

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ**

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ERK2 ΚΑΙ
ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ETS-1 ΚΑΙ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ STAT-1 ΣΕ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ
ΜΑΣΤΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΕΤΡΟΣ Ι. ΡΑΦΑΗΛΙΔΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ-ΕΝΤΑΤΙΚΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2014

<u>Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής:</u>	1-6-2005
<u>Ορισμός τριμελούς Επιτροπής:</u>	23-6-2005
<u>Μέλη τριμελούς Επιτροπής:</u>	Λ. Νακοπούλου Π. Κορκολοπούλου Α. Λάζαρης
<u>Ημερομηνία ορισμού θέματος:</u>	19-1-2006
<u>Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής</u>	26-7-2013
<u>Ορισμός επταμελούς Επιτροπής:</u>	14-1-2014
<u>Μέλη επταμελούς Επιτροπής:</u>	Λ. Νακοπούλου Ε. Πατσούρης Γ. Ζωγράφος Σ. Ντουράκης Π. Κορκολοπούλου Α. Λάζαρης Α. Νόννη Α.Μ. Δημόπουλος
<u>Πρόεδρος Ιατρικού Τμήματος</u> :	
<u>Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή:</u>	Άριστα

"Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα"

(Νόμος 5543/1932, άρθρον 202, παράγραφος 2)

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ
ΚΕΙΜΕΝΟ**

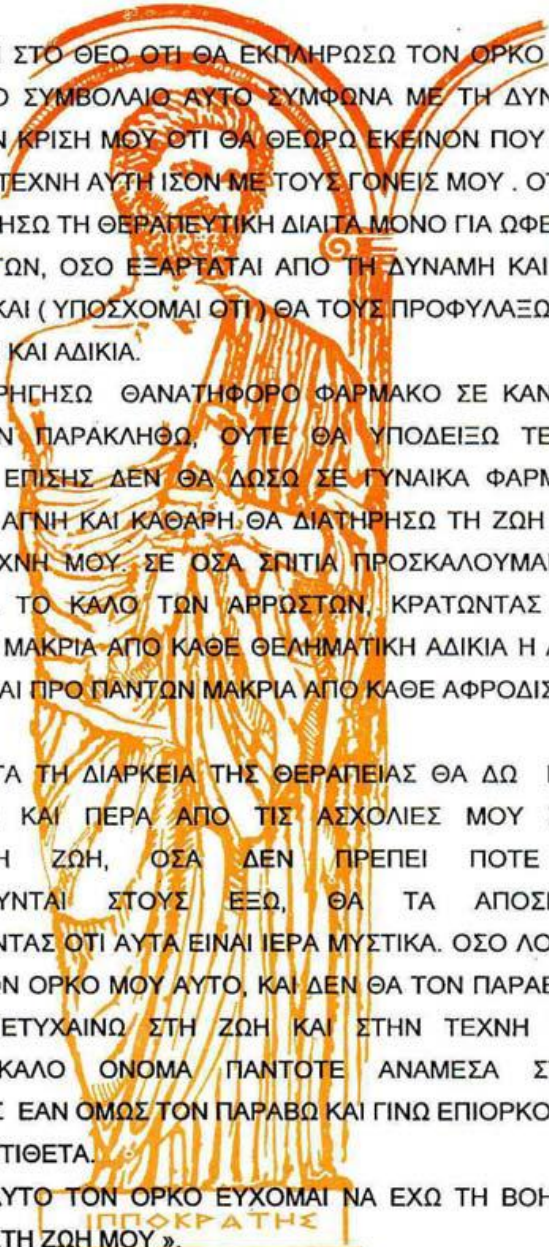


« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ



« ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ . ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ, ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ. ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ .

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ».

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	
A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	26
A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ	26
A.3. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	27
A.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	28
A.5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	30
A.6. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	32
A.7. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	37
A.8. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	41
B. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΜΙΤΟΓΟΝΑ	65
B.1. ΚΙΝΑΣΕΣ ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ	67
B.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ERK ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ	76
B.3. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ERK ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ	81
B.4. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ERK ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	86
Γ. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	95
Γ.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ETS ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	96
Γ.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ETS1	98
Γ.3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ETS ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	99
Γ.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ETS ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ	101
Γ.5. ΑΠΟ ΤΙΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ETS	103
Γ.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ETS-1 ΣΤΗΝ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟ STRESS	111
Γ.7. ETS-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	112
Δ. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ STATs	125
Δ.1. ΤΟ JAK-STAT ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ	126
Δ.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΙΑ STAT	128
Δ.3. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ STAT-1	129

Δ.3.1. Δομή της STAT-1	130
Δ.3.2. Βιολογία της STAT-1	133
Δ.4. IFN-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΜΗΝΥΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	134
Δ.4.1. Ρόλοι της STAT-1 στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	134
Δ.4.2. Ρόλοι της STAT-1 στη μηνυματοδότηση ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες	136
Δ.4.3. STAT-1 και διασταυρωτή σηματοδότηση	137
Δ.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ STAT-1 ΜΗΝΥΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ	138
Δ.5.1. Θετική ρύθμιση της STAT-1 μηνυματοδότησης	138
Δ.5.2. Αρνητική ρύθμιση της STAT-1 μηνυματοδότησης	141
Δ.5.3. Αλληλεπίδραση της STAT-1 με ρυθμιστικές πρωτεΐνες	143
Δ.5.4. Τερματισμός της STAT-1-εξαρτώμενης μηνυματοδότησης	144
Δ.5.5. Διασταυρωτή ρύθμιση μέσω άλλων STAT	145
Δ.6. STAT-1 και καρκίνος	146
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	153
I. ΣΚΟΠΟΣ	154
II. ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	154
III. ΜΕΘΟΔΟΙ	155
IIIΑ. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	155
IIIΒ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	160
IV. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	161
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	163
A. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ERK2 ΣΤΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	163
B. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ETS-1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	170
Γ. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ pSTAT-1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	176
VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	182
VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	189
VIII. ABSTRACT	192
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	194

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες θανάτου στις γυναίκες. Πρόκειται για μια εξαιρετικά ετερογενή από βιολογικής πλευράς νόσο. Δυστυχώς ακόμη και σήμερα και παρά την πλειάδα κλασσικών και νεότερων προγνωστικών δεικτών δεν μπορεί να γίνει με πλήρη επιτυχία πρόγνωση της πορείας της νόσου. Είναι κατανοητή λοιπόν η εντατική έρευνα που γίνεται όσον αφορά την πληρέστερη συγκρότηση προγνωστικών παραγόντων για την ασθένεια αυτή. Μεταξύ των παραγόντων αυτών ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τις κινάσες, ένζυμα που φωσφορυλιώνουν άλλες ουσίες και έχουν ρόλο τόσο στην φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων όσο και στην καρκινογένεση όταν είναι ανεξέλεγκτη η ενεργοποίησή τους.

Επιλέξαμε να μελετήσουμε την έκφραση της ERK2 κινάσης και των στόχων της, ETS-1 και φωσφορυλιωμένης STAT-1 πρωτεΐνης λόγω της απουσίας δεδομένων αναφορικά με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων αυτών σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο μαστού.

Η ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 2) είναι μια κινάση που ανήκει στο σύστημα των κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases). Οι MAPK βρίσκονται ενδοκυττάρια στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούνται μετά από διέγερση υποδοχέων (υποδοχέων τύπου τυροσινικής κινάσης, υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνη, ιντεγκρινών και διαύλων ασβεστίου) από εξωγενή ερεθίσματα. Μετά την ενεργοποίησή τους προκαλούν φωσφορυλίωση διαφόρων ουσιών είτε στον πυρήνα είτε στο κυτταρόπλασμα. Οι MAPK φωσφορυλιώνουν σερίνες και θρεονίνες πρωτεϊνών στόχων και ρυθμίζουν έτσι κυτταρικές δραστηριότητες όπως γονιδιακή έκφραση, μίτωση, κίνηση, μεταβολισμό και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Στους στόχους της ERK2 μέσω της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων ανήκει η ETS-1 πρωτεΐνη και η STAT-1 πρωτεΐνη.

Η ETS-1 πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων η οποία παίζει κύριο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και ογκογένεση. Οι ets πρωτεΐνες προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους και ενεργοποιούν την μεταγραφή τους. Οι προσδένουσες την ets περιοχή βρίσκονται μέσα στους υποκινητές αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεάσες όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος MMP-1, -2, -3, -7, -9, όπως επίσης ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης και του υποδοχέα του. Σήμερα περίπου 30 μέλη της οικογένειας ETS έχουν ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά, τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες του πυρήνα ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση. Όλες αυτές οι πρωτεάσες είναι απαραίτητες για την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που απαιτείται για την διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου ETS-1 έχει τεκμηριωθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου όπου συνήθως συσχετίζεται με την ικανότητα διήθησης και μετάστασης. Στον καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση αρκετών γονιδίων ets

συμπεριλαμβανομένου του ETS-1 έχει αναφερθεί και συσχετισθεί με την έκφραση ποικίλων μεταλλοπρωτεΐναιών.

Η pSTAT-1 πρωτεΐνη (pSTAT-1 μεταγραφικός παράγοντας) ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών STAT (Signal transduction and activation of transcription) που αποτελούν οικογένεια μεταγωγέων μηνύματος και ενεργοποιητών της μεταγραφής που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Για να ενεργοποιηθούν και να δράσουν απαιτείται η φωσφορυλίωση τους. Στα γονίδια-στόχους του μεταγραφικού παράγοντα ETS-1 ανήκει και το γονίδιο της πρωτεΐνης STAT-1.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της κινάσης ERK2 και των στόχων της, ETS-1 και φωσφορυλιωμένης STAT-1 πρωτεΐνης σε αρχειακό υλικό τομών παραφίνης από διηθητικά καρκινώματα μαστού και η συσχέτιση αυτών με: 1) κλασικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (μέγεθος όγκου, βαθμός κακοηθείας, στάδιο της νόσου, έκφραση οιστρογονικών-προγεστερονικών υποδοχέων) και 2) την επιβίωση των ασθενών, ολική και ελεύθερη νόσου. Οι πληροφορίες αυτές είναι συγκεντρωμένες σε βάση δεδομένων και προέρχονται από προηγούμενες πειραματικές μελέτες του εργαστηρίου για τις ίδιες περιπτώσεις καρκινωμάτων. Με τον τρόπο αυτό γίνεται προσπάθεια εξαγωγής συμπερασμάτων για τον ρόλο της έκφρασης της κινάσης ERK2, της πρωτεΐνης ETS-1 και της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης STAT-1 στην εξέλιξη και την πρόγνωση των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού.

Η εκπόνηση της μελέτης έγινε στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια κα Λυδία Νακοπούλου για την εποπτεία και επιστημονική καθοδήγηση καθώς και τη μετάγγιση ερευνητικής γνώσης καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα Πηνελόπη Κορκολοπούλου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Ανδρέα Λάζαρη, μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Παρακολούθησης της διδακτορικής διατριβής. Επιπλέον, οφείλω θερμές ευχαριστίες στην κα Άννα Γιαννοπούλου για συμβουλές τόσο κατά την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους όσο και για σχόλια όσον αφορά το γενικό και ειδικό μέρος και στην κα Ειρήνη Θεοχάρη για σχόλια όσον αφορά το γενικό και ειδικό μέρος κατά την συγγραφή .

Φθάνοντας στο τέλος αυτής της προσπάθειας, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τους γονείς μου. Χωρίς τις θυσίες που έκαναν και κάνουν, τίποτα δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Εργασιακή εμπειρία

1.10.2012-σήμερα: Συνεργάτης Παθολόγος και Ιατρός Αιματολογικής Κλινικής, Ιατρικού Κέντρου Αθηνών.

19.12.2011-30.09.2012: Αναπληρωτής Διευθυντής Παθολόγος στο Λοιμωξιολογικό Ιατρείο του Νοσοκομείου Ερρίκος Ντυνάν, Αθήνα.

2.03.2006- 18.12.2011: Επιμελητής Α' Παθολόγος στο Λοιμωξιολογικό Ιατρείο του Νοσοκομείου Ερρίκος Ντυνάν, Αθήνα.

14.11.2003-13.11.2005: Εξειδικευόμενος στην Εντατική Θεραπεία στην Β' ΜΕΘ του Νοσοκομείου ΚΑΤ, Αθήνα.

1.11.2002-05.11.2003: Ειδικευμένος Παθολόγος, εξωτερικός συνεργάτης Λοιμωξιολογικού Ιατρείου Νοσοκομείου Ερρίκος Ντυνάν, Αθήνα.

3.12.1998 – 23.5.2002: Ειδικευόμενος στην Παθολογία στην Β' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Ιπποκράτειο Αθηνών.

10.06.1997-20.11.1998: Ειδικευόμενος στην Παιδιατρική και στην Παθολογία στα νοσοκομεία Royal Children's Hospital και Royal Infirmary of Edinburgh της Μεγάλης Βρετανίας, με υποτροφία του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

15.03.1995-15.12.1996: Ιατρός (Στρατεύσιμος Κελευστής) Πολεμικού Ναυτικού στο Ναυτικό Νοσοκομείο Κρήτης και στο Θεραπευτήριο του Κέντρου Εκπαίδευσης Παλάσκας, Σκαρμαγκάς.

23.11.1993-23.12.1994: Ιατρός υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στα Λουτρά Ηραίας, Νομού Αρκαδίας.

Πτυχία-Διακρίσεις-Υποτροφίες-Εκπαίδευση

25.03.2014: Δίπλωμα Specialty Certificate in Geriatric Medicine (Federation Royal Colleges of Physicians, United Kingdom and British Geriatrics Society).

05.02.2014: Υποβολή κεφαλαίου "Pseudomonas and related Gram-negative bacillary infections" στο βιβλίο Παθολογίας Goldman's Cecil Medicine, 25^η έκδοση.

12.12.2013: Δίπλωμα Specialty Certificate in Acute Medicine (Federation Royal Colleges of Physicians, United Kingdom and Society for Acute Medicine).

12.09.2012: Δίπλωμα Specialty Certificate in Infectious Diseases (Federation Royal Colleges of Physicians, United Kingdom and British Infection Association).

19.02.2009: Μοναδική σωστή επίλυση διαγνωστικού γρίφου που δημοσιεύθηκε στο British Medical Journal για την οποία δέχθηκα συγχαρητήρια (BMJ 2009;338:b1012).

02.03.2006: Τίτλος Εξειδίκευσης στην Εντατική Θεραπεία κατόπιν εξετάσεων.

02.11.2004: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης <<Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική>> με βαθμό άριστα, του Διατμηματικού Προγράμματος Σπουδών του τμήματος Βιολογίας και της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών επιλέγηκα κατόπιν εξετάσεων ενώ έλαβα υποτροφία για όλα τα εξάμηνα σπουδών.

01.04.2003: Δίπλωμα Member of the Royal Colleges of Physicians of the United Kingdom κατόπιν εξετάσεων (Μέλος των Κολλεγίων των Παθολόγων της Μεγάλης Βρετανίας).

30.10.2002: Τίτλος Ειδικότητας στην Παθολογία κατόπιν εξετάσεων.

22.09.1993: Μόνιμο Πιστοποιητικό της Educational Commission for Foreign Medical Graduates, USA (απαραίτητη πιστοποίηση για συμμετοχή σε πρόγραμμα ιατρικών ειδικοτήτων στις Η.Π.Α) με την *πρώτη προσπάθεια και ταυτόχρονα* στα δύο steps κατόπιν συμμετοχής στις εξετάσεις United States Medical Licencing Examination.

18.09.1986-9.03.1993: Πτυχίο Ιατρικής με Τιμητική Διάκριση ως πρωτεύσας πτυχιούχος του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών κατά το έτος 1992-1993. Υποτροφία ως πρωτεύσας πτυχιούχος και υποτροφίες του ΙΚΥ κατά το 2^ο, 3^ο και 5^ο έτος των σπουδών.

1980-1986: Απολυτήριο Γυμνασίου και Γενικού Λυκείου Άστρους, Νομού Αρκαδίας με αριστεία και βραβεία προόδου σε όλες τις τάξεις.

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά: Lower Certificate of the English Language (1986) TOEFL: score 633 (1996), Γερμανικά: Grosses Deutsches Sprachdiplom (1996)

Δεξιότητες: Χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. **Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμος με δύο παιδιά.

Ανακοινώσεις σχετιζόμενες με την διδακτορική διατριβή

- 1. Ραφαηλίδης Π,** Κορκολοπούλου Π, Αλεξάνδρου Π, Γιαννοπούλου Ι, Μαρνερίδης Α, Μαρκάκη Σ, Κεραμόπουλος Α, Νακοπούλου Λ. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της πρωτεϊνικής κίνησης ERK-2 στον καρκίνο του μαστού. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής* 2004, 18:212.
- 2. Rafailidis P,** Mylona E, Alexandrou P, Pavlakis K, Giannopoulou I, Athanassiadou S, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L. Study of the topographic distribution of ETS-1 protein expression in invasive breast carcinomas in relation to their biological behavior. Abstracts of the Seventh International Conference of Anticancer research. *Anticancer Research*, Vol 24, Number 5D, September-October 2004, p.3597.

3. Fytou A, Mylona E, **Rafailidis P**, Giannopoulou I, Theohari I, Nomikos A, Nakopoulou L. Evaluation of expression pattern of phosphorylated protein STAT-1 in invasive breast carcinomas in relation to their biological behavior (Poster Presentation). XXVIIth International Congress of the International Academy of Pathology, Athens, Greece, October 12-17, 2008. *Histopathology* 53 (Suppl. 1):38, 2008.

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά σχετιζόμενες με την διδακτορική διατριβή

1. Nakopoulou L, Mylona E, **Rafailidis P**, Alexandrou P, Giannopoulou I, Keramopoulos A. Effect of different ERK2 localizations on prognosis of patients with invasive breast carcinoma. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2005;113:693-701.
2. Mylona EE, Alexandrou PT, Giannopoulou IA, **Rafailidis PI**, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou LL. Study of the topographic distribution of ETS-1 protein expression in invasive breast carcinomas in relation to tumor phenotype. *Cancer Detection and Prevention* 2006;30(2):111-7.
3. Magkou C, Fytou A, Giannopoulou I, Nomikos A, **Rafailidis P**, Theohari I, Papadimitriou C, Nakopoulou L. Expression of STAT-1 in breast cancer: relation with hormonal status and its prognostic significance. *Histopathology* 2012;60(7):1125-32

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά μη σχετιζόμενες με την διδακτορική διατριβή

1. Sevastos N, **Rafailidis P**, Kolokotronis K, Papadimitriou K, Papatheodoridis GV. Primary aortojejunal fistula due to foreign body: a rare cause of gastrointestinal bleeding. *European Journal of Gastroenterology Hepatology* 2002;14(7):797-800.
2. Sevastos NS, **Rafailidis PI**, Katoulis AC, Kolokotronis KG, Stavrianeas NG. Livedo reticularis associated with pernicious anemia. *Clinical and Experimental Dermatology* 2003;28:452-3.
3. Kasiakou SK, **Rafailidis PI**, Rosmarakis ES, Falagas ME. Recurrent omphalitis in the adults. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2004;39:1021-1024.
4. **Rafailidis PI**, Prappas SN, Kasiakou SK, Costeas XF, Falagas ME. Effusive-constrictive calcific pericarditis associated with *Streptococcus salivarius*: case report and review of the literature. *Cardiology in Review* 2005;13:113-117.

5. Kasiakou SK, **Rafailidis PI**, Liaropoulos K, Falagas ME. Cure of post-traumatic recurrent multiresistant Gram-negative rod meningitis with intraventricular colistin. *Journal of Infection* 2005;50:348-352.
6. Rosmarakis ES, Kapaskelis AM, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Association between Wegener's granulomatosis and increased antithyroid antibodies: Report of two cases and review of the literature. *International Journal of Clinical Practice* 2005;59:373-375.
7. Bliziotis I, **Rafailidis PI**, Vergidis P, Falagas ME. Regression of subcorneal pustular dermatosis lesions with azithromycin. *Journal of Infection* 2005;51:E31-34.
8. Sevastos N, Savvas SP, **Rafailidis PI**, Manesis EK. Transient biochemical cholestasis in patients with acute cerebrovascular accidents: a prospective study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2005;40:862-866.
9. **Rafailidis PI**, Dourakis SP, Furlas CA. Q fever endocarditis masquerading as Mixed cryoglobulinemia type II. A case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases* 2006;6:32.
10. Falagas ME, Kasiakou SK, Nikita D, Morfou P, Georgoulas G, **Rafailidis PI**. Secular trends of antimicrobial resistance of blood isolates in a newly founded Greek hospital. *BMC Infectious Diseases* 2006;6:99
11. Falagas ME, Kasiakou SK, **Rafailidis PI**, Zouglikis G, Morfou P. Comparison of mortality of patients with *Acinetobacter baumannii* bacteraemia receiving appropriate and inappropriate empirical therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 57(6):1251-4.
12. **Rafailidis PI**, Avramopoulos I, Sapkas G, Falagas ME. Multidrug-resistant tuberculous spondylodiscitis: Growing evidence for the need of aggressive management of spondylodiscitis and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Infection* 2006;52(2):e35-7.
13. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Kasiakou SK, Hatzopoulou P, Michalopoulos A. Effectiveness and nephrotoxicity of colistin monotherapy vs. colistin-meropenem combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2006;12:1227-1230.
14. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Rosmarakis ES. Arrhythmias associated with fluoroquinolone therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007;29(4):374-9.
15. **Rafailidis PI**, Kakisi O, Vardakas KZ, Falagas ME. Infectious complications of monoclonal antibodies used in cancer therapy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer* 2007;109(11):2182-2189.

16. Bliziotis I, Falagas ME, **Rafailidis PI**, Peppas G. Peripheral T-cell lymphoma masquerading as infectious cellulitis. *European Journal of Dermatology* 2007;17(2):166-7.
17. **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Falagas ME. Knee septic arthritis due to *Streptococcus pyogenes* associated with acute thrombosis of the tibial and peroneal veins: case report and review of the literature. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2007;39(4):368-70.
18. Falagas ME, **Rafailidis PI**. When to include polymyxins in the initial antibiotic regimen in critically ill patients with fever? A decision analysis approach. *Shock* 2007;27(6):605-609.
19. **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Falagas ME. Periorbital and facial swelling due to dermatomyositis. *Canadian Medical Association Journal* 2007;176(11):1580-1.
20. Falagas ME, **Rafailidis PI**. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: No longer a controversial issue. *Critical Care* 2007;11:134.
21. Kelesidis T, Kelesidis I, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Counterfeit or substandard antimicrobial drugs: a review of the scientific evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60(2):214-36.
22. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Bliziotis I. Do high doses of quinolones lead to emergence of resistance? *Journal of Infection J Infect.* 2007; 55(2):97-105.
23. **Rafailidis PI**, Falagas ME. Fever and periorbital edema: A review. *Survey of Ophthalmology* 2007;52:422-433.
24. Falagas ME, Zarkadoulia EA, Ioannidou EN, Peppas G, Christodoulou C, **Rafailidis PI**. The effect of psychosocial factors on breast cancer outcome: a systematic review. *Breast Cancer Research* 2007;9(4):R44.
25. **Rafailidis PI**, Ioannidou E, Falagas ME. Ampicillin/Sulbactam: Current status in severe bacterial infections. *Drugs* 2007;67(13):1829-49.
26. **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Falagas ME. Cytomegalovirus meningitis in an immunocompetent adult. *Medical Science Monitor* 2007; 13(9): CS107-109.
27. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Kofteridis D, Vartzili S, Chelvatzoglou F, Papaioannou V, Maraki S, Samonis G, Michalopoulos A. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60(5):1124-30.
28. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Peppas G. Pyomyositis due to hematologic malignancies: A case report and review of the literature. *International Journal of Infectious diseases* 2008;12(2):120-5.

29. **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Falagas ME. Multifocal *Pseudomonas aeruginosa* myositis in an apparently healthy adult. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2008;27(2):159-61.
30. Falagas ME, Kanellopoulou, MD, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G, **Rafailidis PI**, Skarmoutsou ND, Papafrangas EA. Antimicrobial susceptibility of multidrug resistant Gram-negative bacteria to fosfomycin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2008;27(6):439-43.
31. Falagas ME, Makris G, Matthaiou D, **Rafailidis PI**. Statins in infection and sepsis. The clinical evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61(4):774-85.
32. Matthaiou D, Michalopoulos A, **Rafailidis PI**, Karageorgopoulos DE, Papaioannou V, Ntani G, Samonis G, Falagas ME. Risk factors associated with the isolation of colistin resistant Gram negative bacteria: a matched case-control study. *Critical Care Medicine* 2008;36(3):806-811
33. Falagas ME, Giannopoulou T, Kokolakis G, **Rafailidis PI**. Fosfomycin: beyond gastrointestinal tract and urinary tract infections. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:1069-1077.
34. **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Galani E, Christodoulou C, Falagas ME. Concurrent *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* infection in a liver metastasis of bowel carcinoma. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2008;27(8):753-5.
35. **Rafailidis PI**, Varbobitis J, Matthaiou D, Falagas ME. Angiotensin converting enzyme inhibitors and pneumonia: A review. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2008; 64(6):565-73.
36. **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Falagas ME. Henoch-Schönlein purpura associated with *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008;58(5):S98-S99.
37. Falagas ME, Mourtzoukou EG, Giannopoulou K, Alexiou VG, **Rafailidis PI**. Matching criteria in the field of antimicrobial resistance. *Microbial Drug Resistance* 2008;14(2):171-82.
38. **Rafailidis PI**, Falagas ME. Discordance between data acquired by history and findings of physical examination: a phenomenal paradox. *European Journal of Internal Medicine* 2008;19(4):271-5.

39. Falagas ME, Mourtzoukou EG, Giannopoulou K, Alexiou VG, **Rafailidis PI**. Matching criteria in case-control studies on postoperative infections. *Journal of Hospital Infection* 2008;69(2):101-13.
40. Falagas ME, **Rafailidis PI**. Reemergence of colistin in the multidrug resistance organism world of today: personal perspectives. *Expert Review on Investigational Drugs* 2008;17(7):973-81.
41. Markou N, Markantonis SL, Dimitrakis E, Panidis D, Boutzouka E, Karatzas S, **Rafailidis P**, Apostolakos H, Baltopoulos G. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients. *Clinical Therapeutics* 2008; 30(1):143-151.
42. Makris G, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Bacterial interference in the prevention and treatment of infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008;31(6):518-22.
43. **Rafailidis PI**, Mourtzoukou E, Varbobitis I, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infections in apparently immunocompetent adults. *Virology Journal* 2008; 27;5:47.
44. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Matthaïou D, Nikita D, Michalopoulos A. Outcome of pandrug resistant *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* infections: a case series of 28 patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008;32(5):450-4.
45. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Pappas G, Matthaïou D. Worldwide prevalence of head lice. *Emerging Infectious Diseases* 2008;14(9):1493-4.
46. Kapaskelis AM, Vouloumanou EK, **Rafailidis PI**, Hatzopoulou P, Nikita D, Falagas ME. High prevalence of antibody titers against *Bordetella pertussis* in an adult population with prolonged cough. *Respiratory Medicine* 2008;102(11):1586-91.
47. Kyriakidou KG, **Rafailidis PI**, Matthaïou DK, Athanasiou S, Falagas ME. Short versus long course antibiotic therapy for acute pyelonephritis in adolescents and adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Therapeutics* 2008;30(10):1859-68.
48. Vouloumanou EK, **Rafailidis PI**, Kazantzi M, Athanasiou S, Falagas ME. Early switch to oral versus intravenous antimicrobial treatment for hospitalized patients with acute pyelonephritis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Medical Research Opinion* 2008 ;24(12):3423-34
49. Siempos II, Spanos A, Issaris EA, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Non-physicians may reach correct diagnoses by using Google: a pilot study. *Swiss Medical Weekly* 2008;138:741-5.

50. Michalopoulos A, Siempos II, **Rafailidis PI**, Korbila IP, Ioannidou E, Falagas ME. Inhaled colistin as monotherapy for multidrug-resistant gram-negative nosocomial pneumonia: a case series. *Respiratory Medicine* 2009;103(5):707-13
51. Falagas ME, Kotsantis I, Vouloumanou EK, **Rafailidis PI**. Antibiotics versus placebo in the treatment of women with uncomplicated cystitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Infection* 2009;58(2):91-102.
52. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Vouloumanou EK. Systemic colistin use in children without cystic fibrosis: a systematic review of the literature. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009;33(6):503.e1-503.e13.
53. **Rafailidis PI**, Pitsounis A, Falagas ME. Duration of antimicrobial treatment for various common infections - the role of meta-analyses. *Infectious Diseases Clinics of North America* 2009;23(2):269-76.
54. **Rafailidis PI**, Kouranos VD, Christodoulou C, Falagas ME. Linezolid for patients with neutropenia: can bacteriostatic agents be used? *Expert Review Antiinfective Therapy* 2009;7(4):415-22.
55. **Rafailidis PI**. Systemic mastocytosis. *British Medical Journal* [Rapid response (electronic letter) to BMJ 2009;338:b246].
56. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, **Rafailidis PI**. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009 ;34(2):111-20.
57. Falagas ME, **Rafailidis PI**. Nephrotoxicity of colistin: new insight into an old antibiotic. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:1729-1731
58. Falagas ME, Roussos N, Gkegkes ID, **Rafailidis PI**, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of infections caused by Gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: a review of microbiological, animal and clinical studies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2009;18(7):921-44.
59. Karageorgopoulos DE, Valkimadi PE, Kapaskelis A, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Short versus long duration of antibiotic therapy for bacterial meningitis: a meta-analysis of randomised controlled trials in children. *Archives of Disease in Childhood* 2009;94(8):607-14.

60. Falagas ME, Zarkadoulia E, **Rafailidis PI**. The therapeutic effect of balneotherapy: evaluation of the evidence from randomized controlled trials. *International Journal of Clinical Practice* 2009;63(7):1068-84.
61. Maraki S, Samonis G, **Rafailidis PI**, Vouloumanou EK, Mavromanolakis E, Falagas ME. Antimicrobial susceptibility of urinary bacteria to fosfomycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2009;53(10):4508-10.
62. Michalopoulos A, Vartzili S, **Rafailidis P**, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clinical Microbiology and Infection* 2010;16(2):184-6
63. Korbila IP, Michalopoulos A, **Rafailidis P**, Nikita D, Samonis G, Falagas ME. Inhaled colistin as adjunctive to intravenous colistin for the treatment of microbiologically documented VAP: a comparative cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* 2010;16(8):1230-6.
64. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Moraitis LI, Vouloumanou EK, Roussos N, **Rafailidis PI**. Seasonality of mortality: the September phenomenon in Mediterranean countries. *Canadian Medical Association Journal* 2009;181(8):484-6.
65. Falagas ME, Ntziora F, Makris GC, Malietzis GA, **Rafailidis PI**. Do PubMed and Google searches help medical students and young doctors reach the correct diagnosis? A pilot study. *European Journal of Internal Medicine* 2009;20(8):788-90.
66. Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, **Rafailidis PI**, Kapaskelis AM, Dimopoulos G. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. *Future Microbiology* 2009;4:1103-9
67. Makris GC, Spanos A, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Increasing contribution of China in modern biomedical research. *Medical Science Monitor* 2009;15(12):SR15-21
68. Falagas ME, Karamanidou C, Karlis G, Kastoris A, **Rafailidis PI**. The effect of psychosocial factors on the susceptibility and/or outcome of acute respiratory tract infections. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2010 ;14(2):141-8.
69. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaiou DK, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Nikita D, Michalopoulos A. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram (-) bacterial infections: A retrospective cohort study of 258 patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010;35(2):194-9.

