντέρου, παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της καλλικρεϊνης 7 με εκείνη της καλλικρεϊνης 5, με κάποιες ιστολογικές/παθολογοανατομικές παραμέτρους αλλά και με μικρότερη επιβίωση των ασθενών. Ανάλογη συσχέτιση με μικρότερη επιβίωση παρατηρήθηκε και σε ασθενείς με ενδοκρανιακούς όγκους.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της καλλικρεϊνης 7 σε καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε σταθερή διαμόλυνση σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, μαστού και εγκεφάλου με φορείς έκφρασης που έφεραν μόνο την



καλλικρεΐνη 7 ή κάποια άλλη καλλικρεΐνη ή συνδυασμό καλλικρεΐνών. Στις κυτταρικές αυτές σειρές που υπερεξέφραζαν μία ή περισσότερες καλλικρεΐνες παρατηρήθηκε με *in vitro* δοκιμασίες ότι δεν επηρεάζεται ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τα ένζυμα αυτά. Αντίθετα, αυξάνεται η δυνατότητα διήθησης του εξωκυττάριου στρώματος όταν υπερεκφράζονται μεμονωμένες καλλικρεΐνες ή συνδυασμοί τους. Παρατηρήθηκε, επίσης, σε *in vivo* πειράματα με χρήση ποντικών, ότι η καρκινική ανάπτυξη και εξάπλωση επιταχύνεται στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών όταν αυτά υπερεκφράζουν συνδυασμούς περισσότερων της μίας καλλικρεΐνών.

Η παρατήρηση, τέλος ότι η KLK7 εκφράζεται και σε μη ορμονοεξαρτώμενους ιστούς, αποτέλεσε το κίνητρο για την πραγματοποίηση μιας εισαγωγικής μελέτης του υποκινητή του γονιδίου αυτού. Έτσι ανιχνεύθηκε το σημείο έναρξης της μεταγραφής, καθώς και μία αλληλουχία με πιθανή δράση στοιχείου απόκρισης σε οιστρογόνα. Παράλληλα, χαρτογραφήθηκαν στην περιοχή του εγγύς υποκινητή αρκετά στοιχεία με πιθανή λειτουργικότητα μεταγραφικών παραγόντων.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει τη σημασία της καλλικρεΐνης 7 σε πολλούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου. Η καλλικρεΐνη 7 φαίνεται να έχει προγνωστική αξία για αυτούς τους καρκίνους, η οποία ίσως ενισχυθεί εάν η μελέτη της γίνει σε συνδυασμό με άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η καλλικρεΐνη 7 αυξάνει κάποια από τα χαρακτηριστικά του καρκινικού φαινότυπου (διηθητικότητα, μεταστατικότητα) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ιδιαίτερα όταν εκφράζεται σε συνδυασμό με άλλες καλλικρεΐνες. Τα παραπάνω αποτελέσματα κάνουν φανερή και την ανάγκη να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός ρύθμισης της KLK7 και άλλων μελών της οικογένειας των καλλικρεΐνών, αλλά και η πιθανή συνεργιστική τους δράση.



SUMMARY

Cancer progression depends significantly on the ability of cancer cells to invade surrounding tissues. The major factor that determines the invasive potential of cancer cells is the production of proteolytic enzymes that can degrade the extracellular matrix. Therefore, the study of these enzymes is of critical importance for the discovery of new cancer markers and targets for cancer therapy.

Human tissue family of serine proteases is a multi-gene family of serine-like proteolytic enzymes. Kallikreins show differential expression in a great variety of cancer types. During the last years, many studies have focused on the evaluation of the potential role of kallikreins as biomarkers, especially in hormone-regulated cancers. Indeed, some members of the family seem to have diagnostic/prognostic significance for some types of cancer (eg KLK3 in prostate cancer, KLK6 and KLK10 in ovarian cancer). Furthermore, recent studies indicate that kallikreins are implicated in other cellular functions, as well.

