

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- I. *Ιστορικό – Στόχοι*
 - II. *Απασχολούμενο Προσωπικό*
 - III. *Οικονομικά στοιχεία (1997-1999)*
Πληροφορίες
 - IV. *Εξοπλισμός του Εργαστηρίου (Ε) και του συνεργαζόμενου ΙΒΕΒ (Ι)*
 - V. *Παρεχόμενες Υπηρεσίες*
 1. *Μέτρηση υποδοχέων των στεροειδών με τη ραδιοχημική μέθοδο*
 2. *Ανοσοχημική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υποδοχέων*
 3. *Ανοσοϊστοχημική ανάλυση υποδοχέων (ΙΗΑ)*
 4. *RT-PCR ανάλυση του τύπου και των ισομορφών του ER.*
 5. *Έλεγχος της ευαισθησίας λευχαιμικών κυττάρων σε σύνθετα θεραπευτικά σχήματα*
 6. *Μέτρηση της ενεργότητας των υποδοχέων σε κύτταρα βιοψίας ex vivo*
 7. *Ανοσοχημική ποσοτική ανάλυση της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu*
 8. *Ανοσοχημική ποσοτική ανάλυση PTHrP (parathyroid hormone-related protein)*
- Βιβλιογραφία*

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

I. Ιστορικό – Στόχοι

Το Εργαστήριο Μέτρησης Ορμονικών Υποδοχέων του IBEB του ΕΙΕ ιδρύθηκε το 1981 για τη παροχή υπηρεσιών μέτρησης υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστίνων σε όγκους μαστού. Το εργαστήριο δραστηριοποιείται στην ανάπτυξη και διάδοση εξειδικευμένων διαγνωστικών μεθόδων κλινικής εφαρμογής μέσω της προσφοράς υπηρεσιών σε Δημόσιους και Ιδιωτικούς φορείς υγείας. Σε συνεργασία με δεκάδες ογκολογικές κλινικές, έχει πραγματοποιήσει κατά την περίοδο 1981-1999 περισσότερες από 18.000 αναλύσεις όγκων μαστού. Πρόσφατα χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ενίσχυσης εργαστηρίων παροχής υπηρεσιών ΑΕΙ, ΤΕΙ και δημοσίων ερευνητικών φορέων (ΕΠΕ II - Υποπρόγραμμα 3 - Μέτρο 3.1) για την ανανέωση και την επέκταση της υλικοτεχνικής του υποδομής με στόχους, την **παροχή υπηρεσιών μέτρησης υποδοχέων των στεροειδών σε νεοπλασίες και την ανάπτυξη νέων μεθόδων ανάλυσης του ορμονοεξάρτητου χαρακτήρα των νεοπλασιών**, ικανών να συμβάλλουν αποτελεσματικά στην ορθή επιλογή της θεραπείας και στην αξιόπιστη πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου. Η ανάπτυξη των εξειδικευμένων διαγνωστικών μεθόδων κλινικής εφαρμογής που χρησιμοποιεί το Εργαστήριο είναι προϊόν προσανατολισμένης έρευνας του Προγράμματος Μοριακής Ενδοκρινολογίας του IBEB. Το ερευνητικό προσωπικό του προγράμματος παρακολουθεί τις διεθνείς εξελίξεις σε σχέση με την διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού ώστε να διευρύνει τις υπηρεσίες που μπορεί να προσφέρει το Εργαστήριο.

Η **υλοποίηση των στόχων** του εργαστηρίου επιχειρείται με:

1. Πραγματοποίηση έρευνας στον τομέα της ανάπτυξης νέων διαγνωστικών μεθόδων και προϊόντων ανάλυσης του ορμονοεξάρτητου χαρακτήρα των νεοπλασιών.
2. Πραγματοποίηση κλινικοεργαστηριακών μελετών με συμμετοχή φορέων υγείας για την αξιολόγηση νέων θεραπευτικών και προγνωστικών καρκινικών δεικτών.
3. Δημιουργία βάσης δεδομένων σε θέματα διάγνωσης, πρόγνωσης και θεραπείας του καρκίνου του μαστού. Αναζήτηση, ταξινόμηση, αξιολόγηση και αξιοποίηση των βιβλιογραφικών δεδομένων, αξιολόγηση και αξιοποίηση των μετρήσεων καρκινικών δεικτών, δημοσιοποίηση μελετών.

II. Απασχολούμενο Προσωπικό

Ερευνητές	2
Συνεργαζόμενοι ερευνητές IBEB	5
Τεχνικό προσωπικό	5

III. Οικονομικά στοιχεία (1997-1999)

Έσοδα από εκτελούμενα ερευνητικά προγράμματα:	26,6 εκ. Δρχ.
Έσοδα από εκτελούμενα αναπτυξιακά προγράμματα:	40,0 εκ. Δρχ.
Συνολικός προϋπολογισμός εκτελούμενων προγραμμάτων:	85,1 εκ. Δρχ.
Έσοδα από παροχή υπηρεσιών:	14,6 εκ. Δρχ.