70. Kakisi OK, Kechagia AS, Kakisis IK, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Tuberculosis of the oral cavity: A systematic review. *European Journal of Oral Sciences* 2010; 118:103–109.
71. Kastoris AC, **Rafailidis PI**, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria: a review of the published evidence. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2010;66(4):359-68.
72. Falagas ME, Vouloumanou EK, Baskouta E, **Rafailidis PI**, Polyzos K, Rello J. Treatment options for 2009 H1N1 influenza: an evaluation of the published evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010 ;35(5):421-30.
73. **Rafailidis PI**, Bliziotis IA, Falagas ME. Case-control studies reporting on risk factors for emergence of antimicrobial resistance: bias associated with the selection of the control group. *Microbial Drug Resistance* 2010;16(4): 303-308
74. Samonis G, Maraki S, **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Kastoris AC, Falagas ME. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative non-urinary bacteria to fosfomycin and other antimicrobials. *Future Microbiology* 2010;5:961-70.
75. Falagas ME, Koletsi PK, Vouloumanou EK, **Rafailidis PI**, Kapaskelis AM, Rello J. Effectiveness and safety of neuraminidase inhibitors in reducing influenza complications: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010;65(7):1330-46.
76. Samaras V, **Rafailidis PI**, Mourtzoukou EG, Peppas G, Falagas ME. Chronic bacterial and parasitic infections and cancer development: a review of the available published data. *Journal of Infection in Developing Countries* 2010; 4(5):267-281.
77. Falagas ME, Vouloumanou EK, Togias AG, Karadima M, Kapaskelis AM, **Rafailidis PI**, Athanasiou S. Fosfomycin versus other antibiotics for the treatment of uncomplicated urinary tract infections: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010;65(9):1862-77.
78. Falagas ME, Cholevas NV, Kapaskelis AM, Vouloumanou EK, Michalopoulos A, **Rafailidis PI**. Epidemiological aspects of 2009 H1N1 influenza: the accumulating experience from the Northern Hemisphere. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 2010;29(11):1327-47.
79. Falagas ME, Vouloumanou EK, Plessa E, Peppas G, **Rafailidis PI**. Inaccuracies in measuring and administering the desired dose of liquid medication with teaspoons-tablespoons. *International Journal of Clinical Practice* 2010;64(9):1185–1189.

80. **Rafailidis PI**, Mavros MN, Kapaskelis A Falagas ME. Antiviral treatment for severe EBV infections in apparently immunocompetent patients. *Journal of Clinical Virology* 2010;49(3):151-7.
81. Theocharis G, Vouloumanou EK, **Rafailidis PI**, Spiropoulos T, Barbas SG, Falagas ME. Evaluation of a direct test for seasonal influenza in outpatients. *European Journal of Internal Medicine* 2010;21(5):434-8.
82. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Matthaïou D. Resistance to polymyxins. *Drug Resistance Updates* 2010;13(4-5):132-8.
83. Falagas ME, Koletsi PK, Baskouta E, **Rafailidis PI**, Dimopoulos G, Karageorgopoulos DE. Epidemiological aspects of 2009 (H1N1) pandemic influenza: review of the Southern hemisphere experience. *Epidemiology Infection* 2011;139:27-40.
84. Mavros MN, Polyzos KA, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Once versus multiple daily dosing of aminoglycosides for patients with febrile neutropenia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66(2):251-9
85. **Rafailidis PI**, Polyzos KA, Sgouros K, Falagas ME. Prulifloxacin: a review focusing on its use beyond respiratory and urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011;37(4):283-90.
86. Karageorgopoulos, DK, Ntziora F, Vouloumanou E, Michalopoulos A, **Rafailidis P**, Falagas ME. Diagnostic performance of β -D- glucan test for fungal infections. *Clinical Infectious Diseases* 2011;52(6):750-70.
87. Koutzavekiaris I, Vouloumanou EK, Gourni M, **Rafailidis PI**, Michalopoulos A, Falagas ME. Knowledge and skills regarding the management of infections associated with central venous catheters (CVCs): a survey of intensive care unit medical and nursing staff. *American Journal of Infection Control* 2011;39(7):542-7.
88. Vouloumanou EK, Karageorgopoulos DE, **Rafailidis PI**, Michalopoulos A, Falagas ME. Trimethoprim-sulfametrol: evaluation of the available clinical and pharmacokinetic/pharmacodynamic evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011;38(3):197-216.
89. Theocharis G, Vouloumanou EK, Barbas SG, Spiropoulos T, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Comparison of characteristics of outpatients with 2009 H₁N₁ pandemic and seasonal influenza. *International Journal of Clinical Practice* 2011;65(8):871-8.
90. Falagas ME, **Rafailidis PI**, Vouloumanou EK. Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Current Opinion in Hematology* 2012;19(1):14-20.

91. Makris MC, Athanasiou S, Mavros MN, **Rafailidis PI**, Polyzos K, Falagas ME. Safety of vaccines in pregnancy: a review of the published clinical evidence. *Drug Safety* 2012;35(1):1-14.
92. Falagas ME, **Rafailidis PI**. Colistin use in ventilator-associated pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54(5):681-3.
93. Falagas ME, Georgantzi GG, Karageorgopoulos DK, Sun C, Wang R, **Rafailidis PI**. Susceptibility of Gram-negative bacteria to isepamicin: a systematic review of the literature. *Future Microbiology* 2012;10(2):207-18.
94. Vardakas KZ, Polyzos KA, Patouni K, **Rafailidis PI**, Samonis G, Falagas ME. Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. *International Journal Antimicrobial Agents* 2012;40(1):1-8.
95. Vardakas KZ, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Effectiveness and safety of tigecycline: Focus on Use for Approved Indications. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54:1672-4
96. Theocharis G, **Rafailidis PI**, Rodis D, Kontopidis I, Barbas SG, Falagas ME. Outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT) at home in Attica, Greece. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012;31:2957-61.
97. Falagas ME, Tansarli GS, **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Vardakas KZ. Impact of antibiotic minimum inhibitory concentration on infection outcome in patients with susceptible Gram-negative bacteria: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2012;56:4214-22.
98. Mavros MN, Bardakas V, **Rafailidis PI**, Sardi TA, Demetriou E, Falagas ME. Comparison of number of citations to full original articles versus brief reports. *Scientometrics* 2012:1-4.
99. Vardakas KZ, Tansarli GS, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteremia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012;67:2793-803.
100. Vardakas KZ, Konstantelias AA, Loizidis G, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Risk factors for development of *Clostridium difficile* infection due to BI/NAP1/027 strain: a meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* 2012;16(11):e768-73.

101. Polyzos KA, Mavros MN, Vardakas KZ, Makris MC, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Efficacy and safety of telavancin in clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(8):e41870.
102. Mavros MN, Tansarli GS, Vardakas KZ, **Rafailidis PI**, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Impact of vancomycin minimum inhibitory concentration on clinical outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis and meta-regression. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012;40(6):496-509.
103. Tansarli GS, **Rafailidis PI**, Kapaskelis A, Falagas ME. Frequency of the off-label use of antibiotics in clinical practice: a systematic review. *Expert Review Antiinfective Therapy* 2012;10(12):1383-92.
104. Vardakas KZ, **Rafailidis PI**, Konstantelias AA, Falagas ME. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: The study, the patient, the bug or the drug? *Journal of Infection* 2013;66(5):401-14.
105. Vardakas KZ, Kontopidis I, Gkegkes ID, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Incidence, characteristics, and outcomes of patients with bone and joint infections due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases* 2013;32(6):711-21.
106. Tansarli G, **Rafailidis PI**, Papazoglou AA, Falagas ME. Sisomicin against contemporary pathogens: an analytical evaluation of the literature. *Expert Review Antiinfective Therapy* 2013;11(4):421-8.
107. Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, **Rafailidis PI**, Tansarli GS. Antibiotic treatment and mortality of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2014;58(2):654-63.
108. Zarkali A, Karageorgopoulos DE, **Rafailidis PI**, Falagas ME. Frequency of the off-label use of monoclonal antibodies in clinical practice: a systematic review of the literature. *Curr Med Res Opin* 2014;30(3):471-80.

ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑΦΟΡΩΝ (SCOPUS citations): 2231

HIRSCH-index: 27

ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΑΠΗΧΗΣΗΣ (Impact factor): 432

Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά περιοδικά

1. **Ραφαηλίδης ΠΙ**, Ντουράκης ΣΠ, Πετράκη Κ, Μπάτζιος Σ, Μαλαμίτση Ι, Χατζηγιάννης ΣΙ. Πρωτοπαθής αμυλοείδωση μιμούμενη κίρρωση του ήπατος. *Ιατρική* 2001; 79(5): 450-453.
2. **Ραφαηλίδης ΠΙ**, Ντουράκης ΣΠ, Βουρλάκου Χ, Κατσούδας Σ, Νομικού Ε. Οξεία νεφρική ανεπάρκεια ως εκδήλωση θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας σε έδαφος αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου σχετιζόμενου με αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου Ι. *Ιατρική* 2002; 81(4): 353-358.
3. **Rafailidis ΠΙ**, Dourakis SP, Papanikolaou IS, Cherakakis P, Matikas N, Triantafillidis JK. A case of familial amyloid polynuropathy type I of Greek origin. *Annals of Gastroenterology* 2002;15(2): 195-199.
4. **Ραφαηλίδης ΠΙ**, Ντουράκης ΣΠ, Πετράκη Κ, Χατζηγιάννης ΣΙ. Οξεία ικτερική ηπατίτις οφειλόμενη σε σύνδρομο επικάλυψης μεταξύ αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου Ι και αυτοάνοσης χολαγγειίτιδας. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2003,20:57-60.

Συγγραφή σε βιβλία

Αναπληρωτής εκδότης:

Gorbach's 5-minute Infectious Diseases Consult, 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

Συγγραφή κεφαλαίων:

Falagas ME, **Rafailidis ΠΙ**. Pseudomonas and related Gram-negative bacillary infections. **Goldman's Cecil Textbook of Medicine**, 25th edition, Elsevier (in press).

Rafailidis ΠΙ, Falagas ME. Ampicillin-Sulbactam.

Kucers' The Use of Antibiotics, 6th edition, American Society of Microbiology, 2010.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή συνέδρια

1. Nomikou E, Gafou A, Digenopoulou E, Maragkos K, Bellia M, Vgontza N, Tsevrenis V, Michael A, **Rafailidis Π**, Sevastianos V, Dourakis S, Kontopoulou-Griva E. Antiphospholipid syndrome: Cases with unusual manifestations. Abstract in the *Journal of Thrombosis and Hemostasis*, July 2001.
2. **Rafailidis Π**, Gakiopoulou H, Giannopoulou I, Mavrommatis J, Eftychiadis C, Zervas A, Couvaris C, Giannopoulos A. The KDR/Flk-1 receptor of vascular endothelial growth factor in urothelial bladder cancer: relation with clinicopathologic parameters and patients' survival Abstract in *Virchows Archiv* 2003, Volume 443, No 3, p.436.
3. Athanassiou M, Koumoudiou Ch, Stratouli S, **Rafailidis Π**, Anagnostopoulou D, Alamanos I, Apostolakos Ch. ICU trauma patients' catheterization and type of central venous catheter. 6th European Trauma Congress, May 2004, Prague.

4. Athanasiou M, Hroni D, **Rafailidis P**, Kampagiannis N, Preza A, Apostolakos H. Effect of pulmonary contusion on severe head injury mortality in multi-trauma patients. 7th European Congress of Trauma and Emergency Surgery, September 2004, Rotterdam, Netherlands.
5. Athanasiou M, Kampagiannis N, Hroni D, **Rafailidis P**, Alamanos I, Apostolakos Ch. Multiple organ failure in ICU multiple-trauma patients. 3rd European Congress on Emergency Medicine. February 2005, Leuven, Belgium.

Ανακοινώσεις σε Ελληνικά συνέδρια

1. Μελακόπουλος Ι, Σεβαστιανός ΒΑ, Γαβριήλ Σ, **Ραφαηλίδης Π**, Δενδρινός Χ, Ντουράκης ΣΠ. Ακοκκιοκυτταραιμία με κλινικές εκδηλώσεις ελκονεκρωτικής ουλίτιδας και αμφοτερόπλευρης τραχηλικής λεμφαδενίτιδας μετά από χρήση θειαμαζόλης. 5⁰ Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 2001
2. Λιβαδάς Σ, Παπανικολάου ΙΣ, Χουλιάρης Γ, **Ραφαηλίδης Π**, Ντουράκης Σ, Τόλης Γ. Η θυρεοειδική λειτουργία σε άτομα με μετάλλαξη στο γονίδιο της τρανσθυρετίνης, 29⁰ Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Μάρτιος 2002
3. Αθανασίου Μ, **Ραφαηλίδης Π**, Στρατούλη Σ, Αλαμάνος Ι, Αποστολάκος Χ. Το τμήμα επειγόντων. Σελίδες 160-165 στο 8⁰ Θεματικό Συνέδριο Εντατική Θεραπεία και Επείγουσα Ιατρική: Τραύμα, Επιμέλεια Γεώργιος Μπαλτόπουλος Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2005.
4. Αθανασίου Μ, **Ραφαηλίδης Π**, Στρατούλη Σ, Αλαμάνος Ι, Αποστολάκος Χ. Προετοιμασία-Οργάνωση πριν την άφιξη του τραυματία Σελίδες 172-176 στο 8⁰ Θεματικό Συνέδριο Εντατική Θεραπεία και Επείγουσα Ιατρική: Τραύμα, Επιμέλεια Γεώργιος Μπαλτόπουλος Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2005.

Δραστηριότητα ως εκπαιδευτής

Διδασκαλία φοιτητών και νεότερων συναδέλφων κατά τα χρόνια της ειδικότητας και εξειδίκευσης μου στην Ελλάδα και στην Μεγάλη Βρετανία.

Παρακολούθηση συνεδρίων (αναφορά επιλεγμένου αριθμού)

- 24th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, April 2004
- 20⁰ Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρείας <<Τι νεώτερο στην Πνευμονολογία 2002-2004>>
- 28⁰ Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2004
- 8th state of the art Interdisciplinary Review Course, Athens 2004

- 7⁰ Θεματικό Συνέδριο <<Εντατική Θεραπεία και Λοιμώξεις>>, Νοέμβριος 2004
- Ελληνικό πρόγραμμα Α.Τ. Λ. S 2004
- Δεκάλογος στις νοσοκομειακές λοιμώξεις, Φεβρουάριος 2005
- 25th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, March 2005
- 9th state of the art Interdisciplinary Review Course, Athens 2005
- 30⁰ Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 2005
- 10⁰ Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, Οκτώβριος 2005
- 10⁰ Διατομεακό Μεταπτυχιακό Σεμινάριο <<Αναπνευστική Ανεπάρκεια Απεικόνιση και Θεραπεία>>,
- 4th Annual Conference of the International Conference for the Prevention of Tobacco Induced Diseases, 2005 PTID Conference, September 2005
- 8⁰ Θεματικό Συνέδριο <<Εντατική Θεραπεία και Επείγουσα Ιατρική: Τραύμα>>, Νοέμβριος 2005
- Διηθητικός Καρκίνος μαστού, Μάρτιος 2005
- 22⁰ Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρείας <<Τι νεότερο στην Πνευμονολογία 2006>>
- International Health Conference: Recent Advances in Clinical Medicine, Public Health and Health Policy, September 2007, Athens, Greece
- 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 2008, Barcelona, Spain
- European Society of Intensive Care Medicine, October 2009, Vienna , Austria
- 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 2010, Boston, Massachusetts, USA
- 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and 27th International Congress of Chemotherapy, May 2011, Milan, Italy
- 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 2014, Barcelona, Spain

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την συχνότερη κακοήθεια στις γυναίκες. Στις Η.Π.Α υπολογίζεται ότι το 2001, διαγιγνώστηκαν 192200 νέοι διηθητικοί καρκίνοι του μαστού και επήλθαν 40860 θάνατοι από την νόσο αυτή. Αν από τα στοιχεία αυτά εξάγουμε πληροφορίες και για την Ελλάδα υπάρχουν περίπου 7760 νέες διαγνώσεις καρκίνου του μαστού και 1940 θάνατοι/έτος. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι παρά τις προόδους στην διάγνωση και στην θεραπεία το ένα τέταρτο των γυναικών που αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού θα καταλήξουν εξαιτίας του.

Μολονότι ο κίνδυνος να εμφανίσει μια γυναίκα καρκίνο του μαστού κατά την διάρκεια της ζωής της είναι 1: 8, αυτός εκδηλώνεται συνήθως μετά την ηλικία των 50 ετών στο 75% των θηλέων. Μόνο 5% εκδηλώνει το νόσημα πριν την ηλικία των 40. Πιθανώς λόγω της πιο αποτελεσματικής σήμερα ανεύρεσης των ασθενών με τα προγράμματα ελέγχου παρατηρείται μια αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού σε παγκόσμια κλίμακα. Η επίπτωση στις Η.Π.Α είναι 111 νέες περιπτώσεις σε 100000 άτομα γυναικείου πληθυσμού (Crum και συν. 1996). Είναι κατανοητή λοιπόν η εντατική έρευνα που γίνεται όσον αφορά την αιτιολογία διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου αυτού καθώς και την πληρέστερη συγκρότηση προγνωστικών παραγόντων για την ασθένεια αυτή.

A.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Crum και συν. 1996) έχει ταυτοποιηθεί (**Πίνακας 1**). Κατωτέρω αναπτύσσονται μερικοί από τους σημαντικότερους:

Γεωγραφική κατανομή. Ο κίνδυνος για την νεοπλασία είναι μεγαλύτερος για γυναίκες στην Βόρεια Αμερική και την Βόρεια Ευρώπη. Συγκεκριμένα ο κίνδυνος είναι πενταπλάσιος για γυναίκες στις Η. Π. Α συγκριτικά με την Ιαπωνία. Οι διαφορές αυτές φαίνεται να είναι περιβαλλοντικές παρά γενετικές αφού μετανάστευση από περιοχές χαμηλής επίπτωσης σε περιοχές υψηλής επίπτωσης οδηγεί σε υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη της νόσου.

Ηλικία. Ο καρκίνος του μαστού είναι ασυνήθης πριν από την ηλικία των 30 ετών. Ύστερα από την ηλικία αυτή ο κίνδυνος αυτός μεγαλώνει σταθερά αλλά μετά από την εμμηνόπαυση σχηματίζεται πλατώ στην καμπύλη.

Γενετικοί παράγοντες και οικογενειακό ιστορικό. Περίπου 5% ως 10% του καρκίνου του μαστού σχετίζονται με ειδικές κληρονομήσιμες μεταλλάξεις. Γυναίκες που είναι πιθανότερο να φέρουν γονίδιο ευαισθησίας στον καρκίνο του μαστού είναι εκείνες που αναπτύσσουν καρκίνο μαστού πριν την εμμηνόπαυση, που έχουν αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού, που έχουν άλλους

σχετιζόμενους καρκίνους (π. χ καρκίνο ωοθήκης), ή έχουν σημαντικό οικογενειακό ιστορικό (π. χ αρκετές προσβεβλημένες συγγενείς πριν την εμμηνόπαυση). Περίπου οι μισές ασθενείς με κληρονομικό καρκίνο του μαστού έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και στο γενετικό τόπο q21.3, ενώ ένα επιπρόσθετο ένα τρίτο παρουσιάζει μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA2 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και συγκεκριμένα στον γενετικό τόπο q12-13. Τα γονίδια αυτά δεν παρουσιάζουν ομολογία μεταξύ τους, ούτε με άλλα γνωστά γονίδια. Δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια αφού ο καρκίνος επέρχεται όταν είναι αδρανής ή ελαττωματικά και τα δύο γονίδια. Υπάρχουν γενετικές εξετάσεις διαθέσιμες, που όμως περιπλέκονται από τις εκατοντάδες διαφορετικές μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν και δεν οδηγούν όλες σε ευπάθεια σε καρκίνο. Ο βαθμός διεισδυτικότητας, η ηλικία έναρξης του καρκίνου και η συσχέτιση με διάφορους τύπους καρκίνου ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης. Πάντως, οι περισσότερες γυναίκες φορείς μεταλλαγών θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού πριν την ηλικία των 70 ετών συγκριτικά με μόνο 7% των γυναικών που δεν φέρουν την μετάλλαξη. Είναι πιθανόν η μεθυλίωση ρυθμιστικών περιοχών να προκαλεί αδρανοποίηση των γονιδίων σε περιπτώσεις σποραδικού καρκίνου. Λιγότερο συνήθεις γενετικές νόσοι που σχετίζονται με καρκίνο του μαστού αποτελούν το σύνδρομο Li- Fraumeni (που προκαλείται από μεταλλάξεις του TP53 στην γενετική σειρά), η νόσος του Cowden (που προκαλείται από μεταλλάξεις στην PTEN), καθώς και φορείς του γονιδίου της αταξίας-τηλαγγειεκτασίας (Crum και συν. 1996).

A.3. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού ανακαλύπτεται από την ασθενή ή τον γιατρό της σαν ένα διακριτό, μονήρες, ανώδυνο και κινητό ογκίδιο. Αυτή την χρονική στιγμή ο καρκίνος είναι 2 ως 3 εκ. σε μέγεθος και υπάρχει ήδη προσβολή των μασχαλιαίων λεμφαδένων στο 50%. Με τον έλεγχο με μαστογραφία οι καρκίνοι ανιχνεύονται πριν ακόμη γίνουν ψηλαφητοί. Το κατά μέσον όρο μέγεθος των με μαστογραφία ανακαλυπτόμενων διηθητικών καρκίνων που ανιχνεύεται είναι 1 εκ και μόνο 15% έχει λεμφαδενικές μεταστάσεις (Crum και συν. 1996). Επιπρόσθετα σε πολλές γυναίκες ανιχνεύεται πορογενές καρκίνωμα *in situ* πριν την ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου. Όσο η ηλικία των γυναικών αυξάνει, αντικαθίσταται ο ινώδης ιστός από λίπος και έτσι αυξάνει η ευαισθησία του screening λόγω της μεγαλύτερης ακτινοδιαύγειας του μαστού και της αυξημένης επίπτωσης κακοήθειας.

A.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Η αιτιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη. Τρεις ομάδες επιδράσεων φαίνεται να είναι σημαντικές: α. γενετικές αλλαγές β. ορμονικές επιδράσεις γ. περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Γενετικές αλλαγές: Επιπρόσθετα με τα καλά χαρακτηρισμένα προαναφερθέντα σύνδρομα, γενετικές αλλοιώσεις έχουν αναφερθεί και σε περιπτώσεις σποραδικού καρκίνου του μαστού. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν πρωτοογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια στο επιθήλιο των μαστών συνεισφέρουν στην ογκογόνο δράση. Ένα από τα καλύτερα παραδείγματα αποτελεί η υπερέκφραση του ERBB2 (HER2/NEU) πρωτοογκογονιδίου που έχει βρεθεί να είναι ενισχυμένο σε έως και 30% των καρκίνων του μαστού (Slamon και συν. 1987). Το γονίδιο αυτό είναι ένα μέλος της οικογένειας του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και η υπερέκφραση του σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Αναλόγως, ενίσχυση των γονιδίων Ras και Myc έχει αναφερθεί σε κάποιους καρκίνους του μαστού. Μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων RB1 και TP53 μπορεί επίσης να υπάρχουν. Το πιθανότερο είναι να συμβαίνουν πολλαπλές επίκτητες μεταλλάξεις στην διαδοχική εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό.

Ορμονικές επιδράσεις: Το πλεόνασμα των ενδογενών οιστρογόνων ή ακριβέστερα η έλλειψη ορμονικής ισορροπίας σαφώς και παίζει σημαντικό ρόλο. Πολλοί από τους παράγοντες κινδύνου όπως η μεγάλη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής, η ατεκνία και η μεγάλη ηλικία κατά την γέννηση του πρώτου παιδιού υποδηλώνουν αυξημένη έκθεση σε οιστρογόνα (Crum και συν. 1996). Λειτουργικοί όγκοι της ωοθήκης που παράγουν οιστρογόνα σχετίζονται με καρκίνο του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τα οιστρογόνα διεγείρουν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Έχει γίνει η υπόθεση ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης που φυσιολογικά βρίσκονται στο επιθήλιο του μαστού και συχνά και στα καρκινικά κύτταρα του μαστού αλληλεπιδρούν με υποκινητές αύξησης όπως τον TGF α , τον PDGF και τον FGF που παράγονται από τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού ώστε να δημιουργηθεί ένας αυτοκρινής μηχανισμός ογκογένεσης.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες: Οι περιβαλλοντικές επιδράσεις εκφράζονται μέσω της διαφορετικής επίπτωσης του καρκίνου του μαστού σε γενετικά ομοιογενείς ομάδες και την διαφορά σε διάφορες χώρες όπως προαναφέρθηκε (Crum και συν. 1996).

Πίνακας 1. Παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του μαστού.

ΚΑΛΑ ΤΕΚΜΗΡΙΩΜΕΝΟΙ	ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ
Γεωγραφικοί παράγοντες	Ποικίλλει
Ηλικία	Αυξάνει μετά την ηλικία των 30
Οικογενειακό ιστορικό	
Πρώτου βαθμού συγγενής με καρκίνο μαστού	1,2- 3,0
Προεμμηνοπαυσιακή	3,1
Προεμμηνοπαυσιακή και αμφοτερόπλευρα	8,5- 9,0
Μετεμμηνοπαυσιακή	1,5
Μετεμμηνοπαυσιακή και αμφοτερόπλευρα	4,0-5,4
Ιστορικό έμμηνου ρύσης	
Ηλικία εμμηναρχής <12 ετών	1,3
Ηλικία εμμηνόπαυσης >55 ετών	1,5-2,0
Ιστορικό κνήσεων	
Πρώτη γέννηση ζώντος τέκνου	
Ηλικία 25 -29 ετών	1,5
Ηλικία > 30 ετών	1,9
Ηλικία > 35 ετών	2,0 –3,0
Άτεκνη	3,0
Νόσος μαστών	
Υπερπλαστική νόσος	1,9
Υπερπλαστική νόσος με άτυπη υπερπλασία	4,4
Λοβιακό καρκίνωμα in situ	6,9- 12
ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΚΑΛΑ ΤΕΚΜΗΡΙΩΜΕΝΟΙ	
Εξωγενή οιστρογόνα	
Αντισυλληπτικά δισκία	
Παχυσαρκία	
Δίαιτα υψηλή σε λιπαρά	
Κατανάλωση αλκοόλης	
Κάπνισμα	

(Από Crum CP και συν. The female genital system and breast, Robbins Basic Pathology, 7th edition, Saunders.)

A.5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η ιστολογική ταξινόμηση των όγκων του μαστικού αδένου αποσκοπεί στον ιστολογικό ορισμό των νεοπλασματικών και μη αλλοιώσεων του μαστού και στη διευκόλυνση της υιοθέτησης μιας ενιαίας ταξινόμησης (**Πίνακας 2**). Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO 2003) οι όγκοι του μαστού εντάσσονται στις ακόλουθες γενικές κατηγορίες:

1. Επιθηλιακοί όγκοι (καλοήθεις, κακοήθεις)
2. Καρκινώματα ασυνήθους κλινικής εμφάνισης
3. Μικτά νεοπλάσματα, αποτελούμενα από μεσεγχυματικό και επιθηλιακό ιστό (ινοεπιθηλιακά νεοπλάσματα) (καλοήθη, κακοήθη)
4. Διάφοροι όγκοι (Miscellaneous Tumors)
 - 4.1. Μεσεγχυματικοί όγκοι (καλοήθεις, κακοήθεις)
 - 4.2. Δερματικοί όγκοι
 - 4.3. Όγκοι του λεμφικού και αιμοποιητικού ιστού
 - 4.4. Μυοεπιθηλιακοί όγκοι
 - 4.5. Δυσπλασίες μαστικού αδένου/ Ινοκυστικές αλλοιώσεις
5. Ογκοειδείς αλλοιώσεις
6. Όγκοι του ανδρικού μαστού
7. Μεταστατικοί όγκοι

Μεταξύ των κακοηθών νεοπλασμάτων του μαστικού αδένου τα συχνότερα απαντώμενα είναι τα επιθηλιακά κακοήθη νεοπλάσματα (καρκινώματα).

Τα αδενοκαρκινώματα προέρχονται από το αδενικό επιθήλιο της τελικής πορολοβιακής μονάδας. Οι διάφοροι υπότυποι παίρνουν το όνομά τους κυρίως από τη μικροσκοπική αρχιτεκτονική δομή και τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά και σε λιγότερο βαθμό από τη θέση προέλευσής τους. Τέλος, μπορεί να είναι αμιγή ή να συνδυάζονται μεταξύ τους. Το 65-80% των αδενοκαρκινωμάτων ανήκει στην κατηγορία του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος (Rosen και Oberman 1993). Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα στην ταξινόμηση της WHO (1981) ορίζεται ως ακολούθως: "Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα είναι ο συχνότερα απαντώμενος κακοήθης όγκος του μαστού, ο οποίος δεν εμπίπτει σε καμία από τις λοιπές κατηγορίες διηθητικού καρκινώματος του μαστικού αδένου". Ο γενικός όρος "Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου" (not otherwise specified, NOS) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ομάδας αυτής των καρκινωμάτων και για το διαχωρισμό τους από τους ποικίλους ειδικούς τύπους πορογενούς καρκινώματος.