Kallikrein 7 is one of the very few members of the family for which a physiological function has been proposed, in the desquamation process of stratum corneum. Initial reports on kallikrein 7 indicated a hormonal mechanism of regulation, as well as differential expression in breast and ovarian cancer.

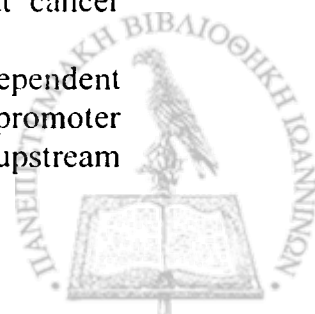
The purpose of this study is 1) to evaluate KLK7 expression in a series of hormone-dependent cancers, in order to increase the available information on their usefulness as diagnostic/prognostic biomarker and 2) to study the effects of overexpression of kallikrein 7 alone or in combination with other kallikreins in cancer cells.

Initially, KLK7 mRNA expression was evaluated in tumor samples from breast, ovary and endometrium. The results were correlated with all available histological/pathological parameters, as well as with the disease-free and overall survival of the patients. In breast cancer, kallikrein 7 expression seems to have a favourable prognostic significance. It is also significantly correlated with kallikrein 5 expression. In ovarian and endometrium cancers, KLK7 expression was significantly correlated with some of the histological/pathological parameters, but not with patients' survival.

Initial experiments showed that KLK7 is also expressed in hormone-independent types of cancer, suggesting a different mechanism of gene regulation. We therefore decided to study KLK7 expression in colon cancer and intracranial tumors. In colon cancer, kallikrein 7 expression was significantly correlated with kallikrein 5 expression, certain clinical parameters and shorter patient survival. A similar correlation with shorter overall survival was also identified for patients with intracranial tumors.

In order to study the effect of kallikrein 7 overexpression, human ovarian, breast and brain cancer cells were stably transfected with single or combinations of expression vectors carrying KLK7 or another kallikrein cDNA. *In vitro* experiments in the kallikreins-overexpressing cell lines showed that the proliferation rate was not affected. On the contrary, the cells' ability to invade extracellular matrix was significantly enhanced when single kallikreins or combinations of them were overexpressed. We also observed, in nude mice model experiments, that cancer growth and spread is increased when more than one kallikreins is expressed.

The observation, finally, that KLK7 is also expressed in hormone-independent cancer, prompted us to perform an initial characterization of the gene's promoter region. We thus identified a putative estrogen response element in the upstream



promoter region and the transcription start site. Mapping of the proximal promoter sequence identified several elements with a possible transcription factor function.

Summing up, the present study shows the clinical significance of human tissue kallikrein 7 in several types of cancer. KLK7 seems to have a potential prognostic significance for at least some of these tumors. This significance may strengthen, if KLK7 is assessed in combination with other kallikreins or proteolytic enzymes. The observation that kallikrein 7 increases some of the malignant phenotype features (invasiveness, metastasis) *in vitro* and *in vivo*, when it is expressed in combination with other kallikreins, supports this theory. Future studies should focus on the regulation mechanism of KLK7 and other kallikreins, as well as on their possible synergistic function.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ & ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσης διδακτορικής διατριβής έχουν ανακοινωθεί στα παρακάτω διεθνή επιστημονικά περιοδικά και ελληνικά ή διεθνή συνέδρα:

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Holzscheiter, L., Biermann, J.C., Kotzsch, M., **Prezas, P.**, Farthmann, J., Baretton, G., Luther, T., Tjan-Heijnen, V.C., Talieri, M., Schmitt, M., Sweep, F.C., Span, P.N. and Magdolen, V. (2006). "Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of KLK7 mRNA expression in breast cancer". *Clin Chem* 52(6): 1070-1079.
2. **Prezas, P.**, Arlt, M.J., Viktorov, P., Soosaipillai, A., Holzscheiter, L., Schmitt, M., Talieri, M., Diamandis, E.P., Krüger, A. and Magdolen, V. (2006). Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 387: 807-811.
3. **Prezas P.**, Scorilas A., Yfanti C., Yannopoulos A., Viktorov, P., Diamandis, E.P. and Talieri M. (2006). "The role of human tissue Kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies". In press, in *Biol Chem*.
4. **Prezas, P.**, Mathioudaki K., Papadokostopoulou A., Xynopoulos D., Arnogiannaki N., Scorilas A. and Talieri M. (2006). "Clinical Implication of KLK7 in colon cancer". Submitted in *Br J Cancer*.
5. **Prezas, P.**, Yfanti C., Scorilas A. and Talieri M. (2006). "KLK6 gene expression in intracranial tumors". Submitted in *Br J Cancer*.
6. **Prezas, P.**, Scorilas, A., and Talieri, M. "KLK5 and KLK7: correlation in breast cancer". In preparation.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ & ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Biermann J, Holzscheiter L, **Prezas P**, Farthman J, Kiechle M, Schmitt M, Magdolen V: "Development of Real Time-PCR-assays for uPA, PAI-1 and KLK7", Symposium de Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, Berlin, Germany, 2003.
2. **Prezas, P.**, and Magdolen, V. "Tumor-associated proteolytic systems: The serine protease family of human tissue kallikreins", 21st Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italy, 2004.
3. Debela, M., Friedrich, R., **Prezas, P.**, Schmitt, M., Bode, W. and Magdolen, V. "Cloning, expression, purification, refolding, and initial biochemical characterization of human tissue kallikreins". 21st Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italy, 2004
4. Viktorov, P., **Prezas, P.**, Schmitt, M., Krol, J. and Magdolen, V. "The human Tissue kallikrein family and its role in cancer: systematic generation of ovarian cancer cell lines overexpressing single kallikreins (hK3 to hK15)", 22nd Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italy, 2005.



5. Krol, J. Viktorov, P., **Prezas, P.**, Schmitt, M., and Magdolen, V. "The human tissue kallikrein family and its role in cancer: phenotypic changes induced in ovarian cancer cell lines overexpressing single kallikreins (hK3 to hK15)", Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, Munich, Germany, 2005.
6. **Prezas, P.**, Yfanti C., Yannopoulos A., Scorilas A., Talieri M.: "Expression and Clinical Evaluation of KLK6, KLK7 and KLK8 in Intracranial Tumors", 1st International Symposium on Kallikreins, Losanne, Switzerland, 2005.
7. **Prezas P.**, Mathioudaki K., Papadokostopoulou A., Xynopoulos D., Arnogiannaki N., Scorilas A., and Talieri M. "Clinical Implication of KLK7 in colon cancer", 4th General Meeting of the International Proteolysis Society associated with the International Conference on Protease Inhibitors, Quebec City, Canada, 2005.
8. Alexopoulou, D., **Prezas P.**, Scorilas A., Xynopoulos D., and Talieri M. "Significance and clinical evaluation of human kallikrein gene 6 (KLK6) mRNA expression in colon cancer". 23rd Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italy, 2006.
9. Holzscheiter L., Biermann J., Kotzsch, M., **Prezas P.**, Span, P., and Magdolen, V. "Development of a quantitative RT-PCR assay for detection of mRNA encoding full length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of KLK7 mRNA expression levels in breast cancer". 23rd Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italy, 2006.
10. **Prezas, P.**, Yfanti C., Scorilas A., Yannopoulos A., Schmitt M., and Talieri M.: Identification of new promising candidate biological markers for prognosis of intracranial tumors. 5th Conference of the German-Greek Academy for Biomedical Research, Athens, June 2006.
11. Magdolen, V., Viktorov, P., Holzscheiter L., Arlt, M., Soosaipillai, A., Talieri, M., Diamandis, E.P., Schmitt, M., Krüger, A. and **Prezas, P.** Effects of overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6 and 7 on the malignant phenotype of ovarian cancer cells. 18th International congress on Fibrinolysis and Proteolysis, San Diego, California, USA, August 2006.
12. **Prezas, P.** Scorilas A., Ardavanis, G., gennadios, G., and Talieri. M. Clinical significance and co-expression of KLK5 and KLK7 in breast cancer. 18th International congress on Fibrinolysis and Proteolysis, San Diego, California, USA, August 2006.