Πληροφορίες:

M.N. Αλέξης, Ph.D., Υπεύθυνος Προγράμματος Μοριακής Ενδοκρινολογίας IBEB/EIE
Βασ. Κων/νου 48, Αθήνα 116 35
Τηλ.: 7273 741, 7273 732, 7273 742 Fax: 7251 827 e-mail: mnalexis@eie.gr

Καθηγ. Κ.Ε. Σέκερης, Διευθυντής IBEB/EIE
Βασ. Κων/νου 48, Αθήνα 116 35
Τηλ.: 7273 767, 7273 727 Fax: 7251 827

IV. Εξοπλισμός του Εργαστηρίου (E) και του συνεργαζόμενου IBEB (I)

- Μετρητής β-ακτινοβολίας Wallac 1409 DSA (E) και Packard Tri-Carb 4530 (I)
- Μετρητής γ-ακτινοβολίας LKB 1275 Minigamma (I)
- Υπερφυγόκεντρος Beckman L8-M με κεφαλές VTI90, SW28, 80Ti, 50Ti, κ.ά. (I)
- Φυγόκεντροι, Beckman J2-21 (E) και TJ-6 (E), Jouan CR 4.12 (E) με κεφαλές ασφαλείας (E), και IEC Centra 4B (I).
- Ορθό μικροσκόπιο Zeiss Photomicroscope II εξοπλισμένο με CCD έγχρωμη κάμερα Sony SSC-C370P, οθόνη Sony 14'' και H/Y Pentium 200 με λογισμικό Image-Pro Plus (I).
- Ανάστροφο μικροσκόπιο Nikon Eclipse TE200 (E) εξοπλισμένο με σύστημα μικροέγχυσης κυττάρων Eppendorf Injectman/Femtojet (E).
- Μικροτόμος Euromex 540 (I).
- Πολωσίμετρο φθορισμού Panvera Beacon 2000 (I).
- Μετρητής φωταύγειας BioOrbit Galaxy 1258 Plate Reader (I).
- Φασματοφωτόμετρα, Hitachi U-2000 (I), και Cecil CE 1010 (E).
- Πυκνόμετρο σάρωσης ακτίνων λέιζερ Molecular Dynamics Personal Densitometer (I).
- Συσκευή PCR Perkin-Elmer Geneamp SYS2400 (E).
- Βαθιές καταψύξεις, Revco ULT985 (I), Quene QBF 1785V14 (I), και Nat Lab ProfiMaster (E).
- Κλίβανοι CO₂, Narco 5400 (E) και 5430 (I), Jouan IG150 (I), και Forma (I), και εστίες κάθετης νηματικής ροής, Holten HB2448 (I), και Flow Gelaire TC48 (I).
- Τροφοδοτικά, BIO-RAD 300 (E) και 200/2.0 (I), Pharmacia EPS 400/500 (I), και LKB 2297 MACRODRIVE (I), πλαισιωμένα από συσκευές ηλεκτροφόρησης BIO-RAD Mini Proteian II με Mini Trans blot (E), Subcell GT System (E), Hoefer SQ3 (I) κ.ά.

- Κονιορτοποιητής B.Braun Micro-dismembrator II (I), υποστηριζόμενος από συστήματα αποθήκευσης και παροχής υγρού αζώτου (I).

V. Παρεχόμενες Υπηρεσίες

1. Μέτρηση υποδοχέων των στεροειδών με τη ραδιοχημική μέθοδο

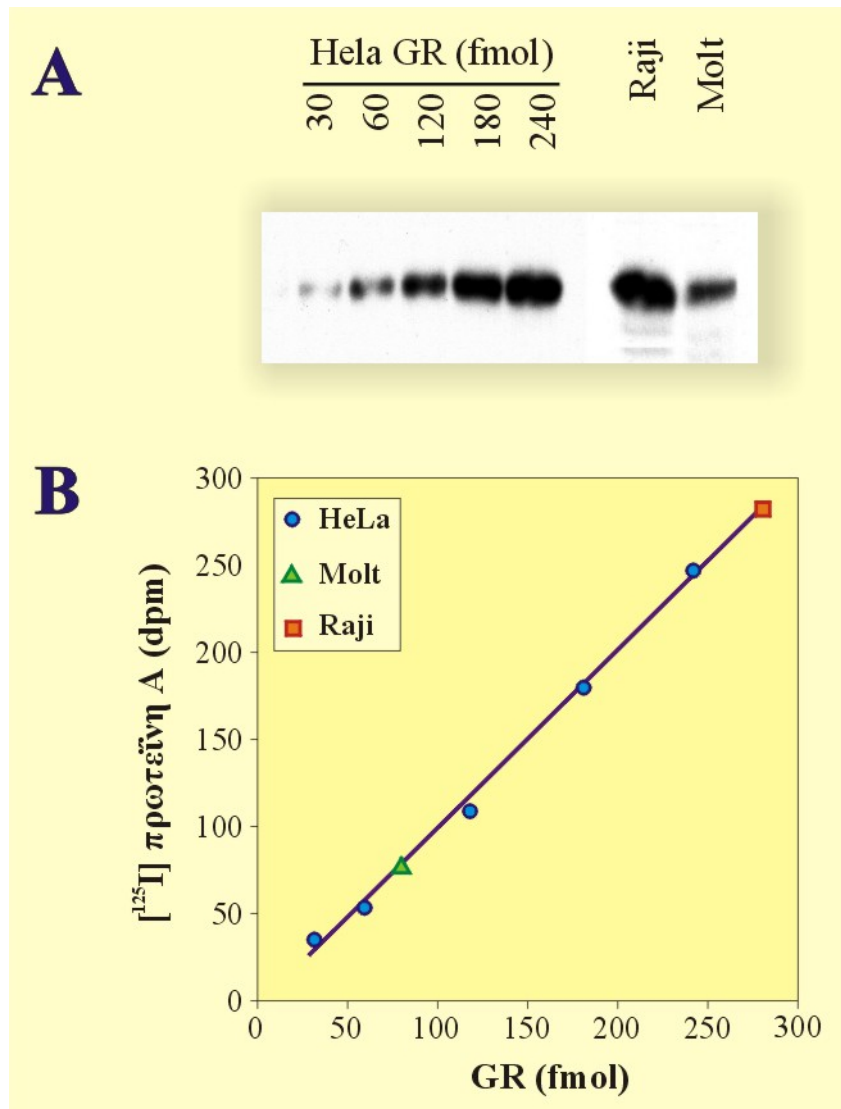
Συνθετικά ανάλογα ορμονικών στεροειδών χρησιμοποιούνται ευρέως στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού και του προστάτη, λευχαιμιών, λεμφωμάτων, κ.ά. Η παρουσία σημαντικού αριθμού υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστινών σε πρωτοπαθείς όγκους μαστού συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα πενταετούς διάρκειας ύφεσης μετεγχειρητικά, μετά από συμπληρωματικούς θεραπευτικούς ορμονικούς χειρισμούς. Επίσης συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης του όγκου σε ορμονικούς χειρισμούς μετά την υποτροπή. Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστινών μετρώνται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα (κυτοσόλιο) του ομογενοποιημένου όγκου κατά Scatchard, δηλ. με τη βοήθεια σειράς αραιώσεων ραδιοσημασμένου στεροειδούς. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται η περιοδική πιστοποίηση των μετρήσεων από συντονιστικό Ευρωπαϊκό φορέα (EORTC, Ευρωπαϊκός Οργανισμός Έρευνας και Θεραπείας του Καρκίνου) ¹. Οι όγκοι μαστού χαρακτηρίζονται ως ER+ και PR+ όταν η συγκέντρωση των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστινών, αντίστοιχα, ξεπερνά τα 10 fmol ανά mg πρωτεΐνης κυτοσολίου. Πρόσφατα διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός δευτέρου τύπου υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ1), ο οποίος εκφράζεται παράλληλα με τον ERα σε πολλούς ιστούς-στόχους της ορμόνης, μεταξύ των οποίων και το νεοπλαστικό μαστικό επιθήλιο. Οι ERα και ERβ1 εμφανίζονται σε πολλές ισομορφές ²⁻⁶. Η ραδιοχημική μέθοδος μετρά τις λειτουργικές ισομορφές, ενώ αποφεύγει να συμπεριλάβει ανενεργές ισομορφές ή άλλες, όπως π.χ. η ERβ2, με επικρατούσα κατασταλτική δράση επί των ERα και ERβ1 ⁵.