Πίνακας 2. Ιστολογική ταξινόμηση κακοήθων επιθηλιακών νεοπλασμάτων μαστού (Tavassoli και συν. 2003)

1.	Διηθητικοί όγκοι
1.1	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα
1.2	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα
1.3	Σωληνώδες καρκίνωμα
1.4	Διηθητικό ηθμοειδές καρκίνωμα
1.5	Μυελοειδές καρκίνωμα
1.6	Βλεννώδες καρκίνωμα
1.7	Νευροενδοκρινείς όγκοι
1.8	Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
1.9	Διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα
1.10	Αποκρινές καρκίνωμα
1.11	Μεταπλαστικά καρκινώματα
1.12	Καρκίνωμα πλούσιο σε λίπος
1.13	Εκκριτικό καρκίνωμα
1.14	Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα
1.15	Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα
1.16	Κυψελιδώδες καρκίνωμα
1.17	Καρκίνωμα από διαυγή κύτταρα, πλούσιο σε γλυκογόνο
1.18	Σμηγματογόνο καρκίνωμα
1.19	Φλεγμονώδες καρκίνωμα
2.	Μη διηθητικοί όγκοι
2.1	Λοβιακό καρκίνωμα in situ
2.2	Ενδοπορικές υπερπλαστικές αλλοιώσεις
	2.2.1. Πορογενές καρκίνωμα in situ
2.3	Ενδοπορικά θηλώδη νεοπλάσματα
	2.3.1. Ενδοπορικό θηλώδες καρκίνωμα
	2.3.2. Ενδοκυστικό θηλώδες καρκίνωμα

Ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας περιγράφει το μικροσκοπικό πρότυπο αύξησης ενός διηθητικού πορογενούς καρκινώματος καθώς επίσης και τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της διαφοροποίησης. Έχει υπερισχύσει το σχήμα του Elston για την εκτίμηση του βαθμού κακοηθείας, το οποίο είναι γνωστό ως Nottingham τροποποίηση του συστήματος των Bloom και Richardson (1957). Οι παράμετροι που μετρούνται είναι η έκταση των σωληνωδών σχηματισμών, η πυρηνική υπερχρωμασία (πλειομορφισμός) και η μιτωτική αναλογία (μιτωτικός δείκτης). Κάθε παράμετρος δίνεται με βαθμό 1 ή 2 ή 3. Ο βαθμός της κακοηθείας προκύπτει από την άθροιση των τριών παραμέτρων. Αυτό οδηγεί σε συνολικό βαθμό από 3-9 και μεταφράζεται στην ακόλουθη τελική βαθμίδα: 3-5 βαθμοί=Grade I (καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα), 6-7

βαθμοί=Grade II (μέτρια διαφοροποιημένο) και 8-9 βαθμοί= Grade III (πτωχά διαφοροποιημένο). Οι Schumacher και συν. (1993), αναλύοντας πολυπαραγοντικά την ταξινόμηση των Bloom-Richardson, αναφέρουν ότι ο πυρηνικός πλειομορφισμός είναι ο κύριος προγνωστικός καθοριστής του συστήματος.

A6. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η βιολογική ποικιλότητα και η μορφολογία των διαφόρων τύπου καρκίνου του μαστού ταξινομούνται, με βάση κλινικούς και ιστοπαθολογικούς παράγοντες οι οποίοι μετά από κλινική εκτίμηση, χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της πρόγνωσης, την θεραπευτική καθοδήγηση και την πρόβλεψη ανταπόκρισης στη θεραπεία. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν την ηλικία και την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση της ασθενούς, τον τύπο, το μέγεθος και τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας του όγκου, τη λεμφαδενική συμμετοχή και την παρουσία ή απουσία δεικτών όπως οι ορμονικοί υποδοχείς (ER, PR) και ο υποδοχέας HER-2. Είναι γνωστό ότι όγκοι με πανομοιότυπα μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά, δυνατόν να εμφανίσουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Η ανάγκη βέλτιστης θεραπευτικής προσέγγισης και προβλεψιμότητας απαιτεί τη διερεύνηση όσο το δυνατόν περισσότερων παραγόντων, ώστε να δημιουργηθεί σταθερή βάση δεικτών, που θα μελετώνται για κάθε όγκο και θα τον εντάσσουν σε συγκεκριμένη προγνωστική ομάδα (Perou και συν. 2000, Guiu και συν. 2012). Διάφορες μοριακές τεχνικές και ιδιαίτερα το γονιδιακό πορτραίτο (GEP), χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στην προσπάθεια βελτιστοποίησης της ταξινόμησης. Η εισαγωγή του γονιδιακού πορτραίτου παρέχει δεδομένα, για τη μοριακή και βιολογική διαφορετικότητα των καρκινωμάτων του μαστού καθώς και τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων προγνωστικών δεικτών, αλλά και θεραπευτικών στόχων.

Η πρωτότυπη ταξινόμηση του Perou <<το μοριακό πορτραίτο>> του καρκίνου του μαστού (Perou και συν. 2000), που βασίζεται στο γονιδιακό προφίλ, συνεχίζει να εξελίσσεται δεδομένου ότι προτείνονται επιπλέον υποδιαίρεσεις της αρχικής ταξινόμησης. Οι πλέον αναπαραγόμενοι υποτύποι είναι τα καρκινώματα με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς **ομάδα αυλικού τύπου (A και B)**, τα καρκινώματα με αρνητικούς υποδοχείς και έκφραση του HER-2, **ομάδα HER-2** και η **ομάδα με τα καρκινώματα βασικού τύπου (Πίνακας 3)**. Μερικές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει και άλλους μοριακούς υποτύπους, όπως ο αυλικού τύπου C και το φυσιολογικό τύπου καρκίνωμα μαστού, αλλά δεν έχουν χαρακτηριστεί τόσο καλά. Οι ανωτέρω ομάδες καρκινωμάτων διαφέρουν ως προς την γονιδιακή έκφραση, τα κλινικά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στην θεραπεία και την πρόγνωση, όπως συνοψίζονται κάτωθι και στον πίνακα 3 (Guiu και συν. 2012).

1. Η **ομάδα αυλικού τύπου**, υποδιαιρέθηκε σε δύο υποομάδες, το αυλικού τύπου A και του αυλικού τύπου B (με την προσθήκη και επαναφαίρεση του αυλικού τύπου B είναι ER/θετικοί και σχεδόν τα 2/3 αυτών έχουν χαμηλό ή ενδιάμεσο ιστολογικό βαθμό κακοηθείας. Οι **όγκοι αυλικού τύπου A**, έχουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης [ER(+), PR(+)], HER2(-), BCL2(+), όπως και υψηλά επίπεδα έκφρασης της GATA πρωτεΐνης σύνδεσης, της πρωτεΐνης σύνδεσης X-box, τον trefoil παράγοντα 3, τον ηπατοκυτταρικό πυρηνικό παράγοντα 3α και LIV-1 (Guiu και συν. 2012).

Οι **όγκοι αυλικού τύπου B** εκφράζουν ποικιλοτρόπως τα γονίδια αυτά και έχουν χαμηλά ως μέτρια επίπεδα έκφρασης των ειδικών αυλικών γονιδίων, μερικοί δε απ' αυτούς είναι HER-2 θετικοί. Η συχνότητα μετάλλαξης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, είναι μικρότερη στον υποτύπο αυλικών A από ότι στον υποτύπο αυλικών B (Guiu και συν. 2012).

2. Η **ομάδα HER-2** καθορίζεται από την υπερέκφραση του HER-2 και τη χαμηλή έκφραση γονιδίων ER και PR, αφορά στο ~15% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, είναι πιθανότερα υψηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας με λεμφαδενικές μεταστάσεις (καρκίνωμα γενικά κακής πρόγνωσης) και ανταποκρίνεται στην θεραπεία με trastuzumab και σε θεραπεία βασισόμενη σε ανθρακυκλίνη (Guiu και συν. 2012).
3. Η **ομάδα βασικού τύπου** συσχετίστηκε με τον τριπλό αρνητικό φαινότυπο, δηλαδή ER(-), PR (-), και HER-2(-), είναι συνήθως διηθητικά πορογενή καρκινώματα υψηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, συμπαγώς αναπτυσσόμενα, με υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, γεωγραφικές νεκρώσεις ή και εστιακή κεντρική ίνωση, στρωματική λεμφοκυτταρική διήθηση και απωθητικά όρια (Guiu και συν. 2012).

Το ~95% των καρκίνων βασικού τύπου είναι ER (-) και το 91% αυτών των όγκων είναι υψηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, εμφανίζουν δε συχνότερα υπερέκφραση βασικών κυτοκερατινών (ck 5/6), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και του c-Kit. Κλινικές μελέτες βασισμένες σε μοριακούς υποτύπους, έχουν δείξει ότι οι όγκοι βασικού τύπου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε θεραπεία με πλατίνα και αναστολείς της πολυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράσης. Περίπου 80-90% των τριπλά αρνητικά όγκων συναθροίζονται στο γονότυπο του βασικού τύπου, αλλά ο γονότυπος αυτός ως σύνολο, είναι ετερογενής και μπορεί να υποδιαιρεθεί σε πολλαπλά υποσύνολα.

Πρόσφατα οι κάτωθι υποτύποι καρκινωμάτων του μαστού, εμπίπτουν στους τριπλά αρνητικά όγκους και η πλειοψηφία αυτών χαρακτηρίζονται ως βασικού τύπου:

1. μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα
2. αδenoειδές κυστικό καρκίνωμα
3. ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
4. εκκριτικό καρκίνωμα
5. καρκίνωμα με διαφοροποίηση προς χόνδρο
6. καρκίνωμα σε έδαφος μικροσωληναριακής αδένωσης
7. μυελοειδές καρκίνωμα
8. χαμηλής διαφοροποίησης διηθητικό πορογενές καρκίνωμα

Σε αντίθεση με την προβλεπόμενη από το μοντέλο Genetic Expression Profile (Perou και συν. 2000), επιθετική συμπεριφορά του καρκινώματος βασικού τύπου, τα προαναφερόμενα καρκινώματα εμφανίζουν ποικίλη συμπεριφορά, εξαρτώμενη από τον πυρηνικό βαθμό κακοηθείας και άλλα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου καρκινώματος. Μελέτες γονιδιακού προφίλ του οικογενούς καρκίνου του μαστού, συναθροίζουν το 80% περίπου των καρκίνων μαστού σχετιζόμενων με BRCA-1 ομάδα βασικού τύπου και επιπλέον πολλά σποραδικά καρκινώματα μαστού βασικού τύπου, εμφανίζουν δυσλειτουργία του BRCA-1.

Μετα-ανάλυση προηγούμενων μελετών (Wirapati και συν. 2008), αναγνωρίζει τρεις υποτύπους ως σταθερά ταυτοποιούμενους: τους HER-2(+), ER(+)/HER-2(-) και ER(-)/HER-2(-). Με αυτή την προσέγγιση όγκοι ER(+) ή/ και PR(+) και HER-2 (-) πιθανότερο εντάσσονται στα αυλικού τύπου A, ER(+), PR(+) και HER-2 (+) στα αυλικού τύπου B, οι όγκοι ER(-), PR(-) και HER-2 (+) στα καρκινώματα τύπου HER-2 και οι όγκοι ER(-), PR(-) και HER-2 (-), εντάσσονται πιθανότερα στα καρκινώματα βασικού τύπου.

Πρόσφατη μελέτη έδειξε (Guiu και συν. 2012) την ανάγκη χρήσης επιπλέον δεικτών από τους τρεις προαναφερόμενους (ER, PR, HER-2), για την καλύτερη προσέγγιση του μοριακού υποτύπου, ιδιαιτέρως του βασικού (όπως προαναφέρθηκε 70-80% των καρκινωμάτων βασικού τύπου είναι τριπλά αρνητικά) και του αυλικού τύπου B (μόνο το 30% αυτών είναι HER-2

θετικοί). Παραδείγματος χάριν, η ομάδα βασικού τύπου καθορίζεται ακριβέστερα με τη διερεύνηση και της κερατίνης 5/6 (ck5/6) και του υποδοχέα του επιδερμειδικού αυξητικού παράγοντα EGFR, δεδομένου ότι τα καρκινώματα βασικού τύπου είναι συχνότερα τριπλά αρνητικά και ck5/6(+) ή/και EGFR(+). Πράγματι χρησιμοποιώντας αυτό το συνδυασμό ανοσοϊστοχημικών δεικτών, αναγνωρίζονται τα καρκινώματα που με βάση το γονιδιακό προφίλ τους ομαδοποιούνται στην βασικό τύπο (δηλαδή ο ανοσοφαινότυπος υποδηλώνει και το γονότυπο) με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 76%. Δεύτερο παράδειγμα αποτελεί η χρήση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως καθορίζεται από την έκφραση του δείκτη ki-67, ο οποίος βοηθά στην ταυτοποίηση της ομάδας αυλικού τύπου B, με μεγαλύτερη ακρίβεια από την έκφραση των ER, PR και HER-2 αποκλειστικά (Guiu και συν. 2012).

Στην προσπάθεια καλύτερης κατανόησης των καρκινωμάτων μαστού ειδικού τύπου, χρησιμοποιήθηκαν επίσης μοριακές τεχνικές. Χρησιμοποιώντας συνδυασμό ανοσοφαινοτυπικής και γονιδιακής έκφρασης σε μια πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι μερικοί ειδικοί τύποι καρκίνου αντιπροσωπεύουν διακριτές οντότητες (π.χ. το διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα), αλλά και ότι άλλοι είναι πολύ όμοιοι σε μεταγραφικό (transcriptosome) επίπεδο παρά τις μορφολογικές διαφορές τους (π.χ. το σωληνώδες και το λοβιακό καρκίνωμα). Επιπλέον, όταν μελετήθηκαν λοβιακά καρκινώματα με βάση το γονιδιακό τους προφίλ, ταξινομήθηκαν σε όλους τους μοριακούς τύπους, ενώ πολλοί άλλοι ειδικοί τύποι ταξινομήθηκαν ο καθένας σε έναν μοριακό υποτύπο (σωληνώδες, βλεννώδες, ενδοκρινικό και μικροθηλώδες καρκίνωμα στους αυλικού τύπου ενώ το μυελοειδές, το αδενοειδές κυστικό και το μεταπλαστικό στους βασικού τύπου).

Το μοριακό προφίλ πιθανόν να χρησιμεύει επίσης στη βελτίωση της ιστολογικής βαθμολόγησης του διηθητικού καρκινώματος του μαστού. Δύο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ενώ οι όγκοι ιστολογικού βαθμού I και III έχουν διακριτά χαρακτηριστικά, ενώ δεν υπάρχει χαρακτηριστική έκφραση για τους όγκους ιστολογικού βαθμού II. Στις μελέτες αυτές εφαρμόζοντας γονοτυπική βαθμολόγηση στους όγκους ιστολογικού βαθμού II, μπόρεσαν να ξεχωρίσουν από το υποσύνολο μια υποομάδα με καλύτερη πρόγνωση (όγκους παρόμοιους με τους ιστολογικού βαθμού I) και μια υποομάδα με χειρότερη πρόγνωση (όγκους παρόμοιους με τους ιστολογικού βαθμού III).

Πίνακας 3. Μοριακή ταξινόμηση καρκίνου του μαστού και συσχέτιση ανοσοφαινότυπου-γονότυπου.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΥΠΟΤΥΠΟΣ	ΠΡΟΦΙΛ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ/ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ
ΑΥΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ Α	ER(+) ή/και PR(+), HER-2(-) Ki67 (<14%)	ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΣΕ ΑΥΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ Α Η ΑΝΤΑΠΟΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΤΑΜΟΞΙΦΕΝΗ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΔΙΑΦΕΡΕΙ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ Α ΚΑΙ Β
ΑΥΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ Β	ER(+) ή/και PR(+), HER-2(+) [υποομάδα αυλικού τύπου-HER-2] ER(+) ή/και PR(+), HER-2(-) και υψηλό Ki67 (>14%)	ΑΥΛΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ Β: ΤΑΣΗ ΓΙΑ ΧΕΙΡΟΤΕΡΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟ ΒΑΘΜΟ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΠΟΙΚΙΛΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ (ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΤΟΥ Β)
HER-2	ER(-) PR(-) και HER-2(+)	ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ TRASTUZUMAB ΚΑΙ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΕ ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΗ ΓΕΝΙΚΑ ΚΑΚΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΕΡΑ ΥΨΗΛΟΥ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ
ΒΑΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ	ER(-), PR(-), HER-2(-), CK5/6(+) ή/και EGFR(+)	ΜΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΑ ΣΕ ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή TRASTUZUMAB ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΠΛΑΤΙΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ PARP ΓΕΝΙΚΑ ΚΑΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΗ (ΟΧΙ ΓΙΑ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ) ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ BRCA1

A.7. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού γίνεται σύμφωνα με το σύστημα TNM (International Union Against Cancer), βάσει του οποίου η ανατομική έκταση της νόσου καθορίζεται μετά από αξιολόγηση τριών στοιχείων: της έκτασης του πρωτοπαθούς όγκου (T), της παρουσίας ή απουσίας επιχωρίων λεμφαδενικών μεταστάσεων και της έκτασης αυτών (N) και τέλος της παρουσίας ή απουσίας απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Επί ταυτόχρονης παρουσίας πολλαπλών όγκων στον ένα μαστό, χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση ο όγκος με την υψηλότερη T κατηγορία (**Πίνακας 4**). Επί ταυτόχρονης παρουσίας αμφοτερόπλευρων καρκινωμάτων του μαστού, η ταξινόμηση γίνεται σε κάθε μαστό ξεχωριστά, ώστε να είναι δυνατός ο περαιτέρω διαχωρισμός των περιπτώσεων αναλόγως ιστολογικού τύπου. Παρακάτω παρατίθεται η σταδιοποίηση με βάση την αναθεωρημένη έκδοση της AJCC (American Joint Committee on Cancer) (Singletary και Connolly 2006).

Πίνακας 4. Κλινική σταδιοποίηση-ομαδοποίηση.

Στάδιο	TNM
0	TisN0M0
I	T1N0M0
IIA	T0N1M0 T1N1M0 T2N0M0
IIB	T2N1M0 T3N0M0
IIIA	T0N2M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N1M0 T3N2M0
IIIB	T4,κάθε N,M0 Οποιοδήποτε T,N3,M0
IV	Οποιοδήποτε T, οποιοδήποτε N,M1

Πρωτοπαθής όγκος [Primary Tumor (T)]

Tx- Ο πρωτοπαθής όγκος δεν δύναται να προσδιοριστεί

T₀- Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου

T_{is}- Καρκίνωμα in situ

Tis (DCIS)- Πορογενές καρκίνωμα in situ

Tis (LCIS)- Λοβιακό καρκίνωμα in situ

Tis (Paget)- Νόσος Paget της θηλής απουσία όγκου (η νόσος Paget που συνυπάρχει με καρκίνο κατηγοριοποιείται με βάση το μέγεθος του όγκου)

T₁- Όγκος μέγιστης διαμέτρου ≤ 2

T_{1mic}- Μικροδιήθηση, μέγιστης διαμέτρου $\leq 0,1$ cm

T_{1a}- Όγκος μέγιστης διαμέτρου $>0,1$ cm - $\leq 0,5$ cm

T_{1b}- Όγκος μέγιστης διαμέτρου $>0,5$ cm - ≤ 1 cm

T_{1c}- Όγκος μέγιστης διαμέτρου >1 cm - ≤ 2 cm

T₂- Όγκος μέγιστης διαμέτρου >2 cm - ≤ 5 cm

T₃- Όγκος μέγιστης διαμέτρου >5 cm

T₄- Όγκος που επεκτείνεται στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα, ανεξαρτήτως μεγέθους

T_{4a}-Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα

T_{4b}-Οίδημα (συμπεριλαμβανομένης της εικόνας «φλοιού πορτοκαλιού») ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή δορυφορικά δερματικά οζίδια εντοπισμένα στον ίδιο μαστό

T_{4c}-T_{4a} και T_{4b} ταυτοχρόνως

T_{4d}-Φλεγμονώδες καρκίνωμα

Επιχώριοι Λεμφαδένες [Regional Lymph Node (N)]

Ως επιχώριοι λεμφαδένες θεωρούνται οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες (επιπέδου I-III) συμπεριλαμβανομένων των λεμφαδένων που ανευρίσκονται εντός του μαστικού αδένα, οι ομόπλευροι έσω μαστικοί λεμφαδένες καθώς και οι ομόπλευροι υπερκλείδιοι και υποκλείδιοι λεμφαδένες. Οποιαδήποτε άλλη λεμφαδενική μετάσταση χαρακτηρίζεται ως απομακρυσμένη μετάσταση (M1), συμπεριλαμβανομένων των μεταστάσεων στους υπερκλείδιους τραχηλικούς και ετερόπλευρους έσω μαστικούς λεμφαδένες.

N_x- Δεν είναι δυνατή η εκτίμηση των επιχώριων λεμφαδένων (π. χ εάν έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί)

N₀- Δεν παρατηρείται μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες

N₁-Μετάσταση σε ευκίνητο ομόπλευρο μασχαλιαίο λεμφαδένα(ες)

N₂-Μετάσταση σε ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες καθηλωμένους μεταξύ τους ή σε κλινικά εμφανείς ομόπλευρους λεμφαδένες της έσω μαστικής, απουσία κλινικών ενδείξεων μετάστασης στους μασχαλιαίους αδένες.

N_{2a}-Μετάσταση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες(α) καθηλωμένους μεταξύ τους ή σε άλλες δομές

N_{2b}- Μετάσταση μόνο σε κλινικά εμφανείς λεμφαδένες της έσω μαστικής και απουσία κλινικών στοιχείων μετάστασης μασχαλιαίων λεμφαδένων.

N₃- Μετάσταση σε ομόπλευρο(ους) υποκλείδιο(ους) λεμφαδένα(ες) με ή χωρίς ανάμιξη μασχαλιαίων λεμφαδένων, ή σε κλινικά εμφανή(είς) ομόπλευρο(ους) λεμφαδένα(ες) της έσω μαστικής, παρουσία κλινικών στοιχείων μετάστασης μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μετάσταση σε ομόπλευρο(ους) υπερκλείδιο(ους) λεμφαδένα(ες) με ή χωρίς συμμετοχή μασχαλιαίων λεμφαδένων της έσω μαστικής

N_{3a}- Μετάσταση σε υποκλείδιο(ου2) λεμφαδένα(ες)

N_{3b}-Μετάσταση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες και λεμφαδένες της έσω μαστικής.

N_{3c}- Μετάσταση σε υπερκλείδιο(ους) λεμφαδένα(ες).

Παθολογοανατομική ταξινόμηση (pTN)

pT- Πρωτοπαθής όγκος

Η παθολογοανατομική ταξινόμηση προϋποθέτει την εξέταση του πρωτοπαθούς καρκινώματος, χωρίς μακροσκοπικό όγκο στα όρια εκτομής. Μια περίπτωση μπορεί να ταξινομηθεί ως pT, εάν μόνο μικροσκοπικός όγκος παρατηρείται στα όρια εκτομής. Οι pT κατηγορίες ανήκουν στις T κατηγορίες. Η pT ταξινόμηση ενός όγκου αντιστοιχεί στη μέτρηση του διηθητικού στοιχείου. Εάν παρατηρείται εκτεταμένο in situ στοιχείο (π.χ. 4cm) και μικρό διηθητικό στοιχείο (π.χ. 0,5 cm) ο όγκος ταξινομείται ως pT1a.

pN- Επιχώριοι λεμφαδένες

Η παθολογοανατομική ταξινόμηση των λεμφαδενικών μεταστάσεων, προϋποθέτει την εκτομή και εξέταση, τουλάχιστον των μασχαλιαίων λεμφαδένων επιπέδου I, που συνήθως περιλαμβάνει 6 ή περισσότερους λεμφαδένες.

pNx- Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν δύναται να εκτιμηθούν (π.χ. αν έχουν προηγουμένως εξαιρεθεί ή εάν δεν έχουν εξαιρεθεί για παθολογοανατομική εξέταση)

pN0- Δεν παρατηρείται μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες

pNo(i)-Δεν παρατηρείται μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες, αρνητική ανοσοϊστοχημική χρώση.

pNo(i+)-Μετάσταση σε απομονωμένα καρκινικά κύτταρα ή θετική ανοσοϊστοχημική χρώση, με αθροίσεις όχι πάνω από 2mm.

pNo(mol-)- Δεν παρατηρείται μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες, αρνητικά μοριακά ευρήματα (RT-PCR).

- pNo(mol+)- Δεν παρατηρείται μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες, θετικά μοριακά ευρήματα (RT-PCR).
- pN₁- Μετάσταση σε 1-3 ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες και/ ή σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικροσκοπική μετάσταση να ανιχνεύεται μέσω λεπτομερούς εξέτασης των λεμφαδένων.
- pN_{1mi}-Μικρομετάσταση (μεγαλύτερη από 0,2 mm αλλά ως 2mm) φρουρών αλλά όχι κλινικά εμφανής.
- pN_{1a}-Μετάσταση σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες.
- pN_{1b}-Ανίχνευση λεμφαδένων της έσω μαστικής με μικροσκοπική μετάσταση μέσω λεπτομερούς εξέτασης των λεμφαδένων- φρουρών αλλά όχι κλινικά εμφανής.
- pN_{1c}-Μετάσταση σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και λεμφαδένες της έσω μαστικής, με τη μικροσκοπική μετάσταση να ανιχνεύεται μέσω λεπτομερούς εξέτασης των λεμφαδένων-φρουρών αλλά όχι κλινικά εμφανής.
- pN₂- Μεταστάσεις σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε κλινικά εμφανείς ομόπλευρους λεμφαδένες της έσω μαστικής, απουσία μετάστασης σε μασχαλιαίους λεμφαδένες.
- pN_{2a}-Μετάσταση σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες, συμπεριλαμβανομένης τουλάχιστον μιας μεγαλύτερης των 2mm.
- pN_{2b}-Μετάσταση σε κλινικά εμφανείς λεμφαδένες της έσω μαστικής, απουσία μετάστασης σε μασχαλιαίους λεμφαδένες
- pN₃- Μετάσταση σε 10 ή περισσότερους ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε υποκλειδίους λεμφαδένες ή σε κλινικά εμφανείς ομόπλευρους λεμφαδένες της έσω μαστικής παρουσία ενός ή περισσότερων θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή σε άνω των 3 μασχαλιαίων λεμφαδένων με κλινικά αρνητική, μικροσκοπική μετάσταση σε λεμφαδένες της έσω μαστικής ή σε ομόπλευρους υπερκλειδίους λεμφαδένες.
- pN_{3a}-Μετάσταση σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες (τουλάχιστον μια μεγαλύτερη των 2mm) ή μετάσταση σε υποκλειδίους λεμφαδένες.
- pN_{3b}-Μετάσταση σε κλινικά εμφανή(εις) λεμφαδένα(ες) της έσω μαστικής παρουσία ενός ή περισσότερων θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μετάσταση σε άνω των 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικροσκοπική μετάσταση που ανιχνεύεται μέσω λεπτομερούς εξέτασης των λεμφαδένων-φρουρών αλλά όχι κλινικά εμφανής.
- pN_{3c}-Μετάσταση σε υπερκλειδίο(ους) λεμφαδένα(ες).

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

M_x- Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν δύναται να εκτιμηθεί

M₀- Δεν παρατηρούνται απομακρυσμένες μεταστάσεις

M₁- Απομακρυσμένες μεταστάσεις (συμπεριλαμβανομένων των μεταστάσεων σε υπερκλείδιους τραχηλικούς λεμφαδένες).

A.8. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο καρκίνος του μαστού είναι πολύπλοκη νόσος λόγω της βιολογικής ετερογένειας, της τάσης απόκτησης χημειοανθεκτικότητας και της παρουσίας αρκετών μοριακών μηχανισμών οι οποίοι μέσω ενδοκρινών, αυτοκρινών ή παρακρινών μονοπατιών επηρεάζουν την αύξηση, την εξέλιξη και την ανάπτυξη μεταστάσεων. Οι λόγοι αυτοί εξηγούν γιατί το TNM ή άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές ταξινομήσεις δεν παρουσιάζουν απόλυτη προγνωστική αξία. Πρέπει λοιπόν να προσδιορισθούν μοριακοί παράγοντες που να σχετίζονται με μεγαλύτερη ή μικρότερη επιβίωση ανεξάρτητα της θεραπείας (*προγνωστικοί δείκτες*) ή να υποδεικνύουν ασθενείς οι οποίες θα ωφεληθούν λιγότερο ή περισσότερο από τη θεραπεία (*προβλεπτικοί δείκτες*).

Χαρακτηριστικά ενός χρήσιμου προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο του μαστού

Ένας δείκτης έχει προγνωστική αξία εφόσον ο καθορισμός του κατά τη διάγνωση, δίνει πληροφορίες αναφορικά με τη φυσική ιστορία της νόσου.

Κλινική χρήση ενός προγνωστικού δείκτη:

- Δίδει απάντηση στο ερώτημα των ασθενών σχετικά με τη μελλοντική εξέλιξη της νόσου τους
- Καθορίζει την πιθανότητα υποτροπής και/ή θανάτου μετά τη χειρουργική θεραπεία
- Οδηγεί στη λήψη απόφασης για τις μεθόδους και τα μεσοδιαστήματα παρακολούθησης
- Εντοπίζει μεταξύ ασθενών του αυτού σταδίου, υποκατηγορίες ασθενών με διαφορετική έκβαση

Προϋποθέσεις:

- Ένας αμιγής προγνωστικός δείκτης πρέπει να εξετάζεται σε σειρές ασθενών που δεν λαμβάνουν συστηματική θεραπεία, προκειμένου οι πληροφορίες που λαμβάνονται να αφορούν στη φυσική ιστορία της νόσου.
- Ένας δείκτης ο οποίος σχετίζεται με ένα μοριακό μηχανισμό που συμμετέχει στην αύξηση ή μετάσταση ενός όγκου, έχει κλινική χρησιμότητα, εφόσον προσθέτει στατιστικά σημαντικές ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες, όταν αξιολογείται με σύστημα πολυπαραγοντικής

ανάλυσης, στο οποίο περιλαμβάνονται οι συμβατικές κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι, στο πλαίσιο προοπτικών μελετών, όπου χρησιμοποιούνται ομάδες μαρτύρων.

Χαρακτηριστικά ενός χρήσιμου προβλεπτικού δείκτη στον καρκίνο του μαστού

Ένας δείκτης έχει προβλεπτική αξία, εφόσον ο καθορισμός του πριν από μια συγκεκριμένη θεραπεία, δίδει πληροφορίες για την πιθανότητα η ασθενής να ωφεληθεί ή όχι από τη θεραπεία αυτή.

Κλινική χρήση ενός προβλεπτικού δείκτη:

- Προβλέπει την ανταπόκριση ή την αντοχή σε συγκεκριμένη θεραπεία.
- Βελτιώνει την εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση επιλέγοντας την καλύτερη θεραπευτική αγωγή, στην οποία ο όγκος θα πρέπει να ανταποκριθεί.
- Απαλλάσσει τους ασθενείς από μη αναγκαία έκθεση στην τοξικότητα και στις παρενέργειες θεραπευτικών αγωγών, στις οποίες οι αντίστοιχοι όγκοι θα παρουσιάσουν αντοχή.

Προϋποθέσεις:

- Νεοεπιχειρητική θεραπεία: Ένας νέος προβλεπτικός δείκτης πρέπει να εξετάζεται σε σειρές ασθενών κατάλληλες για μελέτες προεγχειρητικής θεραπείας. Η ανάλυση της σχέσης ανάμεσα στην έκφραση/στα επίπεδα ενός δείκτη και σε τοποπεριοχικές μετρήσιμες αλλοιώσεις, μπορεί να αξιολογείται σε βραχύ χρονικό διάστημα. Ωστόσο, πρέπει να επιβεβαιώνεται εάν η αντικειμενική απάντηση προβλέπει μακροχρόνια κλινική έκβαση.
- Επιχειρητική θεραπεία: Ένας νέος προβλεπτικός δείκτης μπορεί να εξετάζεται σε ασθενείς που λαμβάνουν επιχειρητική θεραπεία. Η ανάλυση της συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση ή στα επίπεδα του δείκτη και στην κλινική έκβαση (ελευθέρα νόσου επιβίωση, ολική επιβίωση) απαιτεί μακροχρόνια παρακολούθηση και προοπτικές κλινικές μελέτες με χρήση ομάδων μαρτύρων.

Σύμφωνα με ομάδα κλινικών ιατρών, παθολογοανατόμων και στατιστικολόγων, το Κολέγιο των Παθολογοανατόμων της Αμερικής (1999), ταξινόμησε τους προγνωστικούς και προβλεπτικούς παράγοντες του καρκίνου του μαστού σε τρεις κατηγορίες:

Κατηγορία I: Παράγοντες με αποδεδειγμένη προγνωστική αξία και χρησιμότητα στην αντιμετώπιση των ασθενών: TNM σταδιοποίηση, ιστολογικός βαθμός κακοηθείας, ιστολογικός τύπος, μιτωτικοί δείκτες και έκφραση ορμονικών υποδοχέων.

Κατηγορία II: Παράγοντες, οι οποίοι έχουν εκτενώς μελετηθεί βιολογικά και κλινικά, αλλά η αξία τους πρέπει να τεκμηριωθεί με στατιστικές μελέτες: c-erbB-2 (Her2-neu), δείκτες πολλαπλασιασμού, λεμφική και αγγειακή διήθηση και βλάβη στο γονίδιο p53.

Κατηγορία III: Υπόλοιποι παράγοντες, οι οποίοι δεν έχουν μελετηθεί ικανοποιητικά: πλοειδία

DNA, μικροαγγειακή πυκνότητα, υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF)- α , bcl-2, pS2 και καθεψίνη D (Fitzgibbons και συν. 2000).

Ακολουθεί η περιγραφή των κυριότερων προγνωστικών/προβλεπτικών παραγόντων στον καρκίνο του μαστού. Για διευκόλυνση, οι παράγοντες αυτοί διαχωρίζονται σε μορφολογικούς, η πλειονότητα των οποίων προσδιορίζεται στο πλαίσιο της καθημερινής ιστοπαθολογοανατομικής εξέτασης και σε βιολογικούς, ο προσδιορισμός των οποίων απαιτεί την εφαρμογή βιοχημικών, ανοσοϊστοχημικών και μοριακών τεχνικών.

A8.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΙ - ΣΥΜΒΑΤΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ: Το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου αντανακλά τη φυσική ιστορία της νόσου και καθίσταται πιο ισχυρός προβλεπτικός δείκτης της επιβίωσης όταν προστίθεται στην κατάσταση των μασχαλιαίων λεμφαδένων σε πολυπαραγοντικά στατιστικά μοντέλα (Page και συν. 1998, Fitzgibbons και συν. 2000).

Το μέγεθος του καρκινώματος παραδοσιακά προσδιορίζεται από τη μέτρηση, μακροσκοπικά, των τριών διαστάσεων του όγκου με τη μεγαλύτερη διάσταση να χρησιμοποιείται για σκοπούς σταδιοποίησης. Η μέθοδος αυτή προτιμάται για μεγάλα καρκινώματα, ενώ για μικρότερους όγκους η μέτρηση από την ιστολογική τομή οδηγεί σε πιο ακριβή εκτίμηση (Fitzgibbons και συν. 2000). Η μακροσκοπική μέτρηση πολλές φορές υπερεκτιμά το μέγεθος του όγκου, ιδιαίτερα όταν υπάρχει πυκνή δεσμοπλαστική αντίδραση και όταν συνυπάρχει διηθητικό και μη διηθητικό καρκίνωμα. Το μέγεθος του διηθητικού στοιχείου θεωρείται καλύτερος προβλεπτικός δείκτης της συμμετοχής των λεμφαδένων σε σχέση με το ολικό μέγεθος (in situ+διηθητικό στοιχείο (Page και συν. 1998). Ο Ackerman (1998) υποστηρίζει ότι μόνο το διηθητικό στοιχείο αντανακλά τη μεταστατική ικανότητα του καρκινώματος.

Οι Sloanes και συν. (2001) υποστηρίζουν ότι όταν το πορογενές in situ στοιχείο εκτείνεται περισσότερο από 1 mm από την άκρη του διηθητικού, πρέπει δυο μετρήσεις να δίνονται: μία για το διηθητικό στοιχείο και μια άλλη για το σύνολο του όγκου συμπεριλαμβανομένης της in situ αλλοίωσης. Η τελευταία αυτή μέτρηση επιτρέπει τον προσδιορισμό καρκινωμάτων με εκτεταμένο ενδοπορικό στοιχείο.

Το μέγεθος του όγκου θεωρείται ισχυρός προγνωστικός δείκτης. Αυτό ισχύει όχι μόνο για τα πορογενή και λοβιακά καρκινώματα, αλλά και για τους πιο σπάνιους ειδικούς υποτύπους. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η επιβίωση των ασθενών μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους του όγκου και ότι υπάρχει σύμπτωση με την αύξηση των μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων (Rosen και συν. 1993, Adair και συν. 1974, Say και συν. 1974). Η συχνότητα των λεμφαδενικών μεταστάσεων σε ασθενείς με μέγεθος όγκου <1 cm είναι 10-20%, ενώ ασθενείς με

αρνητικούς λεμφαδένες και όγκους <1 cm εμφανίζουν 10ετή επιβίωση ελεύθερας νόσου στο 90% των περιπτώσεων (Rosen και συν. 1993, Kollias και συν. 1997).

Όταν καρκινώματα μαστού σταδίου T1 (≤ 2 cm) κατηγοριοποιούνται σε ομάδες με μέγεθος όγκου 5 mm, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ μεγέθους όγκου και συχνότητας λεμφαδενικών μεταστάσεων. Οι Roger και συν. (1989), μελετώντας μια σειρά 534 ασθενών, αναφέρουν την ακόλουθη σημαντική ($p < 0,0001$) κατανομή της συμμετοχής των μασχαλιαίων λεμφαδένων σε σχέση με το μέγεθος του όγκου: 0-0,5 cm (3%), 0,6-1,0 cm (10%), 1,1-1,5 cm (21%) και 1,6-2,0 cm (35%).

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ: Οι ιστοπαθολογικές παράμετροι του τύπου του καρκινώματος και του βαθμού κακοηθείας έχουν εδραιωμένη προγνωστική σημασία (Page και συν. 1998). Η ανάλυση αυτών στηρίζεται σε υποκειμενικά εκτιμώμενα χαρακτηριστικά όπως ο πυρηνικός πλειομορφισμός ή και ο σχηματισμός αδένων, η δε κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση ιδιαίτερα ιστολογικά πρότυπα (ιδιαίτεροι τύποι καρκινωμάτων). Η αναγνώριση των ιστολογικών τύπων επιτρέπει τον καθορισμό ασθενών με ιδιαίτερα καλή πρόγνωση που συχνά πλησιάζει αυτή του γενικού πληθυσμού. Αντίθετα, η εύρεση υποομάδας ασθενών με κακή πρόγνωση μπορεί να προσδιορισθεί με προσεκτική εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (περίπου 25% των διηθητικών καρκινωμάτων) (Pereira και συν. 1995).

α. Ιστολογικός τύπος: Τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα αντιστοιχούν στο 80% περίπου των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, ενώ τα λοβιακά στο 10% αυτών (Ackerman 1998). Δεν παρατηρείται σημαντική προγνωστική διαφορά μεταξύ των διηθητικών πορογενών και διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων του μαστού.

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενός ειδικού τύπου καρκινώματος πρέπει να ανευρίσκονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% του όγκου. Όταν τα γνωρίσματα αυτά ανευρίσκονται σε ποσοστό 75-90%, ο συγκεκριμένος ιστολογικός τύπος δεν θεωρείται ότι απαντάται ως αμιγής μορφή, αλλά ως παραλλαγή (Fitzgibbons και συν. 2000). Μορφολογικές παραλλαγές των πορογενών με καλύτερη πρόγνωση είναι τα: σωληνώδες καρκίνωμα, μυελοειδές -αυστηρά οριζόμενο- καρκίνωμα, ηθμοειδές, καθαρά βλεννώδες, θηλώδες, αδenoειδές- κυστικό και εκκριτικό καρκίνωμα (Ackerman 1998). Μια παραλλαγή του λοβιακού (και συχνά του πορογενούς) καρκινώματος είναι το καρκίνωμα δίκην δακτυλίου (signet ring carcinoma) το οποίο σχετίζεται με εξαιρετικά κακή πρόγνωση. Δυσοίωνη πρόγνωση εμφανίζει και το φλεγμονώδες καρκίνωμα. Όγκοι για τους οποίους έχει υποστηριχθεί ότι παρουσιάζουν επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά από τα πορογενή, αλλά στην πραγματικότητα επιδεικνύουν μικρές διαφορές στους ρυθμούς επιβίωσης είναι τα πλακώδη καρκινώματα, τα μεταπλαστικά και τα καρκινώματα με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά (συμπεριλαμβανομένου του καρκινοειδούς όγκου).

β. Βαθμός κακοηθείας: Ο βαθμός κακοηθείας ενός καρκινώματος αποτελεί εκτίμηση της διαφοροποίησης αυτού. Σε πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της ολικής και της ελευθέρως-νόσου επιβίωσης σε προ- και μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Davis και συν. 1986). Η Ακαδημία των Παθολογοανατόμων της Αμερικής συστήνει την αξιολόγηση του βαθμού κακοηθείας όλων των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, εκτός του μυελοειδούς, το οποίο χαρακτηρίζεται από καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με αυτή που του προσδίδει ο βαθμός κακοηθείας (Fitzgibbons και συν. 2000).

Ο **πυρηνικός βαθμός κακοηθείας** αποτελεί την κυτταρολογική εκτίμηση των καρκινικών έναντι των φυσιολογικών πυρήνων και στηρίζεται στο βαθμό της πυρηνικής ατυπίας. Τα συστήματα των Black και Speer (1957) και Cutler και συν. (1969) χρησιμοποιούνται ευρέως. Σύμφωνα με αυτά, ο πυρηνικός βαθμός κακοηθείας διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: καλά διαφοροποιημένος, ενδιάμεσος και πτωχά διαφοροποιημένος. Η ακολουθία των αριθμών ανά βαθμό είναι ανάστροφη αυτής που χρησιμοποιείται στον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας. Είναι προτιμότερο να γίνεται αναφορά περιγραφικά και όχι αριθμητικά. Έχει αναφερθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ πυρηνικού βαθμού κακοηθείας και του κλάσματος της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου (SPF), με αποτέλεσμα ο πυρηνικός βαθμός να θεωρείται προβλεπτικός δείκτης υψηλού SPF ενός καρκινώματος (Dabbs 1993).

Ο **ιστολογικός βαθμός κακοηθείας** περιγράφει το μικροσκοπικό πρότυπο αύξησης ενός διηθητικού πορογενούς καρκινώματος καθώς επίσης και τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της διαφοροποίησης. Σε ένα σημαντικό αριθμό μελετών έχει δειχθεί ότι ασθενείς με υψηλό ιστολογικό βαθμό κακοηθείας ή πτωχά διαφοροποιημένο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων, ανάπτυξη υποτροπών και θάνατο από τη μεταστατική νόσο σε σχέση με τις χαμηλού βαθμού κακοηθείας ασθενείς (Rosen 1993). Οι Schumacher και συν. (1993) συνοψίζοντας την κλινική σημασία του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού μιας μικρής υποομάδας ασθενών με πολύ καλή πρόγνωση και αντίστοιχα, μια μικρής υποομάδας με πολύ κακή πρόγνωση.

Ο πυρηνικός και ιστολογικός βαθμός κακοηθείας δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες της πρόγνωσης ασθενών που διακρίνονται με βάση το στάδιο της νόσου, ειδικά για αυτές με αρνητικούς λεμφαδένες (Neville και συν. 1992). Ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας σχετίζεται επίσης με το διάστημα ελεύθερο νόσου και την ολική επιβίωση ανεξαρτήτως κλινικού σταδίου. Καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοηθείας εμφανίζουν πρόωμη αποτυχία θεραπείας, ενώ τα χαμηλού βαθμού παρουσιάζουν υποτροπές σε αργότερο χρόνο.

Διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων: Η διήθηση των επιχωρίων μασχαλιαίων

λεμφαδένων αποτελεί την ισχυρότερη παθολογοανατομική προγνωστική παράμετρο τόσο της ελευθέρως νόσου όσο και της ολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού (Fisher και συν. 1993, Veronesi και συν. 1995, Fitzgibbons και συν. 2000).

Γυναίκες με καρκίνο του μαστού και αρνητικούς λεμφαδένες έχουν 70-80% πιθανότητα μακροχρόνιας επιβίωσης χωρίς μεταστάσεις, ενώ οι ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις έχουν περίπου 80% πιθανότητα να εμφανίσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις σε κάποιο χρόνο. Η τελευταία ομάδα ασθενών ποικίλει στην πρόγνωση καθώς η επιβίωση εξαρτάται από το επίπεδο των διηθημένων λεμφαδένων (χαμηλό, μέσο, υψηλό), τον απόλυτο αριθμό (<4 έναντι ≥ 4), το ποσό του μεταστατικού όγκου, την παρουσία ή απουσία εξωαδενικής διασποράς και την παρουσία ή απουσία καρκινικών κυττάρων σε απαγωγά αγγεία (Ackerman 1998).

Ο απόλυτος αριθμός των διηθημένων αδένων εμφανίζει επίσης προγνωστική σημασία. Ασθενείς με 4 ή περισσότερους διηθημένους λεμφαδένες χαρακτηρίζονται από χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με εκείνους με λιγότερους από 4 λεμφαδένες (Fitzgibbons και συν. 2000).

Μικροσκοπικές εστίες (<2 mm) μεταστατικού καρκίνου μπορεί να βρεθούν στο 9-13% των περιπτώσεων με αρνητικούς λεμφαδένες με λήψη διαδοχικών τομών (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης). Με την εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας το ποσοστό αυξάνεται στο 15-20%, αλλά η προγνωστική σημασία αυτών των μικρομεταστάσεων παραμένει υπό αμφισβήτηση (de Mascarel και συν. 1992).

Η βιοψία του λεμφαδένα-φρουρού θεωρείται εναλλακτική του καθαρισμού της μασχάλης, για σκοπούς σταδιοποίησης, ενώ είναι ειδική και ευαίσθητη στην πρόβλεψη της κατάστασης των μασχαλιαίων λεμφαδένων (Krag και συν. 1998, Veronesi και συν. 1997). Η βιοψία του φρουρού-λεμφαδένα στηρίζεται στη λογική ότι σε περίπτωση μεταστατικής διασποράς του καρκίνου, ο λεμφαδένας-φρουρός θα είναι ο πρώτος που θα έχει παρουσιάσει διήθηση και επομένως η βιοψία του θα αποτελεί αξιόπιστο δείκτη του σταδίου της νόσου. Εκτός των άλλων η βιοψία του φρουρού-λεμφαδένα πιστεύεται ότι μειώνει τη νοσηρότητα που οφείλεται στην αφαίρεση των λεμφαδένων, αλλά δεν έχει αποδειχθεί η αξία της ως προγνωστικού δείκτη τόσο της ελευθέρως νόσου όσο και της ολικής επιβίωσης όπως συμβαίνει με τους μασχαλιαίους λεμφαδένες (Weaver και συν. 2000).

Προγνωστικός δείκτης Nottingham - NPI

Ο προγνωστικός δείκτης του Nottingham (Nottingham Prognostic Index-NPI) αναπτύχθηκε από τους Galea και συν. (1992). Ο NPI υπολογίζεται με βάση το μέγεθος του όγκου, την κατάσταση των λεμφαδένων και τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας [$0,2 \times$ μέγεθος του όγκου (σε cm)] + [στάδιο (λεμφαδένες, 1-3 βάσει του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων, όπου 1: μη

διηθημένος, 2: 1-3 διηθημένοι, 3: >3 διηθημένοι)] + [βαθμός κακοήθειας (τροποποιημένο σύστημα των Bloom και Richardson κατά Elston και Ellis, 1-3)]. Όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης, τόσο χειρότερη είναι η πρόγνωση των ασθενών.

Με βάση τον NPI διαμορφώνονται 3 ομάδες ασθενών ως προς την πρόγνωση: ομάδα καλής, μέτριας και φτωχής πρόγνωσης. Ασθενείς με χαμηλό δείκτη έχουν την ίδια δετή επιβίωση με το γενικό πληθυσμό, χωρίς επιπλέον του τοπικού ελέγχου αντιμετώπιση. Οι ασθενείς αυτές χαρακτηρίζονται από χαμηλό ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, αρνητικούς λεμφαδένες και μικρό μέγεθος του όγκου. Στις ασθενείς με άριστη πρόγνωση συμπεριλαμβάνονται και εκείνες με ενδιάμεσο βαθμό σε μία από τις 2 σημαντικότερες παραμέτρους, δηλ. ενδιάμεσο ιστολογικό βαθμό κακοηθείας ή περιορισμένο αριθμό θετικών λεμφαδένων. Το μέγεθος του όγκου έχει μικρότερη σημασία σ' αυτό το δείκτη. Ο παθολογοανατόμος δεν υποχρεούται να δίνει τον NPI στην ιστολογική αξιολόγηση, γεγονός μάλιστα αδύνατο όταν δεν συναποστέλλονται λεμφαδένες. Εντούτοις, πρέπει να δίνει όλες τις πληροφορίες, ώστε να μπορεί να υπολογισθεί ο NPI.

Άλλοι μορφολογικοί χαρακτήρες με προγνωστική αξία

Συνυπάρχον in situ στοιχείο. Είναι ο πλέον απλός, ωστόσο σημαντικός προγνωστικός καθοριστής του καρκίνου του μαστού. Τα in situ καρκινώματα είναι 100% ιάσιμα μετά από μαστεκτομή. Σε καρκινώματα πορογενούς τύπου που έχουν in situ και διηθητικό στοιχείο υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του τμήματος του διηθητικού στοιχείου και της πιθανότητας λεμφαδενικών μεταστάσεων. Το ποσό του in situ στοιχείου συσχετίζεται με την παρουσία πολυκεντρικότητας και έμμεσα με την πιθανότητα κρυφής διήθησης (Ackerman 1998). Πρέπει να σημειωθεί ότι αρκετές φορές οι in situ πορογενείς αλλοιώσεις του τύπου κομεδοκαρκινώματος μπορεί να συσχετισθούν με μεταστάσεις απουσία ανιχνεύσιμης διήθησης.

Νέκρωση του όγκου. Η νέκρωση του όγκου συνδέεται με αυξημένη παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και μειωμένη επιβίωση. Το χαρακτηριστικό αυτό συνδέεται συνήθως με όγκους υψηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (Ackerman 1998).

Αντίδραση στρώματος. Έχει βρεθεί ότι όγκοι με απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης στην περιφέρεια παρουσιάζουν σπανιότερα λεμφαδενικές μεταστάσεις και κατ' επέκταση καλύτερη πρόγνωση (Ackerman 1998). Αυτό δεν ισχύει για το μυελοειδές καρκίνωμα.

Ελάστωση. Έχει ειπωθεί ότι τα καρκινώματα μαστού χωρίς ελάστωση παρουσιάζουν μικρότερη ανταπόκριση στην ενδοκρινή θεραπεία σε σχέση με εκείνα με μακροσκοπική ελάστωση (Ackerman 1998).

Μικροαγγειακή πυκνότητα. Τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα που έχουν κυρίαρχο αγγειακό στοιχείο στο περιβάλλον στρώμα συμπεριφέρονται περισσότερο επιθετικά από τα

υπόλοιπα καρκινώματα (Ackerman 1998). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί εδώ ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα είναι διαφορετική από την υπερπλασία των εντός του όγκου ενδοθηλιακών κυττάρων.

Διήθηση του δέρματος. Καρκινώματα μαστού με διήθηση του υπερκείμενου δέρματος συνδέονται με μειωμένη επιβίωση. Διήθηση των δερματικών λεμφαγγείων που χαρακτηρίζει το "φλεγμονώδες καρκίνωμα" είναι ιδιαίτερα δυσοίωνα σημάδι.

Διήθηση της θηλής. Η συμμετοχή της θηλής στον καρκίνο σχετίζεται με συχνότερη παρουσία μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Καρκινικά έμβολα. Η παρουσία καρκινικών εμβόλων στα λεμφαγγεία εντός του μαστού σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου. Η εύρεση εμβόλων στα αιμοφόρα αγγεία παρουσιάζει υψηλή σχέση με το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, ιστολογικό τύπο, κατάσταση λεμφαδένων, ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων και κακή πρόγνωση.

Νεότερα δεδομένα. Στη συνάντηση του St Gallen (2005) διέκριναν τις ασθενείς με εγχειρήσιμο καρκίνο μαστού σε 3 ομάδες κινδύνου (**Πίνακας 5**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία θετικών λεμφαδένων με απουσία υψηλού κινδύνου παραμέτρων δεν καθορίζει πλέον νόσο υψηλού κινδύνου (Goldhirsch και συν. 2005, Lonning 2007).

A.8.II ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

α. Οι **οιστρογονικοί υποδοχείς - ER** προσδιορίστηκαν στο τέλος της δεκαετίας του 1960 από την ικανότητά τους να δεσμεύουν ραδιοσημασμένα οιστρογόνα (Osborne 1998). Μέσα στα επόμενα 10 χρόνια κατέληξαν να χρησιμοποιούνται ως προβλεπτικός δείκτης της ανταπόκρισης στην ορμονική θεραπεία και της επιθετικότητας του όγκου (Osborne και συν. 1980). Οι ER απαιτούνται για την αύξηση που εξαρτάται από τη διέγερση με οιστρογόνα. Ανιχνεύονται στο 50-80% των καρκινωμάτων του μαστού, ενώ τα επίπεδα έκφρασής τους εξαρτώνται άμεσα από την ηλικία των ασθενών (Clark και συν. 1984). Οι περισσότερες ενδοκρινικές θεραπείες έχουν ως στόχο είτε να μειώσουν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων είτε να δεσμεύσουν άμεσα τους διαθέσιμους ER και να τους καταστήσουν μη-λειτουργικούς (Osborne 1998).

Συσχέτιση ER με κλινικές παραμέτρους: Σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των ER και της ιστοπαθολογίας του καρκίνου του μαστού περιγράφησαν για πρώτη φορά από τους Rosen και συν. (1975). Καρκινώματα με σημαντική λεμφοκυτταρική αντίδραση τείνουν να είναι ER αρνητικά. Η συχνότητα της ER θετικότητας στα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή των διηθητικών πορογενών. Η πλειοψηφία των σωληνωδών καρκινωμάτων έχει αναφερθεί ως ER αρνητικά. Τα βλεννώδη και τα θηλώδη καρκινώματα τείνουν να είναι ER θετικά.

Πίνακας 5. Ταξινόμηση ασθενών με εγχειρήσιμο καρκίνο μαστού σε ομάδες κινδύνου (Goldhirsch και συν. 2005).

Ομάδα κινδύνου	Χαρακτηριστικά Νόσου / Ασθενών
Χαμηλού	Αρνητικοί λεμφαδένες και όλα τα κάτωθι <ul style="list-style-type: none"> • $pT \leq 2\text{cm}$ • Βαθμός κακοήθειας 1 • Απουσία περικαρκινικής αγγειακής διήθησης • Απουσία υπερέκφρασης ή ενίσχυση του HER-2 • Ηλικία ≥ 35 ετών
Ενδιάμεσου	Αρνητικοί λεμφαδένες και τουλάχιστον ένα από τα κάτωθι <ul style="list-style-type: none"> • $pT > 2\text{ cm}$ • Βαθμός κακοήθειας 2-3* • Περικαρκινική αγγειακή διήθηση • Υπερέκφραση ή ενίσχυση HER-2 • Ηλικία < 35 ετών <p style="text-align: center;">Ή</p> Θετικοί λεμφαδένες (1-3) και <ul style="list-style-type: none"> • Απουσία υπερέκφρασης ή ενίσχυσης HER-2
Υψηλού	Θετικοί λεμφαδένες (1-3) και <ul style="list-style-type: none"> • Υπερέκφραση ή ενίσχυση HER-2 Θετικοί λεμφαδένες (≥ 4)

*Ιστολογικός και/ή πυρηνικός βαθμός κακοήθειας

Χρησιμοποιώντας ως cut-off τα 3 fmol/mg πρωτεΐνης σχεδόν το 80% των μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι ER θετικά, ενώ το 50-60% των προ-εμμηνοπαυσιακών ασθενών εκφράζει ER σε ανιχνεύσιμα επίπεδα (Clark και συν. 1984). Η διαφορά αυτή σχετίζεται περισσότερο με την ηλικία διότι δεν έχει διαπιστωθεί σε μεγάλες μελέτες σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις των ER σε προ- και μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες της ίδιας ηλικίας (Clark και συν. 1984).

Έχει αποδειχθεί αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ πυρηνικού και ιστολογικού βαθμού κακοήθειας και θετικότητας στους ER. Χαμηλού βαθμού κακοήθειας καρκινώματα είναι σχεδόν πάντα ER θετικά. Αντίθετα, όγκοι με χαρακτηρές πτωχής διαφοροποίησης όπως υψηλός ιστολογικός ή πυρηνικός βαθμός κακοήθειας, εκτεταμένη νέκρωση, ελάχιστη ή καθόλου ελάστωση και έντονη λεμφοειδή διήθηση είναι συχνά ER αρνητικά. Δεν έχουν βρεθεί συσχετίσεις με μέγεθος όγκου, λεμφική ή αγγειακή διήθηση ή διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων (Osborne 1998).

Σε αρκετές μελέτες αναφέρεται αρνητική συσχέτιση των ER με την κινητική του κυτταρικού κύκλου. Οι ER αρνητικοί όγκοι συνδέονται με υψηλή S-φάση σε DNA κυτταρομετρία ροής ή υψηλό δείκτη τριτωμένης θυμιδίνης. Σε μελέτη περισσότερων των

100.000 πρωτοπαθών καρκινωμάτων μαστού η αρνητικότητα των ορμονικών υποδοχέων συσχετίστηκε με υψηλό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wenger και συν. 1993). Όγκοι ER(+)/PR(+) παρουσίασαν μέση τιμή S-φάσης 4,3% σε σχέση με 11,2% των ER(-)/PR(-). Ενδιάμεσες τιμές παρατηρήθηκαν στους υπόλοιπους φαινότυπους.

ER ως προγνωστικός δείκτης: Παλαιότερα είχε διατυπωθεί η άποψη ότι ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και θετική έκφραση των ER παρουσιάζουν διπλάσιο χρόνο επιβίωσης από εκείνες με αρνητική ER έκφραση (Walt και συν. 1976). Τα ER θετικά καρκινώματα δίνουν μεταστάσεις συχνότερα στα μαλακά μόρια και οστά και λιγότερο στο ήπαρ και εγκέφαλο. Τα ER αρνητικά καρκινώματα διασπείρονται κυρίως στα σπλαγγχικά όργανα και στο ΚΝΣ (Osborne 1991). Επομένως, τα ER θετικά και ER αρνητικά καρκινώματα είναι βιολογικά διαφορετικά, όχι μόνο λόγω της διαφορετικής απαίτησης για αύξηση σε οιστρογόνα αλλά και της τάσης για συγκεκριμένες μεταστατικές θέσεις (Osborne 1998).

Η σχέση των ER με την πρόγνωση των ασθενών αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1977 (Knight και συν. 1977). Οι ER θετικές ασθενείς βρέθηκε να χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και ολικής επιβίωσης σε σχέση με τις ER αρνητικές. Η παρατήρηση αυτή ίσχυε και για ασθενείς που δεν είχαν λάβει συστηματική θεραπεία. Σε άλλες μελέτες υποστηρίχθηκε η άποψη ότι τα ER αρνητικά καρκινώματα εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα πρώιμων υποτροπών από τα ER θετικά (Bishop και συν. 1979, Osborne 1991, Osborne 1998). Μεταγενέστερες μελέτες με μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρακολούθησης ασθενών διευκρινίζουν ότι η ευοίωνη πρόγνωση των ER θετικών ασθενών δεν είναι μόνιμη (Hähnel και συν. 1979, Aamdal και συν. 1984). Μετά από κάποια χρόνια στις ER θετικές ασθενείς ο ρυθμός υποτροπής αυξάνει με αποτέλεσμα η προγνωστική αξία των ER να εξαφανίζεται (Hilsenbeck και συν. 1996). Οι ER δεν σχετίζονται με το μεταστατικό δυναμικό αλλά με το ρυθμό αύξησης ενός καρκινώματος, γεγονός που εξηγεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται ώστε οι ER θετικές μεταστάσεις να εμφανιστούν κλινικά. Στο συμπέρασμα αυτό συνηγορεί και η απουσία συσχέτισης των ER με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Η τρέχουσα άποψη για τους ER είναι ότι αποτελούν ασθενή προγνωστικό δείκτη (Lonning 2007, Bentzon και συν. 2008). Η ευνοϊκή προγνωστική επίδραση της θετικότητας των ER στην ολική επιβίωση εξαφανίζεται μετά από 5-6 χρόνια ανεξάρτητα της επιπρόσθετης χημειοθεραπείας. Στη σύσκεψη του St Gallen (2005), οι ER δεν συμπεριλήφθησαν στα κριτήρια των ομάδων κινδύνου και θεωρήθηκαν μόνο ως προβλεπτικός παράγοντας (Bentzon και συν. 2008).

ER ως προβλεπτικός δείκτης: Από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση των ER συσχετίζεται με την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία, τόσο

την αφαιρετική όσο και την επιπρόσθετη (McGuire και συν. 1975, Osborne 1980, Osborne 1991). Το 60% των ER θετικών ασθενών επωφελούνται από την ορμονική θεραπεία σε σύγκριση με το 5-10% των ER αρνητικών. Η ανταπόκριση είναι υψηλότερη στις ασθενείς με συγκέντρωση $ER \geq 100$ fmol/mg ολικής πρωτεΐνης (Osborne 1980, Lippman και Allegra 1980). Ασθενείς με οριακά επίπεδα έκφρασης των ER μεταξύ 4 και 10 fmol παρουσιάζουν σημαντική απάντηση στην ορμονοθεραπεία.

Η κύρια κλινική σημασία των ER θεωρείται ότι είναι ο καθορισμός ομάδας ασθενών με μικρή ή καθόλου ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία και όχι ο προσδιορισμός ασθενών με τη μεγαλύτερη πιθανότητα ανταπόκρισης. Για το λόγο αυτό, ο καθορισμός των ορίων θετικότητας (cut-off) είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Ως θετική δοκιμασία θεωρείται η ελάχιστη ποσότητα ER η οποία θα συσχετισθεί με όφελος από την ορμονική θεραπεία. Περιστασιακές ανταποκρίσεις σε ER αρνητικές ασθενείς οφείλονται σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Osborne 1998). Ασθενείς με ελάχιστη ή μηδενική έκφραση των ER παρουσιάζουν αντίστοιχο μικρό ή καθόλου όφελος από τη χορήγηση ταμοξιφένης, ενώ οι ER θετικές ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και ολικής επιβίωσης (Osborne και συν. 1996). Ασθενείς ER θετικές που λαμβάνουν ταμοξιφένη για 5 χρόνια χαρακτηρίζονται από 40-50% ετήσια μείωση των πιθανοτήτων υποτροπής, ανεξάρτητα της εμμηνοπαυσιακής κατάστασης.