Στην περίπτωση της οξείας λεμφογενούς λευχαιμίας (ALL), για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιούνται άθικτα κύτταρα τα οποία επωάζονται με ραδιοσημασμένη τριαμσινολόνη σε συγκέντρωση 50 nM ⁷. Συγκεντρώσεις υποδοχέα μεγαλύτερες από 8000 μόρια ανά κύτταρο συνιστούν θετικό δείκτη πρόγνωσης της παιδικής ALL ⁸.

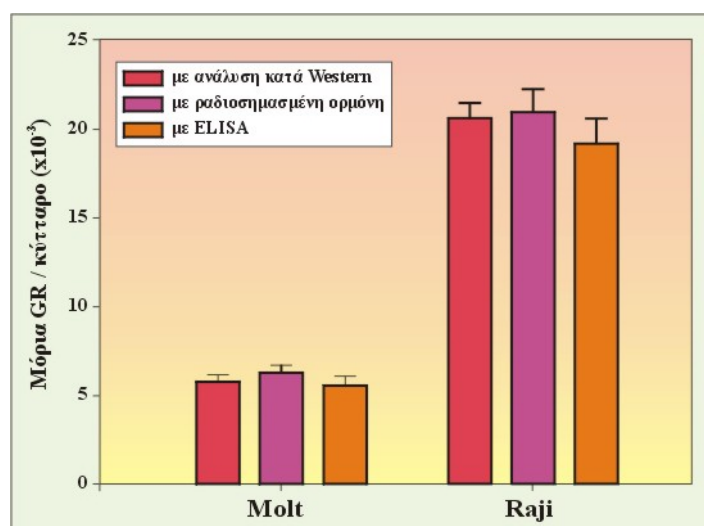
2. Ανοσοχημική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υποδοχέων

Το 1/3 περίπου των ER+ όγκων μαστού δεν ανταποκρίνεται σε ορμονοθεραπεία ⁹. Στην περίπτωση των όγκων ER+/PR+ το ποσοστό αυτό περιορίζεται σε 20%. Η μη ανταπόκριση του όγκου σε θεραπευτικούς ορμονικούς χειρισμούς συσχετίζεται με την έκφραση μεταλλαγμένων υποδοχέων (κυρίως ελλείψεων) ^{2, 3} ή με την έκφραση ισομορφών με επικρατούσα κατασταλτική δράση (π.χ. ERβ2) ⁵. Αντίστοιχα, πολλαπλά μυελώματα ανθεκτικά σε θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή εκφράζουν, παράλληλα με τον υποδοχέα άγριου τύπου, ελλείψεις της καρβοξυτελικής περιοχής του μορίου σε βαθμό μεγαλύτερο από ότι μυελώματα ευαίσθητα στα γλυκοκορτικοειδή ¹⁰. Η ποιοτική ανάλυση κατά Western είναι μοναδική στο να

αναδεικνύει την παρουσία ισομορφών και ελλείψεων των υποδοχέων¹¹. Η ποσοτική ανάλυση γίνεται επίσης κατά Western¹¹, με χρήση μονόκλωνου αντισώματος και πρωτεΐνης A σημασμένης με ¹²⁵I (Εικ. 1) ή με ELISA τύπου sandwich, με χρήση δύο αντισωμάτων κατά της αμινοτελικής περιοχής του υποδοχέα. Οι δύο μέθοδοι δίνουν το ίδιο αποτέλεσμα με τη ραδιοχημική μέθοδο στην περίπτωση υποδοχέα άγριου τύπου (Εικ. 2), διαφοροποιούνται όμως ως προς αυτήν στην περίπτωση μεταλλαγμένων υποδοχέων, ανίκανων να συνδέσουν ορμόνη. Οι υποδοχείς αυτοί συνήθως εμφανίζονται σε προηγμένα στάδια καρκίνου⁶ και ενδεχομένως συμβάλλουν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στην ταμοξιφαίνη¹².