Επομένως, η κλινική σημασία της μέτρησης των ER στον καρκίνο του μαστού είναι η πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην επιπρόσθετη ορμονική θεραπεία. Οι ER αρνητικοί καρκινικοί όγκοι εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ενίσχυσης του c-erbB-2 γονιδίου, το οποίο έχει συσχετισθεί με αντίσταση στα θεραπευτικά σχήματα που περιέχουν κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη, 5-φλουορουρακίλη (CMF) και ευαισθησία στη δοξορουβικίνη και στις ταξάνες (Seidman και συν. 1996).

Παραλλαγές των ER στον καρκίνο του μαστού: Έχουν προσδιορισθεί παραλλαγές του mRNA των ER α , δίχως να γνωρίζουμε εάν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη (Clark και συν. 1995). Οι παραλλαγές αυτές του mRNA συνυπάρχουν με το φυσιολογικό mRNA. Έλλειμμα του εξονίου 7 της περιοχής δέσμευσης των οιστρογόνων οδηγεί σε αποκοπή του καρβοξυτελικού άκρου (Fuqua και συν. 1992). Η παραλλαγή αυτή είναι συχνή στις ER(+)/PR(-) ασθενείς, έχει αρνητική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα του κανονικού υποδοχέα και συνεισφέρει στη μετατροπή του όγκου σε μη ανταποκρινόμενο ορμονικά. Παραλλαγές του mRNA των ER α έχουν προσδιορισθεί σε προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις του μαστού, σχετίζονται με υπερευαισθησία στα οιστρογόνα και πιθανολογείται η συμμετοχή τους στην κακοήγη εξέλιξη του μαστού (Wiltshcke και συν. 1996).

Οιστρογονικός υποδοχέας ERβ: Το ανθρώπινο γονίδιο του ERβ χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 14q22-q24 και είναι αρκετά μικρότερο του ERα. Ο ERβ μοιράζεται όμοια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με τον ERα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων μέσω των EREs. Η περιοχή δέσμευσης με το DNA παρουσιάζει 97% ομολογία με εκείνη του ERα, η περιοχή δέσμευσής του συνδέτη 59%, η αρθρωτή περιοχή 30%, η A/B 17,5% και η F 17,9% (Enmark και συν. 1997). Συνολικά, ο ERβ επιδεικνύει 47% ομοιότητα με τον ERα. Ο ERβ είναι παρών σε αρκετούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, εντέρου, πνευμόνων, θύμου αδένα, σπλήνα, μυελού των οστών, υπόφυσης, όρχεως, ενδομητρίου, ωοθηκών και μαζικού αδένα. Η ιστική κατανομή δεν είναι όμοια με αυτή του ERα.

Ο ετεροδιμερισμός του ERα με τον ERβ έχει καταδειχθεί και υποδεικνύει αλληλεπίδραση των δύο οδών μεταγωγής σήματος. Η δράση της οιστραδιόλης εξαρτάται από τη σχετική έκφραση των δύο υποδοχέων σε συγκεκριμένο ιστό. Στον καρκίνο του μαστού έχει δείχθει ότι ο λόγος του ERα προς ERβ είναι υψηλότερος στα ER θετικά καρκινώματα σε σχέση με το φυσιολογικό μαστό (Leygue και συν. 1998). Οι ERβ έχουν ανιχνευθεί σε ER αρνητικά καρκινώματα και πιθανολογείται ότι εμπλέκονται στην ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία (Dotzlaw και συν. 1999). Ο ERβ παρουσιάζει διπλάσια χημική συγγένεια για την 4-υδροξυταμοξιφένη και το αντιοιστρογόνο ICI καθώς και για τα φυτικά προερχόμενα οιστρογόνα, όπως η γενιστεΐνη και κουμεστρόλη.

β. Προγεστερονικοί υποδοχείς- PR: Το γονίδιο των PR χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1 και η έκφρασή του ρυθμίζεται από τους ER. Η σύνθεση των PR αυξάνεται σε ιστούς οιστρογονο-εξαρτώμενους, όπως ο καρκίνος του μαστού. Έχει προταθεί ότι οι PR αποτελούν βέλτιστο δείκτη της ανταπόκρισης του όγκου στην ενδοκρινική θεραπεία, διότι η έκφρασή τους υποδηλώνει όχι μόνο παρόντες αλλά και λειτουργικούς ER (Osborne 1998). Οι PR μετρούνται με τις ίδιες μεθόδους όπως οι ER (Osborne 1991). ER(-)/PR(-) είναι περίπου το 25-30% των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού, ER(+)/PR(+) το 40%, ER(+)/PR(-) το 30% και <5% είναι ER(-)/ PR(+). Το επίπεδο των PR σχετίζεται με την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση των ασθενών και όχι την ηλικία τους. Οι προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα PR, τα οποία επάγονται από τις υψηλές συγκεντρώσεις των ER (Clark και συν. 1984). Καλά διαφοροποιημένοι όγκοι είναι περισσότερο πιθανό να είναι PR θετικοί. PR θετικά καρκινώματα συχνά μεταπίπτουν σε PR αρνητικά με την πάροδο του χρόνου και χαρακτηρίζονται από επιθετική βιολογική συμπεριφορά, απώλεια του ενδοκρινούς ελέγχου και μικρότερη επιβίωση (Gross και συν. 1984).

Η προγνωστική σημασία των PR στον καρκίνο του μαστού δεν έχει διασαφηνισθεί (Osborne 1991). PR θετικοί ασθενείς χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο

νόσου, αλλά στις μελέτες αυτές οι ασθενείς έχουν λάβει ορμονική θεραπεία. Είναι γνωστό ότι οι ER αποτελούν ασθενή προγνωστικό δείκτη κατ' επέκταση και οι PR μακροχρόνια καθίστανται ασθενής προγνωστικός δείκτης.

Η αξία των PR στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην ορμονική θεραπεία έχει μελετηθεί λιγότερο. Ασθενείς ER(-)/PR(+) παρουσίασαν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου επιβίωσης σε σύγκριση με τους ER(-)/PR(-). Η πραγματική αξία των PR έγκειται στην ικανότητα πρόβλεψης της ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία σε ασθενείς με μεταστατική νόσο. Η πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση της επιβίωσης 342 ER θετικών ασθενών με μεταστάσεις έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα PR συσχετίζονται με υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στην ταμοξιφένη, μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εμφάνισης αποτυχίας της θεραπείας και μακροχρόνια ολική επιβίωση (Ravdin και συν. 1992). Ασθενείς με χαμηλή, μέση και υψηλή συγκέντρωση σε PR ανταποκρίθηκαν κατά 43%, 53% και 61% αντίστοιχα στην ταμοξιφένη.

Υπάρχουν δύο ισομορφές των PR, οι PRA και PRB, οι οποίες προκύπτουν από διαφορετικά σημεία έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου (Clarke και συν. 1995). Κάθε ισομορφή δεσμεύεται τόσο στο DNA όσο και στην ορμόνη και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Οι PRA δρουν περισσότερο ως καταστολείς της προγεστερόνης, ενώ οι PRB ως εκτελεστές της δράσης αυτής (Wen και συν. 1994). Οι PRA και PRB συνεκφράζονται μέσα στα ίδια κύτταρα σε συγκρίσιμα ποσά, τόσο στο φυσιολογικό μαστό όσο και στην υπερπλασία δίχως ατυπία. Υπερίσχυση των PRA είναι εμφανής στα *in situ* πορογενή και διηθητικά καρκινώματα. Ο λόγος PRA:PRB πιθανόν να παίζει ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού αλλά και στον καθορισμό της ευαισθησίας στην ορμονοθεραπεία (Mote και συν. 2002).

γ. Οι **υποδοχείς αυξητικών παραγόντων** είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες. Αποτελούνται από τρεις περιοχές: την εξωκυττάρια στην οποία δεσμεύονται οι συνδέτες, τη διαμεμβρανική και μια ενδοκυττάρια με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Η οικογένεια αυτών απαρτίζεται από τέσσερα μέλη: EGFR, c-erbB-2, c-erbB-3, c-erbB-4 (Gallick και Srinivasan 1998).

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ή HER-1 ή c-erbB-1: Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 170 kDa. Οφείλει την ονομασία του στο γεγονός ότι προσδιορίστηκε για πρώτη φορά σε κύτταρα επιδερμοειδούς καρκινώματος (Krupp και συν. 1982). Το γονίδιο του *EGFR* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7p13.12. Ο υποδοχέας ενεργοποιείται από το συνδέτη EGF ή τον TGF α . Μετά τη δέσμευση του συνδέτη, ο υποδοχέας διμερίζεται και το γεγονός αυτό επάγει τη δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ο EGFR ανιχνεύεται στην πλειοψηφία των επιθηλιακών και μυοεπιθηλιακών κυττάρων του φυσιολογικού μαστού. Αυξημένα επίπεδα του EGFR έχουν βρεθεί στο 35-40% των καρκινωμάτων του μαστού (Sainsbury και συν. 1987), όπου δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με τον c-erbB-2, ενώ η συσχέτιση

με τους ορμονικούς υποδοχείς ήταν ανάστροφη. Η υπερέκφραση του υποδοχέα δεν οφείλεται σε γονιδιακή ενίσχυση, αλλά σε αυξημένα επίπεδα mRNA. Συνήθως δε συσχετίζεται με το μέγεθος του όγκου και τον ιστολογικό τύπο. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα έχουν βρεθεί στα βλεννώδη και σωληνώδη καρκινώματα. Τα ευρήματα διαφόρων ερευνών σχετικά με τη συσχέτιση με το βαθμό κακοήθειας, το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις είναι αντιφατικά. Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν θετική συσχέτιση με την ανευπλοειδία. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ασθενή συσχέτιση του EGFR με μειωμένη ελευθέρα νόσου ή ολική επιβίωση, με τάση να μειώνεται η προγνωστική σημασία όσο αυξάνεται ο χρόνος παρακολούθησης (Klijn και συν. 1992). Αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR, όπως το gefitinib δοκιμάζονται σε μελέτες τόσο προχωρημένου όσο και πρώιμου καρκίνου του μαστού. Αν και τα αποτελέσματα μέχρι τώρα δεν είναι τόσο ελπιδοφόρα, η αξιολόγηση του EGFR ως δείκτη επιλογής ασθενών για στοχευμένη θεραπεία απαιτεί βελτίωση στην προτυποποίηση των μεθόδων (Walker 2008).

HER-2/neu ογκοπρωτεΐνη ή c-erbB-2: Η ογκοπρωτεΐνη HER-2/neu έχει MW 185 KDa. Είναι υποδοχέας αυξητικού παράγοντα με 50% ομολογία προς τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Είναι προϊόν του γονιδίου *c-erbB-2*, το οποίο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 17q12-21.32. Προσδιορίστηκε για πρώτη φορά ως γονίδιο μετασχηματισμού στα νευροβλαστώματα αρουραίου, γι αυτό ονομάζεται *neu* (Bargman και συν. 1986). Η κυτταροπλασματική περιοχή επιδεικνύει λειτουργίες φωσφορυλίωσης και έναρξης μεταγραφής. Ο συνδέτης που ενεργοποιεί τον υποδοχέα HER-2 είναι μέχρι στιγμής άγνωστος. Γονιδιακή ενίσχυση από 2-20 φορές έχει ανιχνευθεί στο 30% των καρκινωμάτων του μαστού (Slamon και συν. 1987), συνοδευόμενη από υπερέκφραση σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης. Η ανοσοθετικότητα της HER-2/neu είναι υψηλότερη στα DCIS (40-70%) σε σχέση με τα διηθητικά καρκινώματα (25-30%) και εκφράζεται σε όλα τα DCIS που σχετίζονται με τη νόσο του Paget.

Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ της ενίσχυσης του HER-2 και δυσμενούς κλινικής πορείας αναφέρθηκε το 1987. Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί τουλάχιστον 48 προγνωστικές μελέτες που περιλαμβάνουν 15.000 ασθενείς (Slamon και συν. 1987). Στις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες η συσχέτιση μεταξύ HER-2/neu και επιβίωσης φαίνεται να είναι ασθενής (Andrulis και συν. 1998) με τις περισσότερες μελέτες να αποδεικνύουν απουσία σχέσης (Paterson και συν. 1991, Toikkanen και συν. 1992, Rosen και συν. 1995). Οι αρχικές μελέτες είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα εξ αιτίας της μεγάλης ποικιλίας αντισωμάτων που εφαρμόζονταν, της χρήσης αρχαιακού υλικού χωρίς μεθόδους αντιγονικής αποκάλυψης και της συμμετοχής ασθενών που ελάμβαναν επιπρόσθετη χημειοθεραπεία. Τα συμπεράσματα για τις ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες είναι περισσότερο ξεκάθαρα. Η πλειοψηφία των μελετών καταλήγει σε συσχέτιση

της υπερέκφρασης της HER-2/neu με χειρότερη πρόγνωση (Borg και συν. 1990, Toikkanen και συν. 1992, Tetu και Brisson 1994, Hanna και συν. 1999). Νεότερα δεδομένα συσχετίζουν την ενίσχυση ή υπερέκφραση με πτωχή επιβίωση σε ασθενείς με θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες αλλά πρώιμου σταδίου (Kronqvist και συν. 2004, Azambuja και συν. 2008).

Η τρέχουσα κλινική σημασία της εκτίμησης της HER-2/neu είναι διπλή: 1) Ως προβλεπτικός δείκτης της ανταπόκρισης στη θεραπεία ιδιαίτερα στη δοξορουβικίνη και 2) ως δείκτης υποομάδας ασθενών οι οποίες θα ανταποκριθούν σε μονοκλωνική θεραπεία. Οι Muss και συν. (1994) μελέτησαν την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία 1.572 ασθενών και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας με δοξορουβικίνη, κυκλοφωσφαμίδη και φλουορακίλη οδήγησαν σε σημαντικά καλύτερη ανταπόκριση των HER-2(θετικών) ασθενών σε σχέση με τις HER-2(αρνητικές). Οι Paik και συν. (1998), χρησιμοποιώντας αρχαιακό υλικό από το National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) και ως αντίσωμα μίγμα ενός μονοκλωνικού και ενός πολυκλωνικού αντισώματος υποστηρίζουν ότι οι HER-2(θετικές) ασθενείς επωφελούνται περισσότερο από τη θεραπεία με δοξορουβικίνη. Ύστερα από κλινικές μελέτες, αποδείχθηκε το 1998 η αποτελεσματικότητα του trastuzumab ως θεραπεία με μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τον υποδοχέα HER-2 και οδηγεί σε συρρίκνωση του όγκου όταν συνδυάζεται με χημειοθεραπεία (Slamon και συν. 1998, Pegram και συν. 1998). Το αντίσωμα αυτό αντιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα της ογκοπρωτεΐνης (Eisenhauer 2001). Το trastuzumab έχει δειχθεί ότι επιμηκύνει την ελεύθερα νόσου και ολική επιβίωση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (Slamon και συν. 2001). Αρκετές νεότερες τυχαίοποιημένες μελέτες προοπτικής έδειξαν ότι η επιπρόσθετη θεραπεία με trastuzumab μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής και θνησιμότητας σε ασθενείς με HER-2 θετικό καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου (Walker 2008). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην έγκρισή του ως επικουρική χρήση από το Εθνικό Ινστιτούτο του Ηνωμένου Βασιλείου (NICE-National Institute for Clinical Excellence της UK) (NICE 2006).

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος προσδιορισμού της HER-2 πρωτεΐνης εφαρμόστηκε από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, καθώς υπήρχαν διαθέσιμα αρκετά αντισώματα. Πρόσφατα, ο φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH) έχει εισαχθεί ως βασική μέθοδος αξιολόγησης του HER-2 καθώς σιάζει το πλεονέκτημα προσδιορισμού της γονιδιακής ενίσχυσης. Τομές ψυκτικού και παραφίνης καθώς και κυτταρολογικά παρασκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ανοσοϊστοχημεία όσο και για ISH(φθορίζοντα ή χρωμογόνο). Η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων είναι μεγαλύτερη του 90% (Tanner και συν. 2001, Tsuda και συν. 2001). Η εφαρμογή του FISH συνιστάται στις περιπτώσεις που βαθμολογούνται ανοσοϊστοχημικά ως 2+ ή βρίσκονται μεταξύ 2+ και 3+. Η χορήγηση της μονοκλωνικής θεραπείας αφορά αυστηρά τις ασθενείς με

γονιδιακή ενίσχυση και πρωτεϊνική υπερέκφραση. Σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες της ASCO / CAP καθώς και της UK NICE, θετικό αποτέλεσμα HER-2 θεωρείται όταν εκδηλώνει έντονη ολομεμβρανική χρώση σε ποσοστό >30% των καρκινικών κυττάρων (Wolff και συν. 2007).

δ. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να προσδιορισθεί με την **πλοειδία του DNA (DNA ploidy)** και το **κλάσμα αύξησης**. Το ποσό του DNA των καρκινικών κυττάρων αρχικά εκτιμήθηκε με τη χρώση Feulgen σε επιχρίσματα και εντυπώματα (Atkin και Kay 1979). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Παρατηρείται υψηλή συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών. Η πλειοψηφία των καρκινωμάτων παρουσιάζουν δυσθενή κατανομή των τιμών του DNA (Sven-Bojje και συν. 1984). Καρκινώματα σχεδόν διπλοειδικά τείνουν να είναι θετικά στους ορμονικούς υποδοχείς, ενώ τα ανευπλοειδή είναι κυρίως αρνητικά. Ο Frierson το 1991, ανασκοπώντας τη διεθνή βιβλιογραφία δεν ανέφερε συσχέτιση της DNA πλοειδίας με την ηλικία ή την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση των ασθενών, ενώ αντίθετα παρατηρείται στενή συσχέτιση μεταξύ πυρηνικού βαθμού κακοήθειας και πλοειδίας του DNA.

Ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων μαστού που χαρακτηρίζονται από χαμηλό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, όπως τα σωληνώδη, βλενώδη και θηλώδη καρκινώματα, είναι συνήθως διπλοειδή ενώ τα μυελοειδή, τα οποία θεωρούνται υψηλής κακοήθειας νεοπλασμάτα είναι γενικά ανευπλοειδή. Όσον αφορά το στάδιο της νόσου κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης αναφέρεται ασθενής συσχέτιση με την DNA πλοειδία, ενώ οι μεγάλοι μεγέθους όγκοι με λεμφαδενικές μεταστάσεις εμφανίζουν συχνά ανευπλοειδία (Cook και Weaver 1995).

Ο Ackerman (1998) συνοψίζοντας αρκετές μελέτες που συμπεριλαμβάνουν το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοήθειας, τη διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων και την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων συμπέρανε ότι η DNA πλοειδία δεν παρέχει ανεξάρτητη προγνωστική ή θεραπευτική πληροφορία, ενώ η ASCO 2007 δεν συστήνει την εκτίμησή της με κυτταρομετρία ροής στην κλινική πρακτική.

Η **κυτταρική υπερπλασία ή κλάσμα αύξησης** των καρκινωμάτων του μαστού έχει θεωρηθεί ως πιθανός δείκτης της βιολογικής επιθετικότητας του όγκου (Amadori και Silvestrini 1998). Η παράμετρος αυτή μετράται με τον κλασικό μιτωτικό δείκτη, το κλάσμα της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου καθώς και με ανοσοϊστοχημικό προσδιορισμό αντιγόνων του κυτταρικού κύκλου (Ackerman 1998). Το κλάσμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων κατά τη φάση S της σύνθεσης του DNA, μετρούμενο με το δείκτη της σημασμένης θυμιδίνης (Thymidine Labelling Index-TLI), έχει δειχθεί ότι συσχετίζεται σημαντικά με την πρόγνωση (Rosen 2001). Υψηλός TLI συνοδεύεται από υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης υποτροπών, πρώιμες υποτροπές και μικρότερη επιβίωση μετά την υποτροπή. Η δυσμενής επίδραση του TLI είναι ανεξάρτητη του σταδίου της νόσου κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης (Meyer και συν. 1986). Εν τούτοις, δεν θεωρείται

ανώτερος προγνωστικός δείκτης από τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (Tubiana και συν. 1989). Αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο TLI σε συνδυασμό με την ηλικία των ασθενών και το μέγεθος του όγκου έχει τη δυνατότητα προσδιορισμού ασθενών με διαφορετικούς κινδύνους τοπικής ή συστηματικής υποτροπής. Επίσης, αναφέρεται στενή συσχέτιση μεταξύ TLI και ανταπόκρισης στην πολυχημειοθεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού (Amadori και Silvestrini 1998).

Επειδή η ενσωμάτωση της ^3H -θυμιδίνης στο DNA απαιτεί νωπό υλικό και αξιολόγηση με αυτοραδιογραφία, η εκτίμηση της S φάσης του κυτταρικού κύκλου γίνεται πλέον με κυτταρομετρία ροής. Το κλάσμα της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου (S-phase fraction-SPF) αντικατοπτρίζει τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και ισοδυναμεί με τον TLI (Rosen 2001). Το SPF συσχετίζεται με την πλοειδία των κυττάρων, καθώς διπλοειδή καρκινώματα τείνουν να έχουν χαμηλό SPF συγκρινόμενα με τα ανευπλοειδή (Moran και συν. 1984). Καρκινώματα με υψηλό SPF συνήθως είναι ER αρνητικά (Moran και συν. 1984). Το SPF έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την πυρηνική και ιστολογική διαφοροποίηση των πορογενών καρκινωμάτων (Moran και συν. 1984). Σε αρχικές μελέτες δεν παρατηρήθηκε σύνδεση του SPF με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, ενώ σε μεταγενέστερες αναφέρεται υψηλό SPF σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες (Dressler και συν. 1988). Οι Dressler και συν. (1988) διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με διπλοειδή καρκινώματα και θετικούς λεμφαδένες είχαν υψηλότερη μέση τιμή του SPF σε σύγκριση με τους ασθενείς με διπλοειδή καρκινώματα και μη διηθημένους λεμφαδένες. Όταν ταυτόχρονα παρατηρείται θετική έκφραση των ER το SPF μειώνεται κατά 25%. Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν συσχέτιση μεταξύ υψηλού SPF και αυξημένου κινδύνου υποτροπών (Gnant και συν. 1992, Stal και συν. 1993, Campleijohn και συν. 1995), εν αντιθέσει με άλλους οι οποίοι δεν καταλήγουν σ' αυτό το συμπέρασμα (Stanton και συν. 1992).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών ασχολείται με την επίπτωση του SPF στην επιβίωση των ασθενών. Οι Wenger και Clark (1998) σχολιάζοντας τις μελέτες αυτές, αναφέρουν ότι σε 18 από 20 ερευνητικές εργασίες με μονοπαραγοντική και σε 14 από 19 με πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση οι ασθενείς με υψηλό SPF χαρακτηρίζονται από μειωμένη ολική επιβίωση. Όσον αφορά την ελεύθερη νόσου επιβίωση, 21 μελέτες ύστερα από μονοπαραγοντική και 17 μετά από πολυπαραγοντική στατιστική συσχέτιση καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα.

Βρομοδεοξουριδίνη (BrdU): Το νουκλεοτίδιο αυτό είναι ανάλογο της θυμιδίνης και ενσωματώνεται στο DNA κατά τη διάρκεια της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσληψη της BrdU μετά από in vivo χορήγηση στις ασθενείς (από το στόμα) ή από in vitro επώαση των ιστών, μπορεί να μετρηθεί στις ιστικές τομές με ανοσοϊστοχημεία με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος ή με πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με

εκείνα της θυμίδινης, ενώ ταυτόχρονα δεν απαιτείται η χρήση ραδιενεργών υλικών (Rosen 2001). Στη μελέτη των Rew και συν. (1992) δεν αναφέρεται συσχέτιση μεταξύ της BrdU και της διήθησης των επιχωρίων λεμφαδένων, του μεγέθους του όγκου και του βαθμού κακοήθειας. Οι Weidner και συν. (1993) συμπεραίνουν ότι η BrdU συσχετίζεται σημαντικά με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και το μιτωτικό δείκτη.

Οι δείκτες που ακολουθούν παρέχουν στατική μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συγκεκριμένο χρονικό σημείο και δεν αντικατοπτρίζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Ki-67: Το Ki-67 είναι αντίσωμα έναντι πυρηνικών στοιχείων μιας κυτταρικής σειράς που προέρχεται από λέμφωμα Hodgkin (Rosen 2001). Το αντίσωμα αντιδρά με πυρηνικό αντιγόνο που εκφράζεται στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ απουσιάζει από τα ήρεμα κύτταρα. Έχει βρεθεί στενή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Ki-67 και του SPF, του TLI, της BrdU, του MIB1 και του μιτωτικού δείκτη (Rosen 2001).

Στην αρχή της αντιγραφής του DNA το ποσό του Ki-67 είναι τόσο μικρό ώστε να δεν είναι ανιχνεύσιμο, ιδιαίτερα σε κύτταρα με μεγάλη G_1 φάση. Η μέση τιμή του Ki-67 στις καλοήθειες αλλοιώσεις του μαστού είναι 3-4% ενώ στα καρκινώματα ανεβαίνει στο 16-17%. Το Ki-67 σχετίζεται σημαντικά με το βαθμό κακοήθειας των περισσότερων καρκινωμάτων. Υψηλότερο Ki-67 εκφράζουν το πτωχά διαφοροποιημένα και διηθητικά πορογενή καρκινώματα με comedo χαρακτηριστικά. Τα διηθητικά λοβιακά και βλεννώδη καρκινώματα έχουν χαμηλό έως μέτριο κλάσμα Ki-67, ενώ τα μυελοειδή εκφράζουν το Ki-67 σε περισσότερο από 50-60% των κυττάρων τους. Ογκοί αρνητικοί για τους ορμονικούς υποδοχείς τείνουν να εκφράζουν υψηλότερα ποσοστά Ki-67. Η ανοσοδραστικότητα του Ki-67 δεν σχετίζεται με το στάδιο της νόσου. Αρκετές μελέτες με μικρό διάστημα παρακολούθησης ασθενών ή με μικρού μεγέθους ιστικά δείγματα, αναφέρουν σημαντική ανάστροφη συσχέτιση μεταξύ Ki-67 και επιβίωσης τόσο ολικής όσο και ελεύθερης νόσου (Rosen 2001). Αλλαγές στην έκφραση του Ki-67, που ακολουθούν τη χορήγηση ενδοκρινικής θεραπείας μπορούν να προβλέψουν μακροχρόνια επιβίωση. Η ενδοκρινική θεραπεία αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επομένως μείωση του Ki-67 υποδηλώνει αποτελεσματικές αποκρίσεις (Dowsett και συν. 2007). Το MIB1 είναι μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ανασυνδυασμένων περιοχών του Ki-67 αντιγόνου και εφαρμόζεται σε τομές παραφίνης με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων.

PCNA/cyclin: Είναι μια μη-ιστόνη πυρηνική πρωτεΐνη που λειτουργεί ως συνεργοποιητής της DNA πολυμεράσης και εκφράζεται στην όψιμη G_1 και S -φάση του κυτταρικού κύκλου. Αρκετά μονοκλωνικά αντισώματα είναι διαθέσιμα και μπορούν να εφαρμόζονται σε τομές παραφίνης. Η θετικότητα της PCNA συνδέεται σημαντικά με το SPF και είναι υψηλότερη στους ανευπλοειδείς όγκους. Σε μια μελέτη αναφέρεται συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό βαθμό

κακοήθειας και το μιτωτικό δείκτη, ενώ σε άλλες μελέτες αποκαλύπτεται σχέση μόνο με το μιτωτικό δείκτη (Ackerman 1998). Η PCNA παραμένει ασθενής δείκτης της πρόγνωσης, καθώς δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες παρακολούθησης μεγάλου αριθμού ασθενών.

Άλλοι δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οι οποίοι έχουν αξιολογηθεί ανοσοϊστοχημικά στον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν την κυκλίνη E, κυκλίνη D1, p21 και p27 αλλά δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για τη χρήση τους ως προβλεπτικούς δείκτες, εκτός της κλινικής έρευνας (Walker 2008).

ε. Στα ρυθμιστικά του κυτταρικού κύκλου εντάσσονται το p53, το p21 και οι κυκλίνες.

Το **ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53** και το πρωτεϊνικό του προϊόν είναι μέχρι στιγμής τα περισσότερα μελετημένα μόρια του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η πρωτεΐνη p53 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας (Farmer και συν. 1992). Ρυθμίζει την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση γονιδίων ως ένας διακόπτης “on-off”. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται μεταγραφικά περιέχουν στον υποκινητή τους ρυθμιστικά στοιχεία (αλληλουχίες) «σύμφωνα» με το p53, όπως τα ριβωσωμικά γονίδια, η μυϊκή κινάση της κρεατινίνης, το mdm-2 και το WAF-1 (Elledge και Allred 1998). Τα γονίδια που αναστέλλονται περιέχουν στον υποκινητή τους TATA αλληλουχίες (Elledge και Allred 1998). Η p53 πρωτεΐνη αναστέλλει την αντιγραφή του DNA και αποτελεί σημείο ελέγχου της προόδου του κυτταρικού κύκλου από την G1 στη S-φάση και από την G2 στη M (Lin και συν. 1992). Επομένως η φυσιολογική p53 επιβραδύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, εμπλέκεται στη διευκόλυνση της απόπτωσης και, έμμεσα, αναστέλλει τη μεταστατική διασπορά των καρκινωμάτων μέσω παρεμπόδισης της αγγειογένεσης (Bouck 1996).

Το γονίδιο *p53* συχνά απενεργοποιείται λόγω σημειακών μεταλλάξεων, ελλείμματος καθώς και δέσμευσης με άλλες πρωτεΐνες. Τα κύτταρα σ’ αυτή την περίπτωση υφίστανται μετασχηματισμό. Χαρακτηρίζονται από αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεγαλύτερη γενωμική αστάθεια και απώλεια ελέγχου της μετάβασης G1/S-φάση (Livingstone και συν. 1992). Απώλεια της λειτουργίας του *p53* έχει ως αποτέλεσμα την αντίσταση στην απόπτωση (Graeber και συν. 1996).

Στον καρκίνο του μαστού απενεργοποίηση του *p53* παρατηρείται στο 0-40% των μη διηθητικών καρκινωμάτων και στο 20-50% των διηθητικών (Elledge και Allred 1998). Πλειάδα μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν ασχοληθεί με τη συσχέτιση της απενεργοποίησης του *p53* με την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού. Η πλειοψηφία των μελετών αυτών δεν αφορά καθαρά προγνωστική αξιολόγηση, διότι βασίζεται σε μη ομοιογενείς πληθυσμούς ασθενών με ή χωρίς θεραπεία. Δεν υπάρχει σύμφωνη γνώμη ως προς την τεχνική εκτίμησης της απενεργοποίησης για την πιο ακριβή προγνωστική πληροφόρηση (Elledge 1996). Η

ανοσοϊστοχημεία μπορεί να προσδιορίσει σχεδόν όλες τις πρωτεΐνες που προκύπτουν από μεταλλάξεις με λάθος νόημα και συμβαίνουν στην κεντρική περιοχή του γονιδίου. Έχει όμως περιορισμένη ευαισθησία στις μεταλλάξεις αναγνωστικού πλαισίου που δίνουν μικρότερη (κολωβή) πρωτεΐνη ή σε αυτές που συμβαίνουν εκτός της κεντρικής περιοχής. Θετική ανοσοϊστοχημική αντίδραση της φυσιολογικής p53 πρωτεΐνης μπορεί να παρατηρηθεί είτε λόγω αυξομείωσης του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου, λόγω απάντησης σε βλάβη του DNA, λόγω σταθεροποίησης με άλλες πρωτεΐνες όπως η mdm2 είτε λόγω αποτυχίας των επανατροφοδοτικών μηχανισμών και των μονοπατιών αποδόμησης της πρωτεΐνης. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία προτυποποίησης των αποτελεσμάτων που οφείλεται στην ποικιλία των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται, στη διαφορετική μονιμοποίηση, στην υποκειμενικότητα της αξιολόγησης και στην απουσία καθορισμού της έννοιας "ανώμαλη έκφραση" (Jacobs και συν. 1996).