Εικόνα 1: Ποσοτική ανοσοχημική ανάλυση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR) σε κύτταρα Molt (T λεμφοβλάστης ALL) και Raji (β λεμφοβλάστης λεμφώματος Burkitt) κατά Western (A), χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών άγριου τύπου από κύτταρα HeLa (αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας) ως σύστημα αναφοράς (B).



Εικόνα 2: Συγκριτική παρουσίαση αποτελεσμάτων μέτρησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε άθικτα κύτταρα Raji και Molt με τη ραδιοχημική μέθοδο και σε κυττόςολιο των κυττάρων με ανοσοχημική ανάλυση κατά Western ή με ELISA.

3. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση υποδοχέων (IHA)

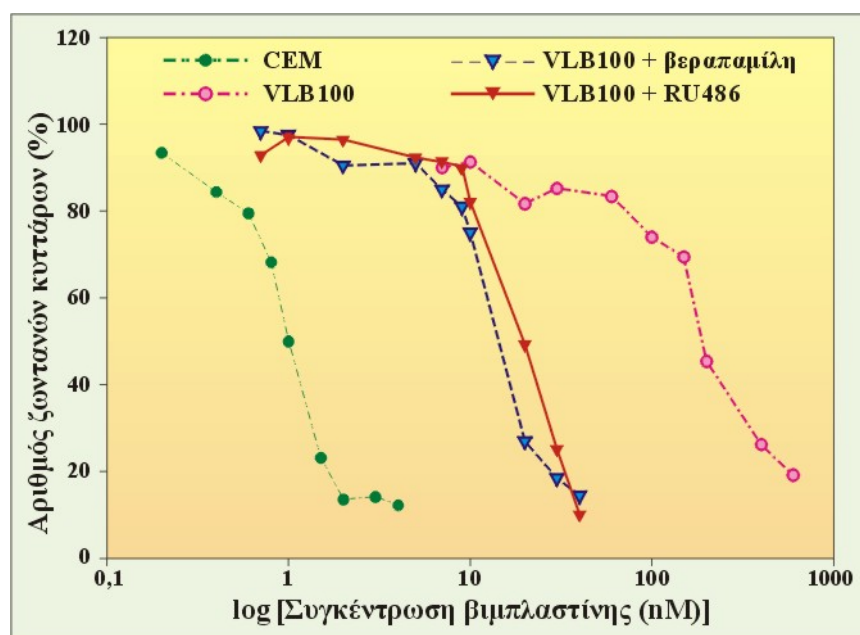
Η ανάπτυξη πρότυπων μεθόδων εκτίμησης της συγκέντρωσης του ER σε τομές όγκων μαστού από κρουτόμο (ICA) και η προσαρμογή της μεθόδου για τομές παραφίνης (IHA) ¹³ έγινε χρησιμοποιώντας αρχικά τη ραδιοχημική μέθοδο ως σημείο αναφοράς. Οι μέθοδοι ICA και IHA συχνά εκλαμβάνονται ως ισότιμες της ραδιοχημικής, παρά το ότι και οι δύο προσμετρούν ανενεργές μεταλλάξεις του ERα, ενώ αδυνατούν να ανιχνεύσουν τον υποδοχέα ERβ1, μεταβολές των επιπέδων του οποίου φαίνεται ότι συσχετίζονται με ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ταμοξифαίνη ¹². Η υποκειμενικότητα της εκτίμησης της χρώσης, η έλλειψη συμφωνίας ως προς τον τρόπο υπολογισμού του ορίου ER+ και η απουσία διεθνούς φορέα πιστοποίησης των μετρήσεων, θεωρούνται ως τα σοβαρότερα μειονεκτήματα της μεθόδου ¹⁵. Η άποψη μας είναι ότι η μέθοδος IHA μπορεί να γίνει αποδεκτή ως ισότιμη της ραδιοχημικής μεθόδου μόνο με σοβαρές επιφυλάξεις και ότι πρέπει να χρησιμοποιείται επικουρικά για την επιβεβαίωση της κατανομής του ERα, κυρίως μεταξύ των καρκινικών κυττάρων ενός όγκου που έχει χαρακτηριστεί ως ER+ με τη ραδιοχημική μέθοδο (αποκλεισμός ψευδώς θετικών περιπτώσεων ER+). Το Εργαστήριο αναπτύσσει IHAs για την εκτίμηση της κατανομής των ERβ1 και ERβ2, προκειμένου να ενισχύσει την αξιοπιστία της πρόγνωσης και αυτή της πρόβλεψης οφέλους από μια μακρόχρονη θεραπεία με ταμοξифαίνη, ελαχιστοποιώντας τα προβλήματα που συνοδεύουν τη θεραπεία αυτή. Είναι γνωστό ότι, μετά την υποτροπή, συχνά αναπτύσσεται με την πάροδο του χρόνου εξάρτηση του όγκου από την ταμοξифαίνη, σε βαθμό που η διακοπή της θεραπείας να οδηγεί ακόμα και σε συρρίκνωσή του ¹⁶. Η εξέλιξη αυτή συσχετίζεται με την αύξηση της έκφρασης του ERβ1 ¹² και με τις ιδιότητες αλληλεπίδρασης του με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 ¹⁷, κύριο διαμεσολαβητή της μιτογονικής δράσης οιστρογόνων και αυξητικών παραγόντων.

4. *RT-PCR ανάλυση του τύπου και των ισομορφών του ER.*

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των ER α , ER β 1 και ER β 2 και των λόγων έκφρασης ER β 1/ER α και ER β 2/ER β 1. Η αυξημένη έκφραση της ισομορφής β 2 ως προς β 1 συσχετίζεται με κακή πρόγνωση⁶, ενώ η αυξημένη έκφραση ER β 1 ως προς ER α συσχετίζεται με εμφάνιση ανθεκτικότητας στην ταμοξιφαίνη¹². Επισημαίνεται όμως ότι, τα σχετικά επίπεδα mRNA των ER α , ER β 1 και ER β 2 που προσδιορίζονται με RT-PCR ενδέχεται να διαφέρουν από αυτά των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Η μέθοδος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των μεταλλάξεων της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (συσχετίζεται με αντοχή του όγκου σε ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία), της ιδιοσυστατικής υπερέκφρασης του γονιδίου *mdr-1* (συσχετίζεται με αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά), και της μείωσης της έκφρασης του αντιμεταστατικού γονιδίου *nm23*. Η σημασία των δεικτών αυτών γίνεται κατανοητή αν λάβουμε υπ'όψιν ότι ακόμα και πρωτοπαθείς όγκοι του μαστού χωρίς λεμφοαδενικές μεταστάσεις εμφανίζουν υποτροπή σε ποσοστό ~30%, γεγονός που παραπέμπει σε χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, στην περίπτωση που οι ως άνω δείκτες συνηγορούν ότι τα αναμενόμενα οφέλη ξεπερνούν τα προβλήματα που συνεπάγεται η χορήγησή της.

5. *Έλεγχος της ευαισθησίας λευχαιμικών κυττάρων σε σύνθετα θεραπευτικά σχήματα*

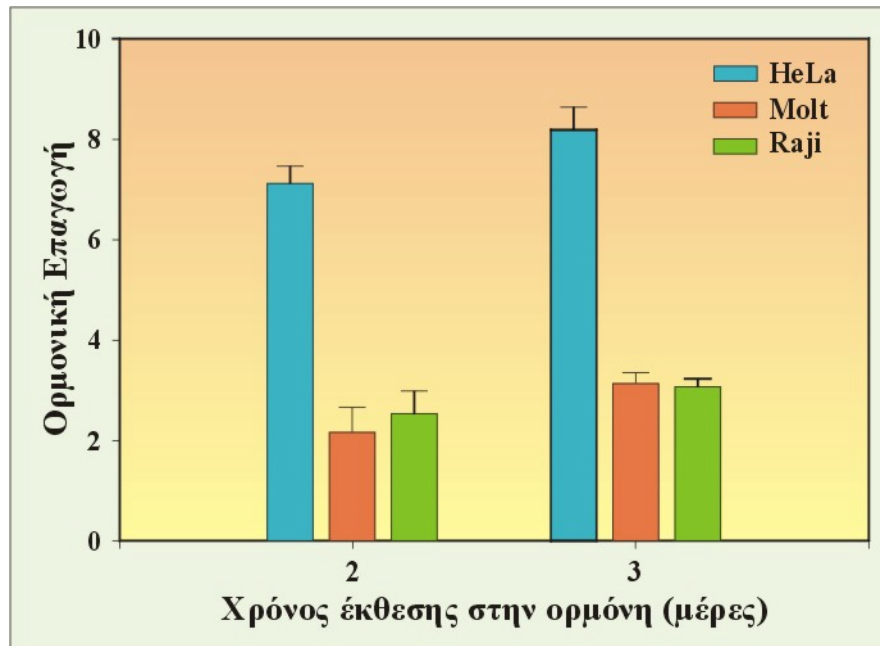
Γλυκοκορτικοειδή, όπως π.χ. η πρεδνιζολόνη, χορηγούνται συστηματικά μαζί με χημειοθεραπευτικά για τη θεραπεία της ALL⁸ και, με μικρότερη συχνότητα, για τη θεραπεία της οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας (AML). Ο μηχανισμός θεραπευτικής συνέργειας στεροειδών και χημειοθεραπευτικών δεν είναι κατανοητός. Κατά μίαν άποψη, η δραστηριότητα του στεροειδούς προσδιορίζεται από την ικανότητά του να εμποδίζει την λειτουργία της P-γλυκοπρωτεΐνης, προϊόντος έκφρασης του γονιδίου *mdr-1*¹⁸. Έχουμε διαπιστώσει ότι η αποκατάσταση της ευαισθησίας των λευχαιμικών λεμφοβλαστικών κυττάρων CEM/VLB100 στην βινμπλαστίνη που παρατηρείται παρουσία ορισμένων συνθετικών αναλόγων στεροειδών, μπορεί να είναι συγκρίσιμη ή/και να υπερβαίνει την αντίστοιχη ενεργότητα της βεραπαμίλης (Εικ. 3). Η άποψή μας είναι ότι απαιτούνται συστηματικές μετρήσεις της ευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων *ex vivo* σε σειρά συνδυασμών διαφορετικών στεροειδών και χημειοθεραπευτικών, προκειμένου να επιλεγεί ο περισσότερο αποτελεσματικός θεραπευτικός συνδυασμός για το κάθε καρκινικό φαινότυπο ξεχωριστά.



Εικόνα 3: Έλεγχος περιορισμού της αντοχής των λευχαιμικών κυττάρων VLB100 στην βιμπλαστίνη παρουσία του συνθετικού στεροειδούς RU486, ή της βεραπαμίλης. Απουσία του στεροειδούς τα κύτταρα VLB100 επιβιώνουν παρουσία 100 nM βιμπλαστίνης. Η συγκέντρωση αυτή είναι ~100 μεγαλύτερη αυτής που προκαλεί λύση των κυττάρων CEM ($LD_{50} = 1$ nM). Σημειώνεται ότι, αντίθετα από τα κύτταρα CEM, τα VLB100 υπερεκφράζουν την P-γλυκοπρωτεΐνη.