Οι τεχνικές που βασίζονται στη μελέτη του DNA είναι οι SSCP και CDGE με ευαισθησία 70-90% για τις μεταλλάξεις της κεντρικής περιοχής. Οι τεχνικές που αφορούν στο RNA παρουσιάζουν δυσκολίες καθώς το mRNA είναι ασταθές μόριο. Η μελέτη της αλληλουχίας (sequencing) της κωδικοποιούσας περιοχής για το p53 δεν επιτρέπει τη διερεύνηση άλλων μηχανισμών απενεργοποίησης εκτός των μεταλλάξεων. Μια μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία ή ημιζυγωτία και σε ποσοστό καρκινικών κυττάρων <20% του συνόλου, δεν μπορεί να προσδιορισθεί λόγω του μικρού λόγου σήματος προς θόρυβο.

Η έκφραση της p53 πρωτεΐνης έχει συσχετισθεί με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας, την απώλεια έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων, την υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 και την έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Poller και συν. 1992). Οι Barnes και συν. (1993) έδειξαν ότι οι ασθενείς, οι όγκοι των οποίων εξέφραζαν την πρωτεΐνη p53 στην πλειονότητα των κυττάρων, είχαν πολύ χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τις λοιπές ασθενείς, όσον αφορά την ολική επιβίωση και την ελεύθερα νόσου επιβίωση, καθώς και την επιβίωση μετά από υποτροπή, τόσο σε ασθενείς με διηθημένους όσο και σε ασθενείς με μη διηθημένους λεμφαδένες. Οι Allred και συν. (1993) σε δύο μελέτες 694 γυναικών χωρίς συστηματική θεραπεία αξιολόγησαν την έκφραση της p53 σε τομές ψυκτικού με τη χρήση μίγματος δύο αντισωμάτων. Αποκάλυψαν σημαντική διαφορά στην ολική και ελεύθερα νόσου επιβίωση μεταξύ των p53 θετικών και p53 αρνητικών ασθενών. Όταν οι ασθενείς διακρίθηκαν σε ομάδες με αρνητικούς και θετικούς λεμφαδένες, δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες διαφορές. Στην πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση που περιελάμβανε το μέγεθος του όγκου, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων και την ηλικία, η θετικότητα της p53 συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα επιβίωσης, τόσο ελεύθερας νόσου όσο και ολικής.

Οι Kovack και συν. (1996) χρησιμοποιώντας μεθοδολογία που ανιχνεύει όλες σχεδόν τις μεταλλάξεις του γονιδίου *p53*, έδειξαν ότι η παρουσία μετάλλαξης αποτελεί ένα ιδιαίτερα ισχυρό προβλεπτικό παράγοντα της ελεύθερας νόσου και ολικής επιβίωσης, πολύ μεγαλύτερης προγνωστικής σημασίας από την ανοσοϊστοχημική έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες γονιδιακές θέσεις είναι αυτές που σχετίζονται με την πρόγνωση. Οι Borresen και συν. (1995) βρήκαν σημαντικά φτωχότερη επιβίωση στις περιπτώσεις εκείνες που σχετίζονταν με μεταλλάξεις του γονιδίου στις θέσεις σύνδεσης με τα ιόντα ψευδαργύρου. Οι Van Slooten και συν. (1999) έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στις ίδιες θέσεις δεν σχετίζονται με χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα. Οι Berg και συν. (1995) αναφέρουν ότι οι μεταλλάξεις στις εξελικτικά σταθερές κωδικοποιούσες περιοχές II και V συσχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση. Σήμερα, η απενεργοποίηση του *p53* θεωρείται ότι σχετίζεται με χειρότερη κλινική πορεία αλλά η προγνωστική του σημασία δεν είναι τόσο ισχυρή ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική (ASCO 2007).

Η **p21 (WAF-1) πρωτεΐνη** είναι το προϊόν του γονιδίου *WAF1/Cip1*, το οποίο περιέχει στον υποκινητή του ένα ανταποκρινόμενο στοιχείο στην *p53* (Elledge και Allred 1998). Παρεμποδίζει τη δραστηριότητα του συμπλέγματος κυκλίνης/κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης και κατ' επέκταση εμποδίζει την είσοδο των κυττάρων από την G1 στη S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Είναι επομένως σημαντικό τμήμα του μονοπατιού του *p53*-εξαρτώμενου ελέγχου της κυτταρικής αύξησης. Μπορεί όμως να ρυθμιστεί και μέσω μηχανισμών-ανεξάρτητων της *p53* (Sloane 2000). Η πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά σε αρκετούς πυρήνες σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 80% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Δεν συσχετίζεται με τους ER ή την ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία, αλλά έχει βρεθεί να σχετίζεται με την πρόγνωση των ασθενών, ιδιαίτερα όταν συνεκτιμάται η έκφραση του *p53*. Ασθενείς *p21(+)/p53(-)* παρουσιάζουν χαρακτηριστικά καλύτερης επιβίωσης, ενώ οι *p21(-)/p53(+)* ασθενείς έχουν χειρότερη επιβίωση (McClelland και συν. 1999).

Οι **κυκλίνες** από την A έως και την H λειτουργούν ως ρυθμιστικές υπομονάδες των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CdKs) και ως εκ τούτου θεωρούνται ρυθμιστές-κλειδιά του κυτταρικού κύκλου (Steeg και Zhou 1998). Οι Cdks αποτελούν μια οικογένεια κινασών σε θέση σερίνης-θρεονίνης και είναι υπεύθυνες για τη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Για την καταλυτική τους δραστηριότητα απαιτούν σύνδεση με μια κυκλίνη (Sandhu και Slingerland 2000). Η μετάβαση από την G1 στη S-φάση προϋποθέτει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb), η οποία ενεργοποιείται με τη μεσολάβηση, αρχικά, των κυκλινών D (D1, D2, D3) οι οποίες συνδέονται με τις *cdk4* και *cdk6* και στη συνέχεια από τις κυκλίνες E (E1 και E2) που συνδέονται με την *cdk2*. Η φωσφορυλίωση της pRb απελευθερώνει τα ετεροδιμερή

E2F-DP1 (Dowdy και συν. 1993). Τα μέλη της οικογένειας E2F μεταγραφικών παραγόντων επάγουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων, η οποία απαιτείται για την είσοδο και πορεία διαμέσου της S-φάσης. Στο τέλος της S-φάσης η cdk2 συνδέεται με την κυκλίνη A, ενώ η μετάβαση από το σημείο G2-M ελέγχεται από τη δραστηριότητα του συμπλέγματος κυκλίνη B-cdk1 (Sandhu και Slingerland 2000). Οι κυκλίνες έχουν μικρό χρόνο ζωής και παράγονται όταν το κύτταρο τις χρειάζεται. Υφίστανται, ωστόσο, σημαντική ρύθμιση στο μεταγραφικό επίπεδο. Η κυκλίνη D1 επάγεται από τη δράση αυξητικών παραγόντων και των οιστρογόνων.

Τα επίπεδα των κυκλινών D1 και E συχνά αυξάνονται στα καρκινώματα (Keyomarsi και Pardee 1993, Gillett και συν. 1994). Πειράματα μετασηματισμού ιστών σε καλλιέργειες έχουν δείξει ότι οι δύο αυτές κυκλίνες συνεργάζονται με το ογκογονίδιο *ras*. Σε διαγονιδιακά ποντίκια υπερέκφραση της κυκλίνης D1 κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του ιού του καρκίνου του μαστού του ποντικού (MMTV) οδηγεί σε υπερπλασία του μαστού και ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος (Wang και συν. 1994). Ενίσχυση του χρωμοσώματος 11q13 στο οποίο εντοπίζεται στο γονίδιο της κυκλίνης D1 έχει ανιχνευθεί στο 15-20% των καρκινωμάτων του μαστού (Barnes 1997). Έχει βρεθεί συμφωνία μεταξύ γονιδιακής ενίσχυσης και υπερέκφρασης της πρωτεΐνης (Barbareschi και συν. 1997), αν και έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση απουσία ενίσχυσης (Gillett και συν. 1994). Παρά το ογκογενετικό δυναμικό της κυκλίνης D1 σε καλλιέργειες κυττάρων και σε πειραματόζωα, στον ανθρώπινο μαστό η υπερέκφρασή της συνδέεται με καλούς προγνωστικούς δείκτες όπως η έκφραση των ER και τα υψηλά επίπεδα p27 (Hui και συν. 1996). Δύο μελέτες αναφέρουν συσχέτιση με μεγαλύτερη επιβίωση (Gillett και συν. 1996, Pelosio και συν. 1996). Μία δηλώνει αντίστροφη σχέση (McIntosh και συν. 1995) ενώ σε άλλες δύο δεν βρέθηκε καμία προγνωστική σημασία (Michailides και συν. 1996, Van Diest και συν. 1997).

Οι Simpson και συν. (1997) μελετώντας την ενίσχυση του γονιδίου και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε 88 περιπτώσεις DCIS ανίχνευσαν αυξανόμενο ποσοστό DNA και πρωτεΐνης αυξανόμενης της κακοήθειας των νεοπλασμάτων. Οι Gillett και συν. (1998) αναφέρουν υψηλότερο ποσοστό έκφρασης της κυκλίνης D1 στα DCIS σε σχέση με τις υπερπλασίες των πόρων (ADH). Τέλος, οι Bartkova και συν. (1994) αναφέρουν ότι τα ποσοστά έκφρασης της κυκλίνης D1 στα DCIS είναι όμοια με εκείνα του διηθητικού στοιχείου. Τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα υποδεικνύουν ότι πιθανόν η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 να αποτελεί πρώιμο γεγονός στη νεοπλασματική εκτροπή. Κατά συνέπεια, μπορεί να θεωρηθεί πολύτιμος στόχος για την ανάπτυξη θεραπείας. Μια σειρά 58 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού παρακολουθήθηκαν ως προς τη σχέση έκφρασης της κυκλίνης D1 και ανταπόκρισης στην ταμοξифίνη. Ασθενείς D1(+)/ER(+) παρουσίασαν 71% ρυθμό απάντησης, οι D1(-)/ER(+) 67% και οι D1(-)/ER(-) πιθανότητα <10% απάντησης ($p < 0,0001$) (Barnes και Gillett 1998).

Η υπερέκφραση της κυκλίνης E στον καρκίνο του μαστού συσχετίζεται με φτωχότερη πρόγνωση (Sandhu και Slingerland 2000). Η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης E συνδέεται με μικρότερη επιβίωση ολικής και ελεύθερης νόσου, καθώς και απουσία έκφρασης των ER. Η δυσμενής προγνωστική σημασία επεκτείνεται και στις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες (Porter και συν. 1997). Τα επίπεδα του mRNA της κυκλίνης E είναι υψηλότερα στα πτωχά διαφοροποιημένα DCIS (Stanta και συν. 1998). Οσον αφορά στην πρωτεΐνη παρατηρείται τάση αυξανόμενης έκφρασης στα καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας (Scott και Walker 1997).

στ. Η **απόπτωση** αποτελεί μια ενεργητική διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με σημαντικό ρόλο σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Απουσία φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου, τα κύτταρα δυνατόν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και, εφόσον πρόκειται περί νεοπλασματικών κυττάρων, δυνατόν να ευνοείται η ογκογένεση. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον αναφορικά με τη συμμετοχή των μηχανισμών που ρυθμίζουν την απόπτωση στην ογκογένεση. Η διαδικασία της απόπτωσης ρυθμίζεται από γονίδια τα οποία διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στους επαγωγείς και στους αναστολείς της απόπτωσης. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα γονίδια *Bax*, *Bad*, *Bcl-Xs* καθώς και άλλα γονίδια όπως το φυσικό στέλεχος του γονιδίου *p53* και οι κασπάσες. Στους αναστολείς της απόπτωσης, κεντρική θέση κατέχουν τα γονίδια *Bcl-2* και *Bcl-X_L*. Το γονίδιο *Bcl-2* είναι από τα περισσότερο μελετημένα στα διάφορα κακοήθη νεοπλάσματα, μεταξύ δε αυτών και του μαστού.

Bcl-2: Το γονίδιο *Bcl-2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q21.3 και εντοπίστηκε μετά από κλωνοποίηση της t (14;18) μετατόπισης (q32.3; q21.3) η οποία παρατηρείται στην πλειονότητα των οζωδών λεμφωμάτων. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης *Bcl-2* έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό κυμαινόμενο από 38% έως 70% των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, χωρίς ωστόσο να συνυπάρχει η χρωμοσωμική ανωμαλία που παρατηρείται στα οζώδη λεμφώματα (Nathan και συν. 1994). Η έκφραση της πρωτεΐνης *Bcl-2* στα καρκινώματα του μαστού παρουσίασε υψηλής στατιστικής σημαντικότητας αντίστροφη συσχέτιση με την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης *c-erbB-2* και θετική συσχέτιση με τους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς (Nathan και συν. 1994, Wicha και συν. 1998). Οι Silvestrini και συν. (1994) παρατήρησαν επίσης σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της *Bcl-2* πρωτεΐνης και στην έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων καθώς επίσης και στο μικρό μέγεθος του όγκου, στο χαμηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην απώλεια ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της *p53* πρωτεΐνης.

Σε μετα-ανάλυση των Callagy και συν. (2008) όπου συμπεριλήφθησαν 18 ερευνητικές εργασίες με 5.892 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση της *Bcl-2* πρωτεΐνης βρέθηκε η *Bcl-2* να αποτελεί ανεξάρτητο ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη της ελεύθερης

νόσου και ολικής επιβίωσης. Εκτός από τον αντι-αποπτωτικό ρόλο της, η Bcl-2 καθυστερεί την είσοδο στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και επιμηκύνει την G0 φάση. Επιπλέον το *Bcl-2* γονίδιο είναι οιστρογόνο-ρυθμιζόμενο και πολλές κλινικές μελέτες αναφέρουν συσχέτιση με ευνοϊκή απάντηση στην ενδοκρινική θεραπεία (Gallagy και συν. 2008).

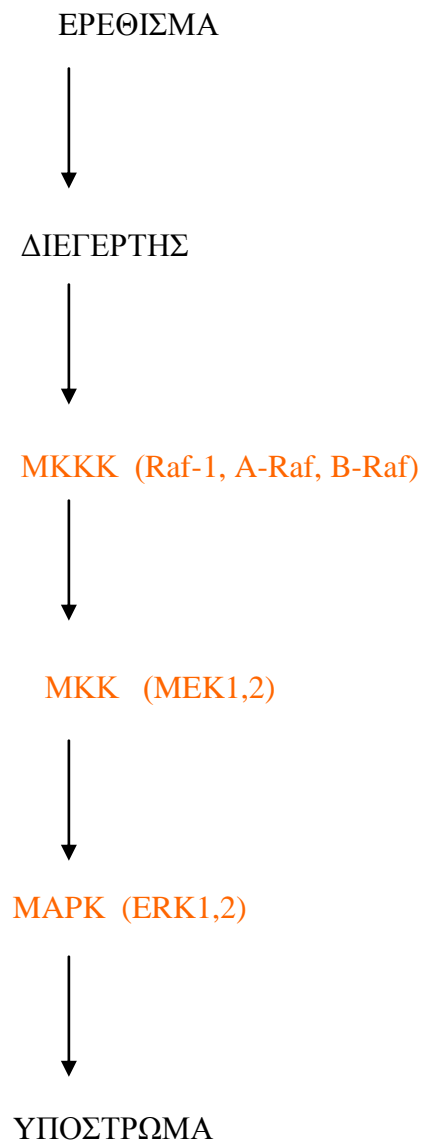
B. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΜΙΤΟΓΟΝΑ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που, με δεσμό σθένους, φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, προσδένοντας φωσφόρο στην πλευρική αλυσίδα ειδικών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (και συγκεκριμένα στα αμινοξέα σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη). Η φωσφορυλίωση αυτή των πρωτεϊνών μπορεί να ελέγξει την ενζυμική τους δραστηριότητα, την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες και μακρομόρια, την θέση τους στο κύτταρο και την προδιάθεση τους για αποδόμηση από πρωτεάσες.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα [**Mitogen Activated Protein Kinases [MAPK]**] συνιστούν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που η λειτουργία και η ρύθμιση τους είναι συντηρημένη εξελικτικά από τους μονοκύτταρους οργανισμούς όπως ο ζυμομύκητας έως τους πλέον σύνθετους οργανισμούς όπως ο άνθρωπος. Οι MAPK φωσφορυλιώνουν σερίνες και θρεονίνες πρωτεϊνών στόχων και ρυθμίζουν έτσι κυτταρικές δραστηριότητες όπως γονιδιακή έκφραση, μίτωση, κίνηση, μεταβολισμό και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Λόγω των πολλών και σημαντικών λειτουργιών τους έχουν μελετηθεί αρκετά ώστε να ληφθούν πληροφορίες για τον φυσιολογικό ρόλο τους και τον ρόλο τους στην ασθένεια. Η καταλυόμενη από MAPK φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων λειτουργεί σαν διακόπτης που είτε ενεργοποιεί είτε αδρανοποιεί την λειτουργία της πρωτεΐνης. Υποστρώματα αποτελούν άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφατάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και κυτταροσκελετικοί παράγοντες. Οι φωσφατάσες των πρωτεϊνών απομακρύνουν τον φωσφόρο που προστέθηκε από τις MAPK. Κατ' αυτόν τον τρόπο η δράση των MAPK και των φωσφατασών είναι αντίθετη και ταχεία, όσον αφορά την συμπεριφορά των κυττάρων και διευκολύνει τα κύτταρα να ανταποκρίνονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος. (Johnson GL και συν. 2002). Οι MAPK αποτελούν τμήμα ενός **συστήματος διαδοχικών φωσφορυλιώσεων (σχήμα 1)**. Αποτελούν υποστρώματα φωσφορυλίωσης των **MAPKK** δηλαδή των **κινασών των MAP κινασών** ή **MKK**. Οι MKK έχουν υψηλή ειδικότητα στο να φωσφορυλιώνουν ειδικές MAPK. Οι MKK αποτελούν επίσης στόχο φωσφορυλίωσης των **MAP κινασών κινασών κινασών** δηλαδή των **MKKK**.

Οι MKKK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MKK. Οι MKKK έχουν διακριτά μοτίβα στην αλληλουχία τους που τους προσδίδουν εκλεκτικότητα στην απάντησή τους σε διαφορετικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Τα κύτταρα λαμβάνουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα από το περιβάλλον που επιδρούν στον μεταβολικό ρυθμό τους, στην αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα, στην επιβίωση και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες που ενέχονται στην ομοίωση και την υγεία του οργανισμού. Ένα από τα πλεονεκτήματα των πολλών

διαφορετικών MKKK είναι ότι μπορούν να συνταιριαστούν με διάφορα ζεύγη MKK-MAPK έτσι ώστε τα κύτταρα να μπορούν να αποκρίνονται σε ξεχωριστά ερεθίσματα με ειδικά μονοπάτια MAPK (Εικόνα 1). Σε πολυκύτταρους οργανισμούς υπάρχουν τρεις καλά χαρακτηρισμένες ομάδες MAP κινασών: 1.) κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα (**Extracellular signal-regulated kinases**) ERK1, ERK2, ERK3, ERK5, ERK7, 2.) οι c-Jun αμινοτελικές κινάσες JNK1, JNK2 και JNK3 και 3.) τέσσερα ένζυμα p38 (p38α, p38β, p38γ και p38δ).



Σχήμα 1. Αλληλουχία γεγονότων στην διέγερση των MAP κινασών.

B.1. ΚΙΝΑΣΕΣ ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ (ERKs)

Οι Boulton και συν. (1991) απομόνωσαν και κλωνοποίησαν αρχικά τρεις κινάσες, τις ERK1, ERK2, ERK3. Τα mRNA των τριών αυτών ERK εκφράζονται σε υψηλότερο βαθμό στο νευρικό σύστημα σε ποντίκια. Επίσης ανιχνεύονται και σε άλλους ιστούς όπως στα επινεφρίδια, στον αμφιβληστροειδή, στο ισχιακό νεύρο, στην καρδιά, στους μύες, στο έντερο, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στο σπλήνα, στο θύμο και στον πλακούντα. Μέσα στο νευρικό σύστημα η ERK2 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον πρόσθιο εγκέφαλο, η ERK3 στον οπίσθιο, ενώ η ERK1 πιο διάχυτα. Εκτός νευρικού η ERK1 εκφράζεται σε υψηλότερο βαθμό στο έντερο και τον πλακούντα και λιγότερο στον πνεύμονα. Το mRNA της ERK2 εκφράζεται περισσότερο στους μύες, θύμο και καρδιά. Μελέτες των Gonzalez και συν. το 1992 επιβεβαίωσαν την παρουσία τεσσάρων ισομορφών των MAP κινασών σε ανθρώπινους ιστούς και ειδικότερα των p41^{mapk} (που αντιστοιχεί στην ERK2), p40^{mapk}, p44^{mapk} (που αντιστοιχεί στην ERK1) και p63^{mapk}. Οι γενετικοί τόποι που βρίσκονται τα γονίδια των κινασών αυτών είναι το 22q1.2 για το ERK2, το 16p11.2 για το ERK1 και το 18q12-21 για το ERK3 (Li και συν. 1994). Οι Zhou και συν. (1995) και οι Lee και συν. (1995) ανακάλυψαν την ERK5 κινάση που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και ενεργοποιείται από πλειάδα αυξητικών παραγόντων. Η ERK7 ανακαλύφθηκε το 1997 από τους Rosner και συν. και φαίνεται να έχει ρόλο στην αναστολή της αύξησης.

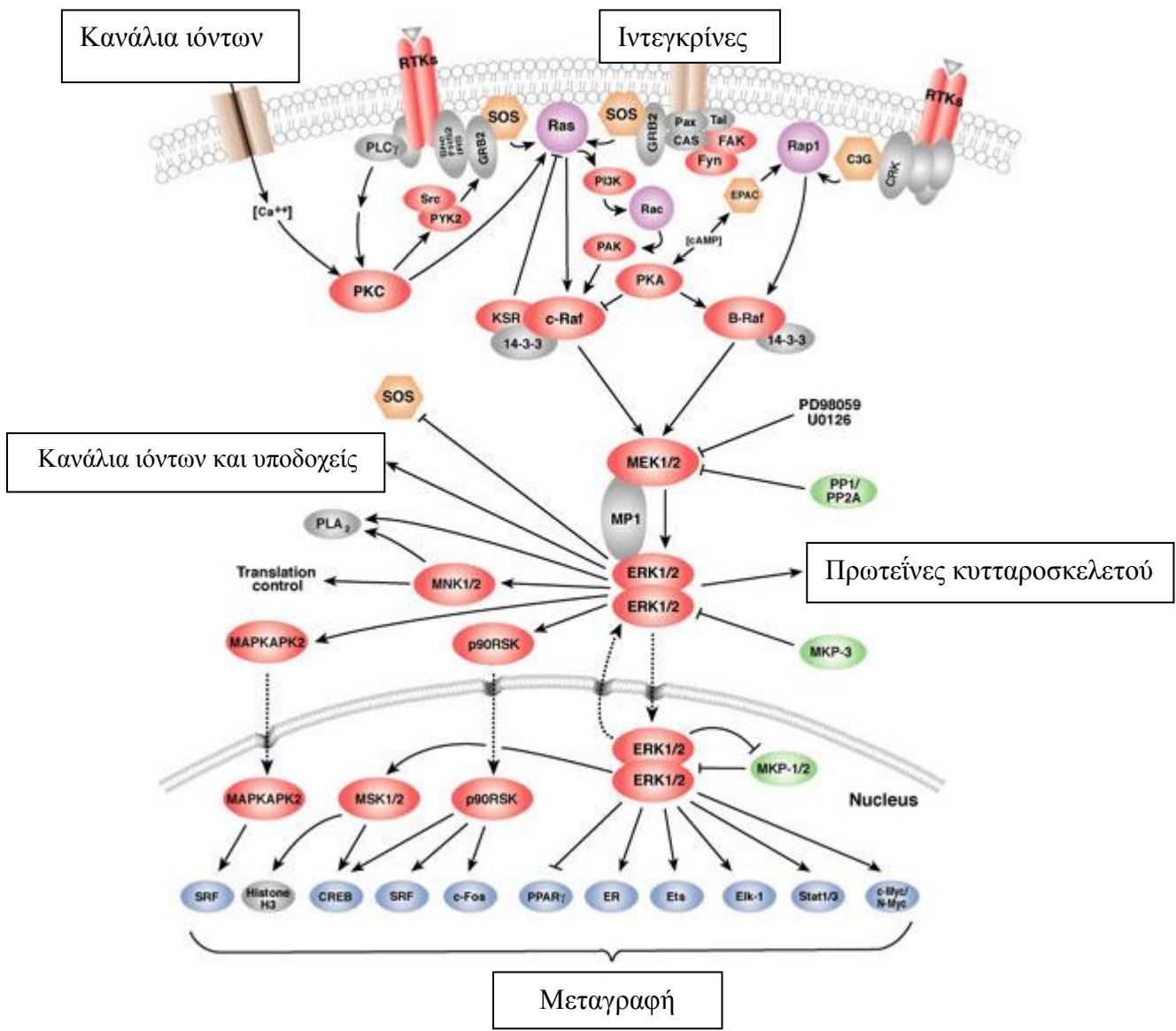
Οι ERK1 και ERK2 συμμετέχουν στην ρύθμιση της μείωσης και της μίτωσης και σε μεταμιτωτικές λειτουργίες σε διαφοροποιημένα κύτταρα όπως η μνήμη και η μάθηση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πολλοί παράγοντες ενεργοποιούν τις ERK1 και ERK2 όπως: αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ιογενείς λοιμώξεις, συνδέτες για υποδοχείς ετεροτριμερικών πρωτεϊνών που προσδένουν νουκλεοτίδιο γουανίνης, παράγοντες μετασχηματισμού και καρκινογόνα.

Παρότι υπάρχει υψηλός βαθμός ομολογίας μεταξύ των ERK1 και ERK2 κινασών (75% σε επίπεδο της αλληλουχίας των αμινοξέων τους) οι δύο αυτές κινάσες δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελούν μια παραλλαγή του ίδιου μορίου. Απόδειξη για αυτή την θεώρηση αποτελούν οι μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια. Έτσι ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί η έκφραση της ERK1 κινάσης (ERK1^{-/-} knockout ποντίκια) επιβιώνουν, είναι γόνιμα και φυσιολογικού μεγέθους. Η μόνη διαταραχή που παρουσιάζουν τα ζώα αυτά είναι μια βλάβη στην τελική διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι στα ERK1^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια η ERK2 κινάση μπορεί να αναπληρώσει τις περισσότερες λειτουργίες της ERK1 κινάσης. Αντίθετα η έλλειψη της έκφρασης της ERK2 κινάσης (ERK2^{-/-} knockout ποντίκια) οδηγεί σε πρόιμο εμβρυϊκό θάνατο [την 6.5 εμβρυϊκή ημέρα] (Pouyssegur και συν. 2002 και 2003). Συμπεραίνει λοιπόν κανείς ότι η

ERK1 κινάση δεν μπορεί να αναπληρώσει τις λειτουργίες της ERK2 κινάσης και άρα δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ταυτόσημες η ERK1 με την ERK2.

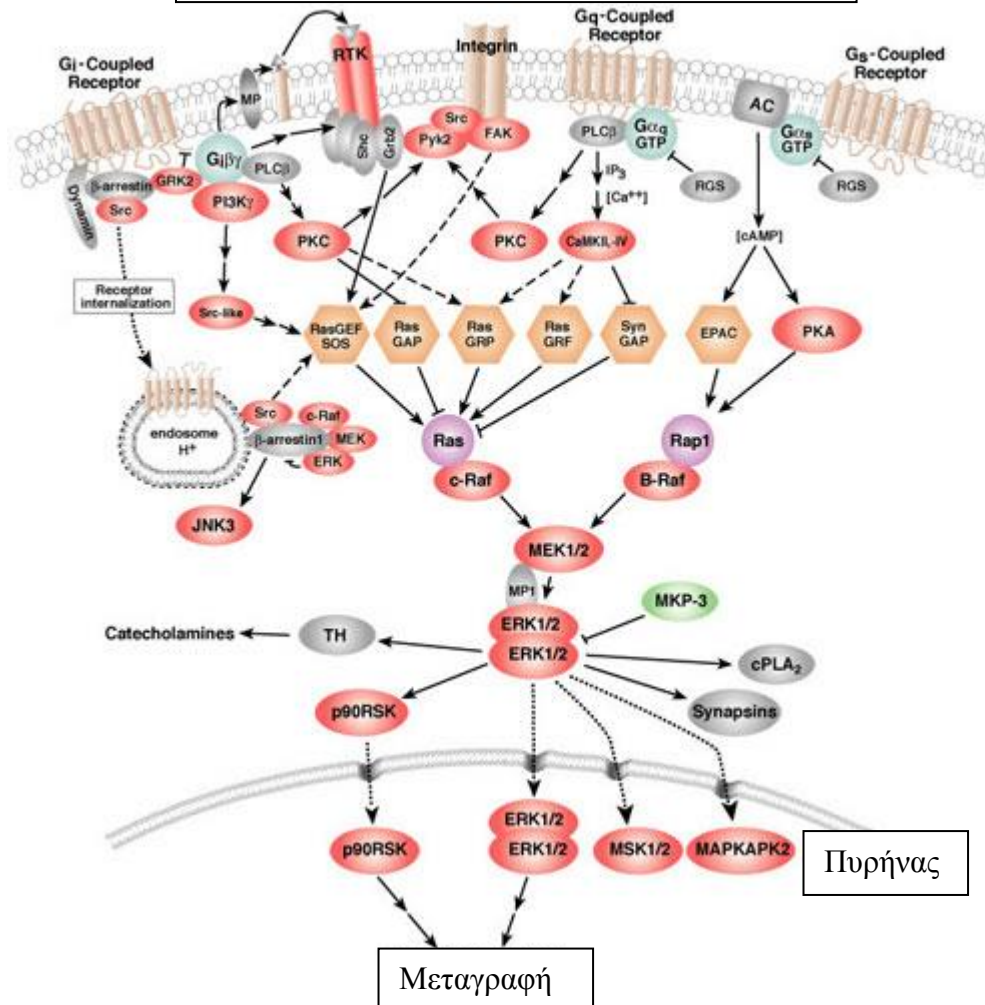
Η ενεργοποίηση των ERK κινασών επέρχεται μετά την πρόσδεση διαφόρων παραγόντων σε υποδοχείς του τύπου της τυροσινικής κινάσης [Receptor Tyrosine Kinase/RTK] (**Εικόνα 1**) είτε σε υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνες (**Εικόνα 2**). Οι μηχανισμοί αυτοί ενεργοποίησης είναι απαραίτητοι ώστε να επιτελέσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους. Όταν όμως υπάρχει διαρκής ενεργοποίηση συντελούν στην καρκινογένεση (βλέπε αναλυτική περιγραφή των μηχανισμών αυτών κατωτέρω στο κεφάλαιο <<Ρόλος των ERK κινασών σε καρκίνους>>).