6. Μέτρηση της ενεργότητας των υποδοχέων σε κύτταρα βιοψίας *ex vivo*

Έλεγχος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας υποδοχέων των οιστρογόνων ^{2, 19} και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 ²⁰, πιστοποίησε την ύπαρξη μη λειτουργικών σημειακών μεταλλάξεων τους ως μία από τις κύριες αιτίες έλλειψης ευαισθησίας σε ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, αντίστοιχα. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων αυτών δεν είναι δυνατή με τις μεθόδους ανάλυσης των υποδοχέων που περιγράφονται παραπάνω, ενώ η λειτουργία των περισσότερων από αυτές παραμένει αδιευκρίνιστη. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος το εργαστήριο έχει αναπτύξει μέθοδο έλεγχου της λειτουργίας των μεταλλαγμένων υποδοχέων μέσω της διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων με κατάλληλο αδενοϊό, στο γονιδίωμα του οποίου έχει ενσωματωθεί το γονίδιο της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο ορμονοεξάρτητου ενισχυτή, γεγονός που επιτρέπει την επαγωγή του (εύκολα μετρήσιμου) ενζύμου από τον υποδοχέα παρουσία ορμόνης ²¹ (Εικ. 4). Επίσης, το εργαστήριο μεθοδεύει τον έλεγχο της ενεργότητας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 σε κύτταρα βιοψίας *ex vivo* με μικροέγχυση του χιμαιρικού γονιδίου p21-gal. Η p53 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου που κωδικεύει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p21^{Cip1} (βλ. Εικ. 5). Έτσι, η παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης (gal) και, κατ' αναλογία, η ποσότητα της παραγόμενης από το ένζυμο χρωστικής, καταλήγει να εξαρτάται από τη λειτουργικότητα της p53. Ο συγκεκριμένος έλεγχος δεν απαιτεί περισσότερα από 100 κύτταρα βιοψίας.



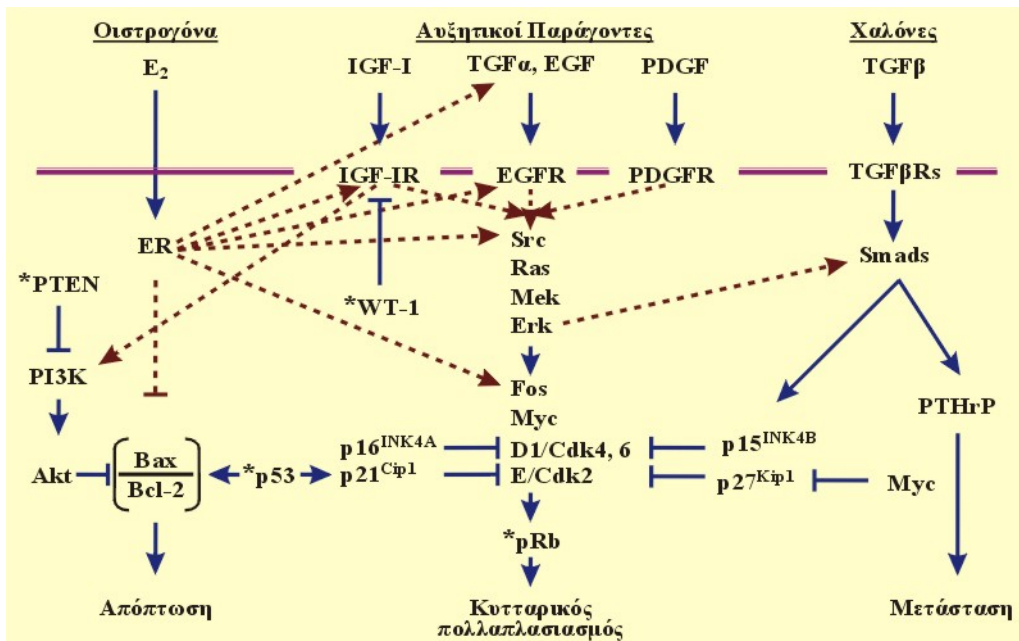
Εικόνα 4: Έλεγχος της λειτουργικότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε κύτταρα HeLa, Molt και Raji (περιέχουν 39.000, 6.000 και 19.000 μόρια υποδοχέα ανά κύτταρο, αντίστοιχα), μέσω της διαμόλυνσης τους με αδενοϊό που φέρει ενσωματωμένο το γονίδιο που κωδικεύει το ένζυμο λουσιφεράση, υπό τον έλεγχο ορμονοεξάρτητου ενισχυτή. Η σχετική ένταση επαγωγής του ενζύμου από τα γλυκοκορτικοειδή (ορμόνη) αντανακλά, μεταξύ άλλων, και την σχετική συγκέντρωση ή την ενεργότητα συμπαραγόντων που συνεργάζονται με τον υποδοχέα για την επαγωγή του ενζύμου.

7. Ανοσοχημική ποσοτική ανάλυση της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης HER-2/neu

Η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-erbB2 (HER-2/neu) σε βιοψίες πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα μη ανταπόκρισης της μεταστατικής νόσου σε ορμονοθεραπεία, καθώς και με μειωμένης διάρκειας ύφεση μετά την θεραπεία, ανεξάρτητα από τα επίπεδα ER και τη κατάσταση των λεμφαδένων κατά την αρχική διάγνωση²². Ανάλογες διαπιστώσεις έχουν γίνει σε σχέση με την πρόγνωση της διάρκειας της ύφεσης πρωτοεμφανιζόμενης νόσου μετά από συμπληρωματική ορμονοθεραπεία²³. Επομένως, η υπερέκφραση της c-erbB2 πρέπει να αξιολογείται ως δείκτης αντοχής του καρκίνου του μαστού σε θεραπεία με ταμοξιφαίνη. Η εκτίμηση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης σε βιοψίες μαστού με ανοσοϊσοχημικές μεθόδους είναι γνωστό ότι παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα²². Εναλλακτικά, προτείνεται η μέτρηση των επιπέδων του εξωκυττάριου τμήματος της c-erbB2 στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού²⁴. Αυξημένα επίπεδα του τμήματος αυτού στη κυκλοφορία συσχετίζονται με αρνητική πρόβλεψη ανταπόκρισης του μεταστατικού καρκίνου σε ορμονικούς χειρισμούς²⁵. Τα επίπεδα του εξωκυττάριου τμήματος στον ορό ή στο πλάσμα ασθενών σε μεταστατικό στάδιο, καθώς και της ογκοπρωτεΐνης c-erbB στο κυτοσόλιο όγκων μαστού, προσδιορίζονται με ELISA, ανάλογη αυτής που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των επιπέδων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

8. Ανοσοχημική ποσοτική ανάλυση PTHrP (parathyroid hormone-related protein)

Το 80% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού εμφανίζει μετάσταση στα οστά. Η χαλόνη TGFβ παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την ανάπτυξη των μεταστάσεων μέσω της επαγωγής PTHrP από τα καρκινικά κύτταρα ²⁶. Έχει διαπιστωθεί ότι, ενώ ο TGFβ εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου σε αρχικά στάδια, παύει να δρα κατασταλτικά σε μετέπειτα στάδια, εξέλιξη που έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση μεταλλάξεων ογκογονιδίων όπως π.χ. του Ras, τη συνακόλουθη ενεργοποίηση των κινασών Erk και την απενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων Smad, διαμεσολαβητών της δράσης του TGFβ (βλ. Εικ. 5). Η πρωτεΐνη PTHrP επάγει την οστεολυτική δράση των οστεοκλαστών και, μέσω της συνακόλουθης απελευθέρωσης αποθηκευμένων στο οστό αυξητικών παραγόντων (π.χ. TGFβ, IGF-I κ.ά.) που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των μεταστατικών κυττάρων, επιτείνει την οστεολυτική τους δράση. Σχετικά έχει δειχθεί ότι η παραγωγή PTHrP συσχετίζεται με την μεταστατική ικανότητα του πρωτοπαθούς καρκίνου ²⁷ και ότι αντισώματα που δεσμεύουν την PTHrP περιορίζουν την ικανότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων μαστού ²⁸. Τα επίπεδα PTHrP μετρώνται ανοσοραδιομετρικά στο πλάσμα με την βοήθεια δύο αντισωμάτων (ενός ραδιοσημασμένου και ενός σημασμένου με βιοτίνη) ²⁹.



Εικόνα 5: Τα οιστρογόνα εξασκούν μέσω των υποδοχών ERα και ERβ1 ισχυρή μιτογονική δράση στο φυσιολογικό μαστικό επιθήλιο και σε νεοπλασίες μαστού. Τα περισσότερα αντιοιστρογόνα περιορίζουν αλλά δεν καταστέλλουν πλήρως αυτή τη δράση ³⁰. Παρουσία οιστραδιόλης οι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων-στόχων τους (άμεση ορμονική ρύθμιση) ή με την κίνηση Src, η οποία στη συνέχεια μεταφέρει το μιτογονικό σήμα μέχρι τα γονίδια-στόχους (έμμεση ορμονική ρύθμιση). Η αλληλεπίδραση ERα με τη κινάση Src προκαλεί ενεργοποίηση της αλληλουχίας των κινασών Src-Ras/Raf-Mek-Erk, με συνέπεια τη φωσφορυλίωση και τη παραπέρα ενεργοποίηση του υποδοχέα. Οι υποδοχείς χρησιμοποιούνται επίσης, ακόμη και απουσία ορμόνης, για τη διαβίβαση του μιτογονικού σήματος ορισμένων αυξητικών παραγόντων (π.χ. EGF) (μη ορμονική ρύθμιση). Η έκφραση κάποιων παραγόντων (TGFα) και των υποδοχών τους (EGFR, IGF-IR) προάγεται από τα οιστρογόνα. Αντίθετα η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη WT-1 περιορίζει την έκφραση του IGF-IR. Μεταξύ των στόχων των

οιστρογόνων περιλαμβάνονται γονίδια, των οποίων η επαγωγή είναι απαραίτητη, τόσο για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο (*c-fos*, *jun-B* and *c-myc*), όσο και για την προαγωγή μέχρι τη φάση S του κύκλου (κυκλίνη D1). Η επαγωγή της κυκλίνης D1 ενεργοποιεί τις κινάσες *cdk2* και *cdk6* ώστε να αδρανοποιούν με φωσφορύλιωση την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRb, γεγονός που επιτρέπει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Απάλειψη ή μεταλλάξεις της pRb, ιδιοσυστατική υπερέκφραση *Myc*, κυκλίνης D1 και χαμηλά επίπεδα p16, p27 και TGFβ, ενισχύουν το πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων από τα οιστρογόνα.

Είναι αξιοσημείωτο ότι πολλοί όγκοι μαστού χαρακτηρίζονται από ιδιοσυστατικά αυξημένη ποσότητα ή/και ενεργότητα των *Src* και *Ras*. Επίσης έχει διαπιστωθεί υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης *c-erbB2* (μέλος της οικογένειας των EGFR) σε 10-40% των ER+ όγκων. Η αυξημένη έκφραση ή ενεργότητα των *c-erbB2*, *Src* και *Ras*, συσχετίζεται με μη επίτευξη ύφεσης και επίσπευση της υποτροπής σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με ταμοξифαίνη μετά την επανεμφάνιση της νόσου. Καρκινικά κύτταρα μαστού που έχουν διαμολυνθεί με ενεργοποιημένο *Ras* παράγουν μεγάλες ποσότητες των αυξητικών παραγόντων TGFα, TGFβ και IGF-I. Αυτοί, απουσία οιστραδιόλης, επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε επίπεδα που παρατηρούνται παρουσία της. Παράλληλα, ο IGF-I ενεργοποιεί την PI3K, και μέσω αυτής τη κινάση Akt, εμποδίζοντας έτσι την απόπτωση (βλ. παρακάτω). Η ενεργοποίηση της Akt ελέγχεται αρνητικά από την φωσφατάση της 3-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης, προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, μεταλλάξεις του οποίου προδιαθέτουν για καρκίνο του μαστού. Η εγκατάσταση και η ανάπτυξη μεταστάσεων στα οστά προάγεται από τον TGFβ μέσω της επαγωγής PTHrP.