Επίδραση των MAPK/ERK στην αύξηση και διαφοροποίηση



Εικόνα 1. Ο καταρράκτης των ERK ενεργοποιείται από μια μεγάλη ποικιλία υποδοχέων (υποδοχέων τύπου τυροσινικής κινάσης [RTKs], ιντεγκρινών και διαύλων ιόντων). Τα ειδικά συστατικά στοιχεία του καταρράκτη ποικίλλουν ευρέως μεταξύ των διαφορετικών ερεθισμάτων) αλλά η αρχιτεκτονική του μονοπατιού περιλαμβάνει συνήθως μια ομάδα μορίων «μετασχηματιστών» (Shc, Grb2, Crk κλπ) που συνδέουν τον υποδοχέα με έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης (Sos, C3G, κλπ) μεταδίδοντας έτσι το σήμα σε μικρές πρωτείνες που προσδέουν τριφωσφορική γουανοσίνη (Ras, Rap1), που ακολούθως ενεργοποιούν την κεντρική μονάδα του καταρράκτη που όπως προαναφέρθηκε περιλαμβάνει το σύστημα των διαδοχικών φωσφορυλιώσεων δηλαδή μια MAPKKK (Raf), μια MAPKK (MEK1/2) και μια MAPK (ERK). Ένα διμερές ERK μπορεί να μετατεθεί στον πυρήνα όπου, φωσφορυλιώνοντας μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση αλλά μπορεί επίσης να ρυθμίσει στόχους στο κυτταρόπλασμα [από Cell Signaling Technology Inc. Βασισμένη σε αναφορές των Cobb (1999), Lewis και συν. (1998), Giancotti και συν (1999), Porter και συν. (1998) και Rane (1999)].

Η σηματοδότηση των υποδοχέων που δεσμεύονται στις G-πρωτεΐνες σε σχέση με τις MAPK/ERK.



Εικόνα 2. Οι υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνη ενεργοποιούνται από ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα. Με την ενεργοποίηση του υποδοχέα η G-πρωτεΐνη ανταλλάσσει το GDP με GTP προκαλώντας την διάσταση μεταξύ της προσδεμένης στο GTP υποομάδας α και της Gβγ υποομάδας, πυροδοτώντας διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης. Υποδοχείς συζευγμένοι με διαφορετικούς υπότυπους G-πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιήσουν διαφορετικά κριώματα ώστε να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη των MAPK χρησιμοποιώντας τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ομάδες τυροσινικών κινασών. Οι κινάσες της οικογένειας Src στρατολογούνται από Gβγ υπομονάδες μετά από ενεργοποίηση της PI3Kγ (κινάση του 3-φωσφοινσιτιδίου). Επίσης στρατολογούνται από εσωτερίκευση του υποδοχέα, ή από διασταυρούμενη ενεργοποίηση υποδοχέα τύπου τυροσινικής κινάσης, ή από σηματοδότηση μέσω ενός κριώματος ιντεγκρίνης που περιλαμβάνει την Pyk2 και ή την κινάση εστιακής προσκόλλης FAK. Οι υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσουν την φωσφολιπάση C (PLCγ) ώστε να ενεργοποιήσουν την πρωτεϊνική κινάση C και την κινάση την εξαρτώμενη από ασβέστιο και καλμοδουλίνη (CaMKII) που είτε ενεργοποιούν είτε αναστέλλουν τον καταρράκτη των MAPK κινασών. [από Cell Signaling Technology Inc. βασισμένη σε αναφορές των Dikic και συν. (1999), Gutkind (1998), Luttrell και συν. (1999), και Rozengurt (1998)]

Όταν ενεργοποιηθούν οι ERK εισέρχονται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα (Chen και συν. 1992, Gonzalez και συν. 1993, Lenormand και συν. 1993, Robinson και συν. 1998) όπου δρουν στους μεταγραφικούς τους στόχους (**Πίνακας 6**) ενώ έχουν και σημαντικές δράσεις στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνουν άλλες κινάσες και ειδικότερα τις p90 ριβοσωμιακές S6 κινάσες (Rsk1, Rsk2, Rsk3) που εισέρχονται στον πυρήνα για να δράσουν στους μεταγραφικούς τους στόχους (c-Fos, CREB, SRF) , ενώ φωσφορυλιώνουν και τις κινάσες που αλληλεπιδρούν με τις MAP κινάσες (Mnk1 και Mnk2) που ελέγχουν την μετάφραση φωσφορυλιώνοντας τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης eIF-4E. Φωσφορυλιώνουν επίσης την MAPKAP2 κινάση (MAP kinase activated protein kinase 2) στο κυτταρόπλασμα και αυτή εισέρχεται επίσης στον πυρήνα για να δράσει στον μεταγραφικό παράγοντα Serum Response Factor, ενώ φωσφορυλιώνουν και την φωσφολιπάση A2 (Pearson και συν. 2001). Στο κυτταρόπλασμα οι ERK συνδέονται με την πρωτεΐνη που συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους [Microtubule-associated protein] και με τον τρόπο αυτό αναστέλλουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού, οδηγούν σε πιο στρογγυλό σχήμα του κυτάρου παρά σε αποπλατυσμένο και μειώνουν και την χημειοτακτική μετανάστευση (Reszka και συν. 1995 και 1997). Στο κυτταρόπλασμα επίσης μπορεί να σχηματίσουν οι MAPK δεσμούς σθένους με μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον PDX1 που αφού ενεργοποιηθεί ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας εισέρχεται στον πυρήνα. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η ERK σε συνδυασμό με την p14 και την MP1 (MEK Partner 1) συμμετέχει στην έκκριση ουσιών από τα λυσοσώματα (Wunderlich και συν. 2001). Ένας διακριτός πληθυσμός ERK είναι συνδεδεμένος με σχηματισμούς της μεμβράνης [caveolae] (Mineo και συν. 1997, Furuchi και συν. 1998).

Παρότι κανείς δεν μπορεί να αγνοήσει τις δράσεις της ERK στο κυτταρόπλασμα, το γεγονός κλειδί στην σηματοδότηση από τις ERK κινάσες είναι η μετατόπιση τους προς τον πυρήνα σύμφωνα με δύο από τους κορυφαίους ερευνητές στο πεδίο της σηματοδότησης από τις MAPK τους Pouyességur και Lenormand (2002 και 2003). Σε κύτταρα σε ηρεμία οι ERK όπως και οι Raf και MEK βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Μετά από διέγερση με μιτογόνα η ενδοκυττάρια ανακατανομή των ERK συμβαίνει σε δύο φάσεις. Πρώτα υπάρχει μια άμεση μετατόπιση στον πυρήνα που μπορεί να την δει κανείς μέσα στα πρώτα 2 λεπτά (Volmat και συν. 2001). Προοδευτικά η ERK πρωτεΐνη συσσωρεύεται στον πυρήνα μετά από αρκετές ώρες διέγερσης από μιτογόνα αδειάζοντας το κυτταρόπλασμα από την ERK. Εάν η διαδικασία ενεργοποίησης της ERK διατηρηθεί η ERK παραμένει στον πυρήνα.

Μη μιτογόνα ερεθίσματα επάγουν την αρχική είσοδο της ERK στον πυρήνα αλλά αδυνατούν να προκαλέσουν την συσσώρευση της στον πυρήνα. Παρομοίως όταν η μοίρα των κυττάρων είναι η διαφοροποίηση, μόνο σήματα που πυροδοτούν την διαφοροποίηση είναι ικανά

να προκαλέσουν την συσσώρευση της ERK στον πυρήνα. Σε μελέτη όπου η ενεργός ERK δεν μπορούσε να εισέλθει στον πυρήνα (λόγω σύνδεσης της με την αδρανή μορφή της MKP-3) και παρέμενε στο κυτταρόπλασμα δεν μπορούσε να πολλαπλασιαστεί το DNA τους (Brunet και συν. 1999). Εναλλακτικά το να εισαχθεί με βίαιο τρόπο η ERK στον πυρήνα ινοβλαστών ευνοούσε την ογκογόνο εξαλλαγή τους (Robinson και συν. 1998). Ο φυσιολογικός ρόλος της παραμονής της ERK στο κυτταρόπλασμα μπορεί να είναι η διατήρηση ενός συγκεκριμένου φαινότυπου διαφοροποίησης σε μερικά κύτταρα. Διάφορες ουσίες είναι υπεύθυνες για την παραμονή της ERK στο κυτταρόπλασμα. Για παράδειγμα η αυξημένη έκφραση της PEA15 (Phosphoprotein enriched in Astrocytes) παγιδεύει ERK στο κυτταρόπλασμα των αστροκυττάρων και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ η γενετική εξάλειψη της PEA15 αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων (Formstecher και συν. 2001). Το γεγονός ότι η PEA-15 συνδέεται με την ERK2 και την παγιδεύει στο κυτταρόπλασμα επιβεβαιώνουν και άλλοι ερευνητές (Hill και συν. 2002, Whitehurst και συν. 2004). Αντικρουόμενο εύρημα στην βιβλιογραφία είναι αυτό των Ramos και συν. 2000 που αναφέρουν ότι η PEA-15 ενεργοποιεί τις ERK με μηχανισμό ανεξάρτητο από την πρόσφυση των κυττάρων. Η ρύθμιση της σηματοδότησης από ERK από την παγίδευση της στο κυτταρόπλασμα μπορεί να είναι συχνό φαινόμενο αφού πρόσφατα δείχθηκε ότι και η β -arrestin συνδέεται με την ERK δημιουργώντας ένα ικρίωμα, αυξάνοντας έτσι την κυτταροπλασματική δραστικότητα της ERK ενώ αναστέλλει την μεταγραφή που προκαλείται από την είσοδο της ERK στον πυρήνα (Tohgo και συν. 2002 και 2003). Η εξαρτώμενη από την β -arrestin ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής ERK δεν οδηγεί σε πολλαπλασιασμό όπως έδειξαν οι DeFea και συνεργάτες (2000). Άλλες τέτοιες πρωτεΐνες που δημιουργούν ικρίωματα στο κυτταρόπλασμα (scaffold proteins) είναι η πρωτεΐνη KSR1 (kinase suppressor of Ras 1) και ο MEK Partner 1 [MP1 ο οποίος συνδέει την MEK1 και την ERK1]. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική εντόπιση των ERK, δηλαδή σε ποιο κυτταρικό διαμέρισμα (compartmentalization) βρίσκονται τα ένζυμα αυτά. (Pouyességur και συν. 2002 και 2003, Pearson και συν. 2001).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ERK εισέρχονται στον πυρήνα είναι ποικίλοι: 1.) Μέσω φωσφορυλίωσης. Φαίνεται ότι είναι απαραίτητος ένας διμερισμός των ERK2 για την μετατόπιση προς τον πυρήνα. Τα ERK2 διμερή μπορεί να αποτελούνται από δύο φωσφορυλιωμένα μόρια, ή ένα φωσφορυλιωμένο και ένα μη φωσφορυλιωμένο μόριο. Το ίδιο ισχύει και για την ERK1. Ενεργείς διμερείς ERK που είναι μεγάλα μόρια (**Εικόνα 3**) εισάγονται με τον μηχανισμό της ενεργούς μεταφοράς στον πυρήνα (Khokhlatchev και συν. 1998). 2.) Μέσω διάχυσης (Shibayama και συν. 2002, Adachi και συν. 1999). 3.) Με ενεργό μεταφορά μονομερών, διμερών ή συμπλεγμάτων κατά μήκος της μεμβράνης (Adachi και συν. 1999, Cyert 2001). 4.) Μέσω

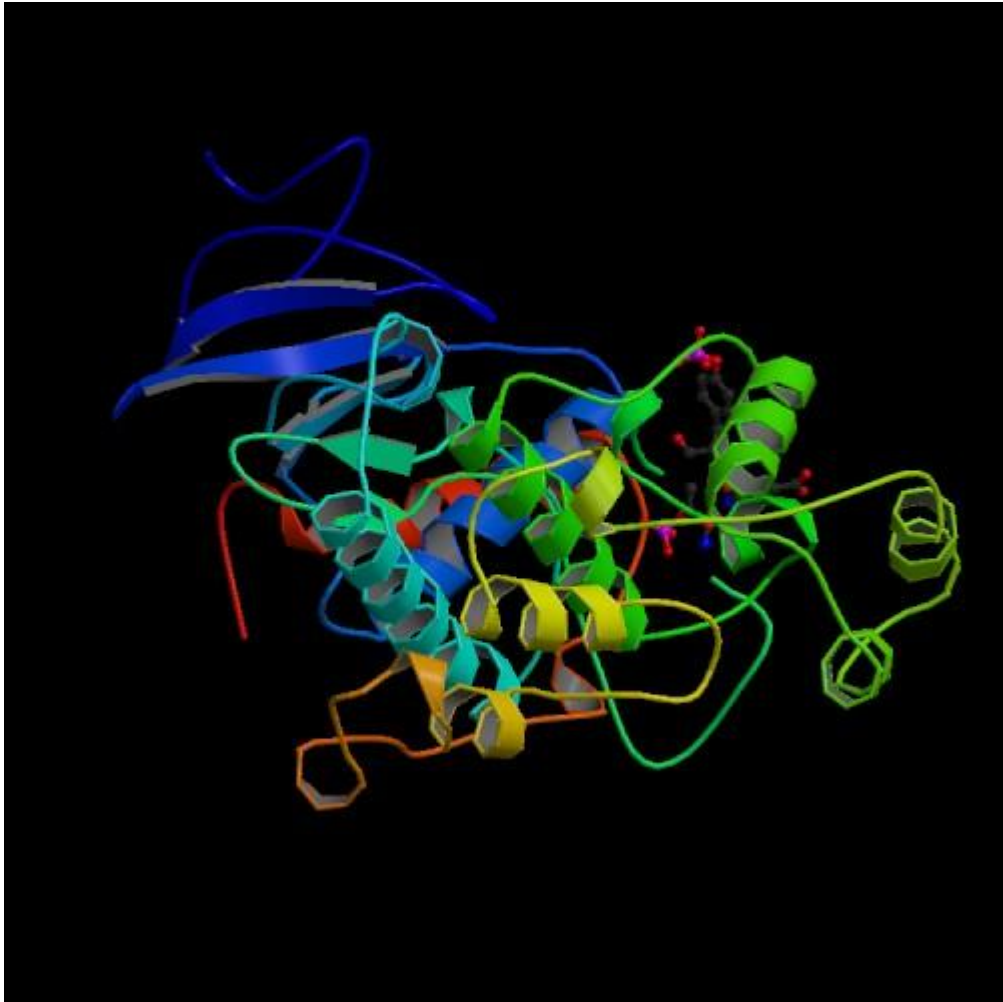
αλληλεπίδρασης με το σύμπλεγμα των πυρηνικών πόρων (Matsubayashi και συν. 2001, Whitehurst και συν. 2002). Το ποσό των ERK που βρίσκεται μέσα στον πυρήνα εξαρτάται και από την σύνδεση της ERK στο κυτταρόπλασμα με διάφορες ουσίες που προαναφέρθηκαν (PEA15, β -arrestin) αλλά και με άλλες μεταξύ των οποίων η φωσφατάση τυροσίνης PTP-SL (Zúñiga και συν. 1999), η MEKK κινάση ή MAPKK (Fukuda και συν. 1997, Xu B-e και συν. 2001) και μάλιστα η σύνδεση αφορά το αμινοτελικό άκρο 1-32 της MAPKK. Το ποσό των ERK που βρίσκεται στον πυρήνα εξαρτάται επίσης από την σύνδεση της με διάφορες ουσίες του πυρήνα (Lenormand και συν. 1998), καθώς και την έξοδο των ERK από τον πυρήνα είτε μόνων τους είτε σε μορφή συμπλέγματος (Fukuda και συν. 1997, Adachi και συν. 2000). Επίσης η πρόσφυση του κυττάρου οδηγεί σε συσσώρευση της ERK στον πυρήνα και αυτή μεσολαβείται από ιντεγκρίνες (Arlin και συνεργάτες 2001 και 2002). Η ERK φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο όχι στην αρχική πρόσφυση σε επιφάνεια και το ξεδίπλωμα του κυττάρου, όσο στα πιο όψιμα στάδια της μετανάστευσης των κυττάρων (Stockton και συν. 2001). Σημαντικό ρόλο για να απαγκιστρωθεί η ERK από τις ουσίες που την δεσμεύουν στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα από την MEK1 παίζουν τα αμινοξέα στις θέσεις 176-181 που βρίσκονται στην έλικα ενεργοποίησης της ERK2 (Wolf και συν. 2001). Άλλες αλληλουχίες αμινοξέων που είναι σημαντικές για την εντόπιση μέσα στο κύτταρο της ERK2 είναι τα αμινοξέα στην θέση από 312-320 της ERK2 (προσδιορίζουν την κυτταροπλασματική εντόπιση της ERK2) και τα αμινοξέα στις θέσεις 321-327 που είναι σημαντικά για την είσοδο στον πυρήνα της ERK2 (Rubinfeld και συν. 1999). Οι Robinson και συν. 2002 έδειξαν ότι το καρβοξυτελικό ήμισυ της ERK2 είναι κυρίως υπεύθυνο για την εντόπιση στο κυτταρόπλασμα σε κύτταρα στην ηρεμία ενώ η αμινοτελική περιοχή αναδίπλωσης είναι υπεύθυνη για την μετατόπιση της ERK2 στον πυρήνα.

Ο τερματισμός της σηματοδότησης των ERK γίνεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης τους από τις MAPK φωσφατάσες [Mitogen-activated protein kinase phosphatases]. Οι φωσφατάσες αυτές που καλούνται και διπλής ειδικότητας φωσφατάσες [Dual specificity phosphatases] (Camps και συν. 2000), επειδή έχουν την δυνατότητα να αφαιρούν φωσφόρο και από φωσφορυλιωμένα σερίνη αλλά και από φωσφορυλιωμένα θρεονίνη, παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο διάταξης (διαδοχικά δηλαδή θετικά φορτισμένα αμινοξέα-υδρόφοβα αμινοξέα-θετικά φορτισμένα αμινοξέα) των αμινοξέων τους στην περιοχή αλληλεπίδρασης τους με τις MAP κινάσες (Tanoue και συν. 2002). Τέτοιες διπλής ειδικότητας φωσφατάσες έχουν διαφορετική κατανομή σε ιστούς αλλά και μέσα στο ίδιο το κύτταρο. Έτσι η MKP1 (μικρή ειδικότητα για τις ERK), η MKP2 (μεγάλη ειδικότητα για τις ERK), εντοπίζονται στον πυρήνα ενώ η MKP3 (μεγάλη ειδικότητα για ERK) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. (Camps και συν. 2000). Μάλιστα η MKP-3 θεωρείται ως ακόμη μια ουσία που παγιδεύει την ERK2 στο κυτταρόπλασμα (Karlsson και συν. 2004).

Όπως προαναφέρθηκε οι ERK1 και ERK2 αποτελούν στοιχεία ενός συστήματος κινασών που περιλαμβάνει τις MKKK (c-Raf, B-Raf ή A-Raf) και μπορεί να ενεργοποιηθεί από το πρωτοογκογονίδιο Ras. Οι μεταλλάξεις που μετατρέπουν το Ras σε ένα ενεργοποιημένο ογκογονίδιο είναι συχνά ογκογόνες μεταλλάξεις σε πολλούς ανθρώπινους όγκους. Το ογκογόνο Ras ενεργοποιεί διαρκώς τα μονοπάτια των ERK1 και ERK2 και συντελεί έτσι στον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις συμβαίνουν και στο B-Raf γονίδιο στο 70% των μελανωμάτων και στο 15% των καρκίνων του κόλου. Το μεταλλαγμένο B-Raf οδηγεί σε ενεργοποίηση των ERK κινασών. Με την ενεργοποίηση αυτή οι ERK κινάσες μετατοπίζονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και προκαλούν τα ακόλουθα: 1. επάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες μέσω αύξησης των κυκλινών D1, D2, D3 2. αναστολή της απόπτωσης μέσω μείωσης του Bim 3. αύξηση της δράσης του mdm2 που είναι αναστολέας της δράσης του p53 με αποτέλεσμα το κύτταρο να αποκτά απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού 4. αύξηση του VEGF με συνέπεια αύξηση της αγγειογένεσης 5. αύξηση της δράσης του c-myc που οδηγεί σε έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα αναστολής του πολλαπλασιασμού και 6. αύξηση της έκφρασης της β3 ιντεγκρίνης που συντελεί σε διήθηση στους ιστούς και μετάσταση (Mercer και συν. 2003).

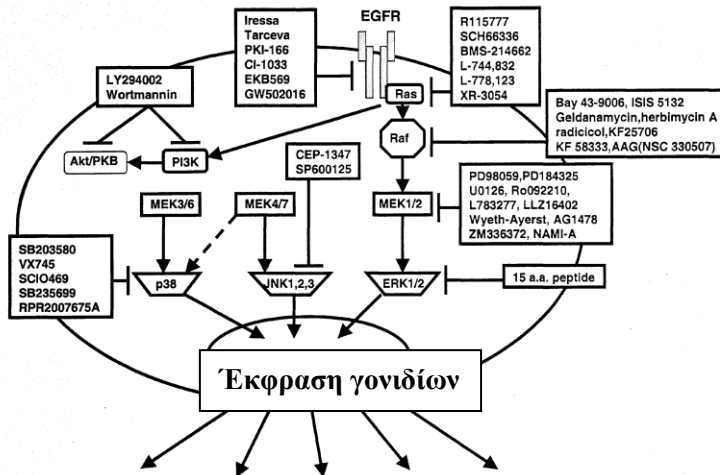
Πίνακας 6. Μεταγραφικοί στόχοι στον πυρήνα, της διμερούς ενεργοποιημένης μορφής της ERK2. (Στοιχεία από Cobb και συν. 1999, Lewis και συν. 1998, Porter AC and Vaillancourt RR, 1998).

ETS-1	PC2
Elk-1	SAP-1a
Spi-B	ATF-2
SAP-2	HMG-14 (έμμεσα μέσω MSK1/2)
PEA-3	c-fos (έμμεσα μέσω p90rsk)
c-jun	CREB (έμμεσα μέσω p90rsk)
c-myc/ N-myc	SRF (έμμεσα μέσω p90rsk)
STAT-1/3	Histone 3 (έμμεσα μέσω MSK1/2 και p90rsk)
ER	



Εικόνα 3. Δομή της ενεργοποιημένης ERK2. (Από την RCSB Protein Data Bank.)

Για τον λόγο αυτό αναστολείς των μονοπατιών των ERK εφαρμόζονται σε κλινικές δοκιμές ως πιθανοί αντινεοπλασματικοί παράγοντες όπως ο αναστολέας των MAPK/ERK κινασών CI-1040. Ο παράγοντας CI-1040 είναι ο πρώτος αναστολέας που δοκιμάστηκε στους ανθρώπους και έχει υψηλή εκλεκτικότητα στην αναστολή των ERK1 και ERK2 και εφαρμόζεται σε μελέτες φάσης II (Gietema και συν. 2002). Διάφοροι αναστολείς του συστήματος των MAP κινασών απεικονίζονται στην **εικόνα 4**.



Υπερπλασία Διαφοροποίηση Απόπτωση Ανάπτυξη Μετασηματισμός

Εικόνα 4. Φαρμακολογικοί αναστολείς μεταγωγής σήματος για μονοπάτια των EGFR, MAPK, p38 και JNK.

B.2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ERK ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ

Γενικά

Οι MAP κινάσες συμπεριφέρονται ως το σημείο σύγκλισης διαφόρων σημάτων που παράγονται από την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με κάποιον αυξητικό παράγοντα (**Εικόνα 5**). Η συμβολή των MAP κινασών στην προώθηση της εξέλιξης του καρκίνου είναι αναμφισβήτητη. Οι MAPK εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα στον καρκίνο και η αύξηση αυτή αφορά είτε το ολικό ποσό είτε την φωσφορυλιωμένη μορφή είτε και τα δύο μαζί (Hoshino και συν. 1999). Θα αναφερθούν τέσσερις μηχανισμοί με τους οποίους οι MAPK συντελούν στην καρκινογένεση.

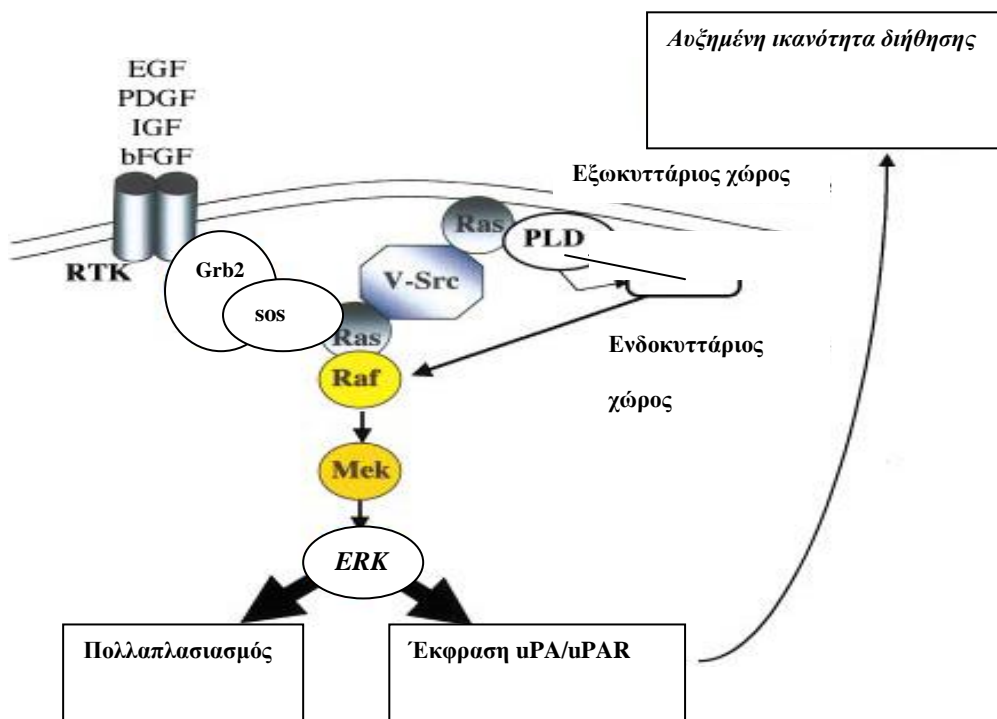
Μηχανισμός 1: Ενεργοποίηση των MAP κινασών από πρόσδεση συνδέτη σε υποδοχέα του τύπου της τυροσινικής κινάσης

Μετά την πρόσδεση του συνδέτη (όπως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων, του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών) σε υποδοχέα του τύπου της τυροσινικής κινάσης, ενεργοποιούνται διαδοχικά στα ενδιάμεσα στάδια το σύστημα Grb2/sos και ακολούθως το Ras. Το ενεργοποιημένο Ras ενεργοποιεί το σύστημα των MAP κινασών και όπως προαναφέρθηκε ακολουθεί μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων. Ακολουθεί είσοδος της ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένης) ERK στον πυρήνα και ενεργοποίηση γονιδίων στόχων της που οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου και μέσω και της αυξημένης έκφρασης του uPA/uPAR σε αυξημένη διηθητική ικανότητα. (**Εικόνα 5**). Επίσης το ενεργοποιημένο Ras μέσω του v-Src και των φωσφολιπασών D και C ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, μέσω της οποίας μπορεί επίσης να διεγείρει το σύστημα των MAP κινασών (Aguirre Ghiso και συν. 1999).

Μηχανισμός 2: Αλληλεπίδραση MAP κινασών με την ιντεγκρίνη β6

Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί αφορά την αλληλεπίδραση των MAP κινασών με τις ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες συνιστούν μια οικογένεια υποδοχέων προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας, που μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη των MAP κινασών οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που προάγουν την αύξηση. Κάθε ιντεγκρίνη αποτελείται από μια υπομονάδα α και μια β που βρίσκονται σε στενή σύνδεση μεταξύ τους και δημιουργούν μια δομική και λειτουργική γέφυρα μεταξύ της εξωκυτταρίου ουσίας και των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση των ERK, ως απάντηση στην σύνδεση στις ιντεγκρίνες, θεωρείται ότι είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν η συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων που είναι διαθέσιμοι για ένα κύτταρο είναι περιορισμένη (Giancotti και Ruoslahti, 1999). Επιπρόσθετα η σύνδεση των ιντεγκρινών με την εξωκυτταρική ουσία έχει δείχθει πρόσφατα

ότι είναι προαπαιτούμενο για την μετατόπιση των ενεργοποιημένων ERK όχι μόνο στον πυρήνα αλλά και στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Arlin και συν. 2002). Η ανβ6 ιντεγκρίνη δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα αλλά εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κατά την ογκογένεση. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας β6 υπάρχει σε διάφορους καρκίνους όπως του πνεύμονα, του παγκρέατος, του μαστού, των ωοθηκών, του δέρματος και του επιθηλίου της τραχείας καπνιστών (Breuss και συν. 1995).



Εικόνα 5. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει πώς ένας <<κοινός παρονομαστής >> των μονοπατιών σηματοδότησης που περιλαμβάνει ένα κλασικό μονοπάτι ενεργοποιούμενο από μιτογόνα, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή του uPA και του uPAR μεταξύ άλλων πρωτεασών που προάγουν την διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση μπορεί να ξεκινήσει από υποδοχείς με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης, από ογκογονίδια όπως το v-Ras και το v-Src που θα ενεργοποιήσουν τον μεταβολισμό των λιπιδίων (φωσφολιπάση D [PLD] ή και την φωσφολιπάση C που δεν δείχνεται στο σχήμα) και ακολούθως από την πρωτεϊνική κινάση C που όταν υπερεκφράζεται ή υπερενεργοποιείται μπορεί να διεγείρει το ίδιο μονοπάτι. Ένα παρόμοιο παράλληλο σχήμα μπορεί να δειχθεί για το μονοπάτι της JNK και μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει διάλογος μεταξύ των μονοπατιών. (Από Aguire Ghiso και συν. 1999).