Το ~50% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού χαρακτηρίζονται ως ER- σε πρώτη διάγνωση. Η συμπληρωματική μετεγχειρητική θεραπεία των περιπτώσεων αυτών επιδιώκει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων με ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία. Η επαγωγή απόπτωσης προάγεται από την πρωτεΐνη *Bax* και καταστέλλεται από την *Bcl-2*, η έκφραση των οποίων ελέγχεται θετικά και αρνητικά, αντίστοιχα, από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Μεταλλαγές της p53 σχετίζονται με αντοχή του καρκίνου σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. (* κρίσιμες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες).

Ευχαριστούμε τους συνεργάτες μας στο ΕΙΕ, Α. Μπακή, Δ. Συριάνη και Ι. Φλωρεντίν για την συμβολή τους στις εργασίες που περιγράφονται παραπάνω.

Βιβλιογραφία

1. Sweep CG, Geurts-Moespot J. EORTC external quality assurance program for ER and PgR measurements: trial 1998/1999. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Biol Markers* (2000) 15:62-69
2. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Coutts A, Watson P. The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* (1998) 65:175-180
3. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lupu R. Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res* (1998) 58:210-214
4. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliever SA, Lehmann JM, Willson TM. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 247:75-78
5. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* (1998) 26:3505-3512
6. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor beta1, beta2, and beta5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res* (1999) 59:1175-1179
7. Mitsiou DJ, Alexis MN. Temporary loss of glucocorticoid receptor-mediated regulation of gene expression in heat-shocked cells. *FEBS Lett* (1995) 362:309-315

8. Kato GJ, Quddus FF, Shuster JJ, Boyett J, Pullen JD, Borowitz MJ, Whitehead VM, Crist WM, Leventhal BG. High glucocorticoid receptor content of leukemic blasts is a favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (1993) 82:2304-2309
9. McGuire WL, Carbone PP, Vollmar EP, Eds. *Estrogen receptors in human breast cancer*. New York. Raven Press, 1975.
10. Moalli PA, Pillay S, Weiner D, Leikin R, Rosen ST. A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. *Blood* (1992) 79:213-222
11. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res* (1999) 59:5425-5428
12. Speirs V, Malone C, Walton DS, Kerin MJ, Atkin SL. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res* (1999) 59:5421-5424
13. Miller RT, Hapke MR, Greene GL. Immunocytochemical assay for estrogen receptor with monoclonal antibody D753P gamma in routinely processed formaldehyde-fixed breast tissue. Comparison with frozen section assay and with monoclonal antibody H222. *Cancer* (1993) 71:3541-3546
14. Alberts SR, Ingle JN, Roche PR, Cha SS, Wold LE, Farr GH Jr, Krook JE, Wieand HS. Comparison of estrogen receptor determinations by a biochemical ligand-binding assay and immunohistochemical staining with monoclonal antibody ER1D5 in females with lymph node positive breast carcinoma entered on two prospective clinical trials. *Cancer* (1996) 8:764-772
15. Barnes DM, Millis RR, Beex LV, Thorpe SM, Leake RE. Increased use of immunohistochemistry for oestrogen receptor measurement in mammary carcinoma: the need for quality assurance. *Eur J Cancer* (1998) 34:1677-1682
16. Howell A, Dodwell DJ, Anderson H, Redford J. Response after withdrawal of tamoxifen and progestogens in advanced breast cancer. *Ann Oncol* (1992) 3:611-617
17. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* (1997) 277:1508-1510
18. Gruol DJ, Bourgeois S. Chemosensitizing steroids: glucocorticoid receptor agonists capable of inhibiting P-glycoprotein function. *Cancer Res* (1997) 57:720-727
19. Levenson AS, Jordan VC. The key to the antiestrogenic mechanism of raloxifene is amino acid 351 (aspartate) in the estrogen receptor. *Cancer Res* (1998) 58:1872-1875
20. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* (1991) 253:49-53
21. McPhaul MJ, Deslypere JP, Allman DR, Gerard RD. The adenovirus-mediated delivery of a reporter gene permits the assessment of androgen receptor function in genital skin fibroblast cultures. *J Biol Chem* (1993) 268:26063-26066
22. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* (1999) 79:1220-1226
23. Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* (1998) 16:462-469
24. Leitzel K, Teramoto Y, Sampson E, Mauceri J, Langton BC, Demers L, Podczaski E, Harvey H, Shambaugh S, Volas G, et al. Elevated soluble c-erbB-2 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. *J Clin Oncol* (1992) 10:1436-1443
25. Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hosch S, Hayes DF. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* (1997) 15:2518-2525

26. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* (1999) 103:197-206
27. Bundred NJ, Ratcliffe WA, Walker RA, Coley S, Morrison JM, Ratcliffe JG. Parathyroid hormone related protein and hypercalcaemia in breast cancer. *BMJ* (1991) 303:1506-1509
28. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, Yoneda T, Mundy GR. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* (1996) 98:1544-1549
29. Pandian MR, Morgan CH, Carlton E, Segre GV. Modified immunoradiometric assay of parathyroid hormone-related protein: clinical application in the differential diagnosis of hypercalcemia. *Clin Chem* (1992) 38:282-288
30. Alexis MN, Siriani D, Sekeris CE. The molecular basis of breast cancer prevention and treatment: The role of tissue-specific antiestrogens. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics* (2000) 14: 5-14