Οι Ahmed και συν. (2002) έδειξαν ότι με χρήση antisense β6 στις κυτταρικές σειρές WiDr και HT29 (που υπερεκφράζουν την β6 υπομονάδα) μειώνεται η διέγερση των MAP κινασών μετά

από χορήγηση ορού. Συγκεκριμένα, υπάρχει αύξηση των MAP κινασών, μόνο όμως μια φορά πάνω από το φυσιολογικό σε αντίθεση με την τριπλάσια αύξηση στις σειρές που δεν έχουν διαμολυνθεί με antisense β6. Με δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η υπομονάδα β6 κατακρημνίζεται μαζί με την ERK2. Προσδιόρισαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή συνέβαινε σε μια περιοχή 15 αμινοξέων (RSKAKWQTGTNPLYRG). Όταν εισήγαγαν μεταλλαγμένη β6 που δεν είχε την περιοχή αυτή πρόσδεσης, δεν υπήρχε πρόσδεση ERK2 κινάσης. Πιθανολογείται ότι η πρόσδεση της ERK2 με την β6, είτε διευκολύνει την φωσφορυλίωση της, είτε την προστατεύει από την απενεργοποίηση από τις κυτταρικές φωσφατάσες. Το 15μερές πρότυπο πρόσδεσης της ERK που βρίσκεται στην κυταροπλασματική πλευρά της β6 έχει σημαντική ομολογία με αρκετές θέσεις πρόσδεσης των MAP κινασών σε μόρια που προσδένουν τις MAPK συμπεριλαμβανομένων θετικά φορτισμένων αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο. Αλλαγή των αμινοξέων αυτών από αργινίνη/λυσίνη σε αλανίνη οδηγεί σε πλήρη απώλεια πρόσδεσης της β6 με την ERK2. Η ERK2 συνδέεται και με την β5 υπομονάδα της ιντεγκρίνης αλλά μόνο σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την β6 ή την εκφράζουν χωρίς να διαθέτουν την 15μερή θέση σύνδεσης. Η σημασία της πρόσδεσης της β5 με την ERK2 παραμένει αδιευκρίνιστη. Η ίδια ερευνητική ομάδα (Agrez και συν. 1999) έχει δείξει ότι υπάρχει άμεση θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της β6 σε καρκινικά κύτταρα του κόλου και της έκκρισης της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP9). Επιπρόσθετα, η έκθεση των καρκινικών κυττάρων σε ειδικό αναστολέα των MMPs μηδενίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων στο στρώμα. Η μέγιστη έκφραση και της MMP-9 και της β6 υπομονάδας της ιντεγκρίνης έχει παρατηρηθεί στο όριο διηθητικών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Η παραγωγή MMP-9 σε επιθηλιακά κύτταρα εξαρτάται άμεσα από την ενεργοποίηση της σηματοδότησης της ERK (Zeigler και συν. 1999).

Στόχοι για τις ERK δεν αποτελούν μόνο μεταγραφικοί παράγοντες του πυρήνα όπως το c-myc αλλά και κυταροπλασματικοί παράγοντες όπως π.χ η οικογένεια της ριβοσωμιακής S6 πρωτεϊνικής κινάσης (RSK) που ενέχεται στην ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης. Σε μη επιθηλιακά κύτταρα οι RSK καταλύουν την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Bad (που ευνοεί την απόπτωση) και έτσι την αδρανοποιούν και άρα δρουν με αντιαποπτωτικό μηχανισμό (Bonni και συν. 1999). Ένας ακόμη κρίσιμος στόχος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας CREB μέσω του οποίου το μονοπάτι σηματοδότησης των MAP κινασών μπορεί να προωθήσει την κυτταρική επιβίωση τροποποιώντας τον θάνατο του κυττάρου.

Ένας ισχυρός αναστολέας των MAP κινασών έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την καρκινική ανάπτυξη σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια (Sebolt-Leopold και συν. 1999). Επειδή όμως οι MAP ενέχονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών παραμένει το πρόβλημα

του να μην προσβληθούν τα φυσιολογικά κύτταρα κατά την αντινεοπλασματική θεραπεία. Δεδομένου ότι η de novo έκφραση συμβαίνει στην ογκογένεση, η στόχευση είτε της β6 είτε της αλληλεπίδρασης της με την MAPK ίσως προσφέρει μεγαλύτερη θεραπευτική ειδικότητα κατά την αντικαρκινική θεραπεία.

Μηχανισμός 3: Ογκογένεση μέσω Notch

Τα γονίδια Notch του *C.elegans*, της *Drosophila melanogaster* και των σπονδυλωτών κωδικοποιούν υποδοχείς υπεύθυνους για μέλλον των κυττάρων κατά την ανάπτυξη. Οι υποδοχείς Notch και οι συνδέτες τους, Δέλτα και Jagged ενοχοποιούνται για αρκετές ανθρώπινες ασθένειες. Κολοβωμένες, διαρκώς ενεργές, μεταλλαγμένες μορφές του υποδοχέα Notch φαίνεται ότι ενέχονται στην T-κυτταρική λευχαιμία του ανθρώπου, στην καρκινογένεση του ποντικού και σε έναν καρκινικό φαινότυπο στον *C.elegans*. Οι Fitzgerald και συν. (2000) έδειξαν ότι απαιτούνται μηνύματα που ξεκινούν από το Ras, μέσω των ERK κινασών, για αυτό τον μηχανισμό ογκογένεσης.

Μηχανισμός 4: Σηματοδότηση μέσω υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες

Στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παράγονται και εκκρίνονται διάφορα νευροπεπτίδια που θεωρούνται και τα κυρίαρχα μιτογόνα σε αυτούς τους όγκους. Η γαλανίνη ήταν ανάμεσα στα πρώτα πεπτίδια που διαπιστώθηκε η μιτογόνος δράση τους. Τα νευροπεπτίδια εξασκούν την δράση τους με πρόσδεση σε υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες. Η πρόσδεση του νευροπεπτιδίου στον υποδοχέα μεταδίδει πληροφορία στο κύτταρο μέσω ενεργοποίησης των ρυθμιστικών G πρωτεϊνών. Προκαλείται ανταλλαγή του GDP για GTP στην υπομονάδα α της G πρωτεΐνης που ακολουθείται από διάσπαση του τριμερούς σε α υπομονάδα προσδεδεμένη στο GTP και σε ένα βγ διμερές. Και η προσδεδεμένη στο GTP υπομονάδα και το βγ διμερές είναι σηματοδοτικά μόρια και ενεργοποιούν ένζυμα και διαύλους ιόντων. Τα τελευταία χρόνια έγινε φανερό ότι συστήματα υποδοχέων και G πρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και ακόμη και στον μετασχηματισμό, εμπλέκοντας μονοπάτια όπως οι MAP κινάσες που κλασσικά ενεργοποιούνται από τον EGF και PDGF. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι υπομονάδες α G πρωτεϊνών ανεπαρκείς σε GTPάση μπορούν να επάγουν εξαλλαγή του φαινότυπου σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές ινοβλαστών και μεταλλαγμένες α υπομονάδες G πρωτεϊνών έχουν βρεθεί σε διάφορους καρκίνους. Το νευροπεπτίδιο γαλανίνη ήταν ανάμεσα στα πρώτα για τα οποία δείχθηκε ότι υπάρχει μιτογόνος δράση (Dhanasekaran και συν. 1998).

Το νευροπεπτίδιο γαλανίνη έχειδειχθεί ότι σε καρκινικές σειρές μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (H69 και H510) προκαλεί μια ταχεία και παροδική αύξηση του ενδοκυτταρίου ασβεστίου και διεγείρει την κλωνική ανάπτυξη σε ημιστερεό μέσο (Sethi και Rozengurt 1991). Η αύξηση αυτή προκαλείται μέσω των ERK κινασών που ενεργοποιούνται από την γαλανίνη με ένα τρόπο εξαρτώμενο από την πρωτεϊνική κινάση C (Seufferlein και Rozengurt 1996). Ως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τρεις τύποι υποδοχέων γαλανίνης. Σε μελέτη τους οι Wittau και συν. (2000) έδειξαν ότι ο υποδοχέας GALR2 συζεύγνυται με μέλη τριών υποοικογενειών G πρωτεϊνών δηλαδή των G_q , G_i και G_{12} . Η διέγερση της $G_{q/11}$ συντελεί σε αύξηση του ασβεστίου ικανή να διεγείρει την δραστικότητα των ERK ακόμη και επί απουσίας πρωτεϊνικής κινάσης.

Στον καρκίνο του προστάτη, η έκφραση των υποδοχέων των συζευγμένων με τις πρωτεΐνες που προσδένουν φωσφορική γουανοσίνη (Guanosine phosphate Protein Coupled Receptors ή GPCR) καθώς και των συνδετών τους είναι αυξημένη τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα του στρώματος. Αυτό μάλιστα μπορεί να συμβαίνει με αυτοκρινή, παρακρινή και εξωκρινή τρόπο. Τα προστατικά κύτταρα αυτά καθεαυτά μάλιστα εκτός του ότι εκφράζουν, παράγουν και εκκρίνουν συνδέτες των GPCR που μπορούν να ενεργοποιήσουν υποδοχείς στην επιφάνεια τους ή στην επιφάνεια άλλων κυττάρων. Μετά την πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα GPCR ενεργοποιείται αρχικά είτε η πρωτεϊνική κινάση C είτε το Ras και ακολούθως ο καταρράκτης των διαδοχικών φωσφορυλιώσεων των MAP κινασών (Raj και συν. 2002).

B.3. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ERK ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Καρκίνος κόλου: Η χρήση αμφοτερίνης που είναι ένας συνδέτης για τον υποδοχέα των advanced glycation end products προκάλεσε σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του κόλου αύξηση των ERK1 και ERK2 και της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 και έτσι οδήγησε σε κυτταρική αύξηση, διήθηση και μετάσταση. Οι δράσεις αυτές αναστάλθηκαν με την χρήση antisense ολιγονουκλεοτιδίων αμφοτερίνης (Kuniyasu και συν. 2003). Υποσχέσεις για θεραπεία δίνουν διάφοροι παράγοντες όπως η σουλινδάκη που αναστέλλουν την φωσφορυλίωση των ERK1 και ERK2 και του Bad από τον EGF και μειώνουν το ολικό ποσό του Bad στην σειρά HT29 καρκίνου του κόλου (Rice και συν. 2003)

Καρκίνος στοματικής κοιλότητας: Οι Mishima και συν. μελέτησαν 39 δείγματα από βιοψία πλακώδους καρκίνου του στόματος και 5 φυσιολογικού βλεννογόνου των ούλων όσον αφορά την

έκφραση ERK πρωτεΐνης και του δείκτη πολλαπλασιασμού ki-67. Στην μελέτη η κατανομή της ERK πρωτεΐνης ήταν διαφορετική από αυτή του ERKmRNA. Η ERK πρωτεΐνη εντοπιζόταν στην επιφανειακή στοιβάδα του φυσιολογικού βλεννογόνου ενώ το ERKmRNA εντοπιζόταν στην βασική και ακανθώδη στοιβάδα. Αντίθετα σε καλώς διαφοροποιημένα και μετρίως διαφοροποιημένα καρκινώματα εκ πλακώδους επιθηλίου, τα κερατωσικά κύτταρα γύρω από τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν σήματα για mRNA και πρωτεΐνη ERK σε υψηλότερα επίπεδα απ' ό,τι ο φυσιολογικός βλεννογόνος των ούλων. Σε κακώς διαφοροποιημένα καρκινώματα τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα εξέφραζαν την ERK. Ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης του καρκίνου σχετιζόταν με το ποσοστό των θετικών κυττάρων για ERK και για MIB-1. Μετατόπιση του ERK από το κυτταρόπλασμα στην πυρηνική μεμβράνη σχετιζόταν στενά με κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά δεν ανιχνεύθηκε μέσα στον πυρήνα στην μελέτη αυτή.

Καρκίνος σιελογόνων αδένων: Η φωσφορυλιωμένη μορφή των ERK1 και ERK2 ανιχνεύθηκε με αντίσωμα έναντι της στο 39% των βλεννοεπιδερμοειδών καρκίνων των σιελογόνων αδένων. Στις περιπτώσεις όπου υπήρχε αυξημένη έκφραση, υπήρχε πιο επιθετική συμπεριφορά του όγκου που συσχετιζόταν με τους δείκτες Ki67 και κυκλίνη A (Handgra-Luca και συν. 2003).

Καρκίνος στομάχου: Εξετάσθηκε η έκφραση της νευροπιλίνης 1 και του EGF υποδοχέα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου στομάχου. Η νευροπιλίνη 1 δρα ως συνυποδοχέας για τον VEGF-165 και αυξάνει την συγγένεια του για τον VEGF-R2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε 5 από 7 κυτταρικές σειρές υπήρχε συνέκφραση της νευροπιλίνης 1 και του EGF υποδοχέα και η προσθήκη EGF προκαλεί αύξηση της έκφρασης τους μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης των ERK 1 και ERK2, p38 και 3 φωσφατιδοινοσιτόλης (Akagi και συν. 2003). Σε λοιμώξεις με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού επάγεται η έκφραση κυτοκινών της φλεγμονής όπως της ιντερλευκίνης 8 και του παράγοντα νέκρωσης του όγκου α (TNF α) στο γαστρικό βλεννογόνο, και τα γονίδια τους έχουν θέσεις πρόσδεσης AP-1 που έχει Serum Response Element στην περιοχή του υποκινητή. Οι Mitsuno και συν. (2001) χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά στελέχη *Helicobacter pylori* μελέτησαν τον ρόλο τους πάνω σε κύτταρα καρκίνου του στομάχου. Τα στελέχη αυτά ήταν τα ακόλουθα: το TN2 που είναι το μόνο που φέρει νήσο παθογονικότητας, το TN2-vacA, το TN2-cagE και το T68. Το πρώτο από τα στελέχη αυτά προκαλούσε την μεγαλύτερη ενεργοποίηση του SRE και του AP-1 ενώ αύξανε και τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1 και ERK2 και JNK και c-Jun.

Καρκίνος ήπατος: Μελετήθηκε η έκφραση των ERK-1, ERK-2, Mek-1, Mek-2 σε σωματιδιακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα που παρασκευάστηκαν από δείγματα από καρκίνο ήπατος και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Χρησιμοποιήθηκε τεχνική Western blot με ειδικά αντισώματα κατά των προαναφερθέντων πρωτεϊνών. Η λειτουργική δραστηριότητα της ERK-2 όπως προσδιορίστηκε με φωσφορυλίωση της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης ήταν σημαντικά αυξημένη και στην μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα στον καρκινικό ιστό συγκριτικά με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (Schmidt και συν. 1997). Σε μελέτη 25 ηπατοκυτταρικών καρκίνων και 69 χολαγγειοκαρκινωμάτων με άμεση ανάλυση της αλληλουχίας του DNA έγινε διερεύνηση για μεταλλάξεις του B-Raf και του K-Ras. Η αναζήτηση παρουσίας ενεργών ενδιάμεσων του μονοπατιού MAPK έγινε με ανοσοϊστοχημεία. Μεταλλάξεις του B-Raf που ενεργοποιούν βρέθηκαν στο 22% των χολαγγειοκαρκινωμάτων και σε μια περίπτωση του ηπατικού ιστού που περικλείει τον όγκο. Μεταλλάξεις του K-Ras βρέθηκαν στο 45% των χολαγγειοκαρκινωμάτων και σε 2 περιπτώσεις παρακείμενου του όγκου ηπατικού ιστού. Αντίθετα στους ηπατοκυτταρικούς όγκους ούτε μεταλλάξεις του B-Raf ούτε του K-Ras ανευρέθησαν. Στις περιπτώσεις που υπήρχαν μεταλλάξεις του K-Ras δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις του B-Raf. Διαταραχή του μονοπατιού των Raf/MEK/ERK είτε λόγω μεταλλάξεων του B-Raf είτε του K-Ras ανευρέθηκε στο 62% όλων των χολαγγειοκαρκινωμάτων και γιαυτό θεωρείται μια από τις συχνότερες βλάβες στους όγκους αυτούς (Tannapfel και συν. 2003).

Καρκίνος παγκρέατος: Μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση του DUSP6/MKP-3 πρωτεΐνης σε καρκίνο του παγκρέατος (Furukawa και συνεργάτες 2003). Παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφατάσης αυτής, που αποφωσφορυλιώνει την ERK κινάση συνιστώντας έτσι ένα μηχανισμό ελέγχου της δραστηριότητας της, σε μέτρια ως καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα όπως επίσης σε σοβαρές δυσπλασίες και *in situ* καρκινώματα ενώ ήταν μειωμένη σε διηθητικά και ιδίως κακώς διαφοροποιημένα καρκινώματα. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παγκρέατος ο TGF-β1 προκαλούσε μια μέτρια αλλά παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK-2. Ο TGF-β1 προκαλούσε μια αλλαγή που χαρακτηριζόταν από μορφολογία δίκην ινοβλαστών, αύξηση των μεσεγχυματοειδών δεικτών, μείωση των επιθηλιακών δεικτών καθώς επίσης και διήθηση, μετανάστευση και διασπορά του καρκίνου. Η επώαση με τον PD98059 αναστολέα του συστήματος των MAP κινασών οδηγούσε σε μείωση των προαναφερθέντων αλλαγών, υποδηλώνοντας έτσι ότι οι δράσεις του TGF-β1 επάγονται μέσω του συστήματος των MAP κινασών (Ellenrieder και συν. 2001).

Καρκίνος εγκεφάλου: Σε μελέτη 89 νευροχειρουργικών παρασκευασμάτων καρκίνων του εγκεφάλου (συμπεριλαμβάνονταν 52 αστροκυτώματα, 17 ολιγοδενδρογλοιώματα, 6 επενδυώματα, 11 αδενοκαρκινώματα και 3 λεμφώματα) παρατηρήθηκε με χρήση αντισώματος κατά της φωσφορυλιωμένης μορφής του ERK ότι την μεγαλύτερη ενζυμική ενεργοποίηση είχαν τα αστροκυτώματα ανεξαρτήτως grade ενώ τα ολιγοδενδρογλοιώματα είχαν την μικρότερη (Mandell και συνεργάτες 1998). Τα ολιγοδενδρογλοιώματα με αναπλαστική εξέλιξη παρουσίαζαν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων με ενεργό ERK σε σχέση με ολιγοδενδρογλοιώματα χωρίς αναπλαστική εξέλιξη. Στα γλοιοβλαστώματα η μικροαγγειακή υπερπλασία και νέκρωση σχετιζόνταν με την ενεργοποίηση των ERK στα παρακείμενα καρκινικά κύτταρα.

Καρκίνος του προστάτη: Στον καρκίνο του προστάτη μελετήθηκε σε διαγονιδιακό μοντέλο με Western blot και ανοσοϊστοχημεία η έκφραση κινασών της MAPK οικογένειας (Uzgare και συν. 2003). Βρέθηκε ότι σε καλώς διαφοροποιημένους προστατικούς όγκους η p38 κινάση ήταν σημαντικά αυξημένη (2,3 φορές) συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Επίσης, αλλοιώσεις προστατικής επιθηλιακής νεοπλασίας που εξέφραζαν την ενεργοποιημένη p38MAPK εμφάνιζαν περισσότερα στοιχεία πολλαπλασιασμού παρά απόπτωσης. Η έκφραση ενεργοποιημένης ERK1/2 επίσης κατά προτίμηση συνεντοπιζόταν σε έναν υποπληθυσμό επιθηλιακών κυττάρων μέσα στις αλλοιώσεις προστατικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και σχετιζόταν με την έκφραση ki-67. Αντίθετα ενεργοποιημένες μορφές ERK1/2, JNK, p38MAPK ήταν μειωμένες ή και απύσες σε όψιμα στάδια αδενοκαρκινωμάτων και μεταστάσεων.

Οι Royela και συν. (2002) μελέτησαν την έκφραση MAP κινασών με Western blot και ανοσοϊστοχημεία σε δείγματα προστάτη από 15 άνδρες μετά από νεκροτομή, από 25 άνδρες με διάγνωση καλοήθους επιθηλιακής υπερπλασίας και από 25 άνδρες με καρκίνο του προστάτη. Με μέθοδο Western blot έδειξαν ότι την μεγαλύτερη έκφραση ποσοτικά είχε η ομάδα των ασθενών με καρκίνο συγκριτικά με τις υπόλοιπες δύο ομάδες και η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Στην μελέτη με ανοσοϊστοχημεία παρατήρησαν ότι θετικοί για χρώση με ERK ήταν το 81% των πυρήνων των κυττάρων του στρώματος σε φυσιολογικούς προστάτες, αλλά δεν υπήρχε χρώση στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Στα δείγματα από προστάτη με καλοήθη υπερπλασία το ποσοστό των κυττάρων του στρώματος που παρουσίαζε θετική χρώση ήταν παρόμοιο με αυτό του φυσιολογικού προστάτη αλλά είχε θετική χρώση και το 75% των πυρήνων των επιθηλιακών κυττάρων. Σε δείγματα από καρκίνο του προστάτη το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων που είχε θετική χρώση για ERK ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτό σε καλήθη υπερτροφία του προστάτη και έφτανε το 90% ενώ και το στρώμα παρουσίαζε θετική χρώση σε ποσοστό παρόμοιο με αυτό του φυσιολογικού προστάτη.

Καρκίνος πνεύμονα: Σε 60 δείγματα από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρατηρήθηκε στο 28% ανοσοϊστοχημική έκφραση φωσφορυλιωμένης ERK. Υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ αυτής της έκφρασης και εκείνης του EGFR. (Mukohara και συν. 2003). Σε έξι κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα (A549, HLC-1, ABC-1, LC-2/ad, VMRC-LCD, L27) παρατηρήθηκε παράλληλη συσχέτιση των επιπέδων m-RNA cox-2 και σε ένα μικρότερο βαθμό των επιπέδων mRNA της γ -2 λαμινίνης 5 με τα επίπεδα έκφρασης του erbB-2 και της φωσφορυλιωμένης μορφής της ERK1/2 (Niki και συν. 2002). Σε μελέτη των Blackhall και συν. (2003) προσδιορίστηκε με ανοσοϊστοχημεία η έκφραση της MAPK σε βιοψίες από 42 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος. Παρατήρησαν έκφραση της p-MAPK σε 48% των καρκίνων αυτών. Η αυξημένη έκφραση της MAPK στο κυτταρόπλασμα είχε προγνωστική σημασία. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένη κυτταροπλασματική έκφραση της p-MAPK είχαν καλύτερη ολική επιβίωση (1,8 έτη έναντι 1,0 έτη αυτών με αρνητική κυτταροπλασματική έκφραση, $p=0.0054$).

Νεοπλάσματα γεννητικού συστήματος θήλεος

Αδενοκαρκίνωμα ωοθήκης: Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEY αδενοκαρκινώματος των ωοθηκών σαν *in vitro* μοντέλο για την μελέτη της δράσης του ανασυνδυασμένου human granulocyte colony-stimulating factor σε επιθηλιακούς όγκους όπως ο καρκίνος των ωοθηκών. Βρέθηκε ότι μετά από διέγερση με τον παράγοντα αυτό υπήρχε ως και 2,5 φορές αύξηση των ERK1 και ERK2 (Brandstetter και συν. 1998).

Λειομύωματα μήτρας: Οι Chegini και Kornberg (2003) μελέτησαν την επίδραση της θεραπείας με ανάλογα της έκλυσης των γοναδοτροπινών για λειομύωματα όσον αφορά την έκφραση των κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυττάρια σήματα καθώς και των κινασών εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion kinases). Συγκεκριμένα καθορίστηκε η έκφραση των ERK1, ERK2, pERK, FAK, pFAK με χρήση μεθόδων Western Blot και ανοσοϊστοχημείας σε λειομύωματα και σε φυσιολογικό ενδομήτριο. Υπήρχε έκφραση και στο φυσιολογικό ενδομήτριο και στα λειομύωματα των ERK1, ERK2, FAK με υψηλότερα επίπεδα ERK2, pERK και FAK στα λειομύωματα. Η θεραπεία με GnRH ανάλογα συντέλεσε σε μείωση των επιπέδων ERK2 και FAK με σημαντική μείωση των pERK1/2 και χαμηλά ως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα pFAK και στο λειομύωμα και στον φυσιολογικό ιστό σε σύγκριση με την μη θεραπευμένη ομάδα Chegini και Kornberg (2003). Ανοσοϊστοχημικά η ERK1, ERK2, FAK, pERK1/2, pFAK εντοπίζονταν στα λεία μυϊκά κύτταρα και στους ινοβλάστες του συνδετικού ιστού σε λειομύωματα υπό αγωγή αλλά

και χωρίς αγωγή με GnRH ανάλογα και σε μυομήτριο φυσιολογικό, με σημαντική μείωση της έντασης της χρώσης σε ιστούς υπό αγωγή.

B.4. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ERK ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι Sivaraman και συν. (1997) μελέτησαν την έκφραση των MAPK στον καρκίνο μαστού του ανθρώπου και σε καλοήθεις παθήσεις του μαστού με ανοσοστύπωμα, ανοσοϊστοχημεία και *in situ* PCR για πρώτη φορά στον κόσμο. Συγκεκριμένα μελέτησαν 37 δείγματα μαστικού ιστού: 5 από φυσιολογικό μαστό, ένα με γυναικομαστία, τέσσερα με καλοήθη ινοαδενώματα, πέντε με ινοκυστική νόσο, ένα με ινοκυστική νόσο και ινοαδένωμα, δύο με χρόνια φλεγμονώδη νόσο, έντεκα με καρκίνο και ένα με καρκινোসάρκωμα. Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα EGF παρατήρησαν ότι η δράση των MAPK ήταν αυξημένη στα εκχυλίσματα που ελήφθησαν από τα δείγματα των ασθενών με καρκίνο σε αντίθεση με αυτά των καλοήθων καταστάσεων. Ειδικότερα η δραστηριότητα κινάσης ήταν $1,4 \pm 0,19$ pmol/min/mg πρωτεΐνης στον καλοήθη ιστό και $6,39 \pm 0,71$ pmol/min/mg πρωτεΐνης σε διηθητικό καρκίνο ($p < 0,05$). Αφού η αυξημένη δραστηριότητα μπορεί να αντανakλά ενεργοποίηση της MAP κινάσης από σήματα που βρίσκονται σε πρωϊότερο σημείο στον καταρράκτη ενεργοποίησης προσδιορίστηκε και το ποσό της MAP κινάσης με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των εκχυλισμάτων και ανοσοστύπωμα με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης MAP κινάσης. Επίσης παρατηρήθηκε έντονη υπερέκφραση της MAP κινάσης σε περιπτώσεις καρκινωμάτων σε αντίθεση με τις μη κακοήθεις επεξεργασίες. Στην ίδια μελέτη με RT-PCR αποδείχθηκε παρουσία mRNA της MAP κινάσης στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα και ειδικότερα στο κυτταρόπλασμα καθώς και σε μεταστατικά κύτταρα λεμφαδένων, όχι όμως στα περιβάλλοντα κύτταρα του στρώματος αλλά ούτε των λιποκυτάρων (Sivaraman και συν. 1997). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της MAP κινάσης παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων. Σε παραιτέρω ανάλυση των εκχυλισμάτων οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν αντίσωμα κατά της φωσφορυλιωμένης μορφής της MAPK παρατήρησαν αύξηση του ολικού ποσού της MAPK κινάσης και του ποσού της φωσφορυλιωμένης κινάσης. Οι Sivaraman και συν. (1997) καταλήγουν ότι η ενεργοποίηση της MAP κινάσης που παρατηρείται στον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αλλά και στην υπερέκφραση της MAPK κινάσης, η οποία φτάνει 5-20 φορές πάνω από το φυσιολογικό, αποτελώντας ένα κρίσιμο σημείο στην έναρξη/εξέλιξη του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού και των μεταστάσεων του.

Διέγερση καρκινικών κυττάρων μαστού από αυξητικούς παράγοντες μεσολαβούμενη από MAPK

Ο καρκίνος του μαστού στον άνθρωπο και οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού μπορούν να διακριθούν σε εξαρτώμενες από στεροειδείς ορμόνες (οιστρογόνα και προγεστερόνη) ή όχι. Οι ανεξάρτητοι από στεροειδείς ορμόνες υπότυποι συχνά χρησιμοποιούν μεταβολικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν πεπτιδικές ορμόνες ή αυξητικούς παράγοντες στους οποίους οι MAP κινάσες μεσολαβούν στην αύξηση (Sivaraman και συν. 1997). Τέτοιοι παράγοντες είναι ο EGF, ο IGF-1, η ινσουλίνη, η προλακτίνη και ο TGF-α και ο TGF-β. Κύτταρα που υπερεκφράζουν c-erbB-2 παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα MAPK που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του c-erbB-2 με ενδογενείς συνδέτες. Κύτταρα της καρκινικής σειράς T47D απαντούν στην heregulin με έντονη αύξηση της ενεργοποιημένης MAP κινάσης. Επίσης η πρόσδεση του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης στον υποδοχέα του ενεργοποιεί τη MAP κινάση σε κύτταρα MCF-7. Μόνο το αμινοτελικό κλάσμα είναι απαραίτητο για την επαγωγή ενεργοποιημένης MAP κινάσης. Βιολογικά η αύξηση αυτή οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης μέσω μεμβρανών των MCF-7 κυττάρων. Η ινσουλίνη και ο TPA διεγείρουν την MAP κινάση στην σειρά MCF-7 καρκίνου του μαστού. Ο TGF-β διεγείρει την ERK-2 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού αλλά παραδόξως αναστέλλει την αύξηση τους. Η IL-6 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του EGF στην σειρά T47D ώστε να ενεργοποιήσει την MAP κινάση. Υπερέκφραση του EGF και των ERB-B-2 υποδοχέων αυξάνει την έκφραση του Ras και MAP κινάσης στα κύτταρα καρκίνου του μαστού. Ο FGF-2 προκαλεί την ενεργοποίηση της MAP κινάσης σε MCF-7 κύτταρα. Η ρύθμιση της ενεργοποιημένης MAP κινάσης περιλαμβάνει διεγερτικά όσο και ανασταλτικά μονοπάτια. Ο FGF διεγείρει την MAP κινάση μέσα σε 1-2 λεπτά με μέγιστη διέγερση στα 6-8 λεπτά και πτώση κατόπιν στα MCF-7 κύτταρα. Το οκαδαϊκό οξύ που είναι ένας αναστολέας των φωσφατάσων 1 και 2α ανέστειλε την ταχεία πτώση της ενεργοποίησης των MAP κινάσεων. Ο TNF-α επίσης προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ενεργοποίησης της MAP κινάσης σε κύτταρα MCF-7 που εκτίθενται στις διεγερτικές επιδράσεις του EGF.

Διέγερση καρκινικών κυττάρων μαστού από οιστραδιόλη μη μεσολαβούμενη από MAPK.

Ένας αριθμός καρκίνων του μαστού εξαρτάται από τα οιστρογόνα για την ανάπτυξη του. Βασισμένη σ' αυτή την αρχή είναι η χρήση αναστολέων της δράσης των οιστρογόνων (αντιοιστρογόνων) και της σύνθεσης των οιστρογόνων (αναστολέων της αρωματάσης). Φαίνεται από μελέτες ότι τα οιστρογόνα μπορούν να διεγείρουν την καρκινική ανάπτυξη και μέσω του μονοπατιού των MAP κινάσεων και με ανεξάρτητο από αυτές τρόπο. Οι Bonapace και συν. (1996) χρησιμοποίησαν αναστολείς του ενεργοποιημένου Ras ώστε να καθορίσουν κατά πόσο η

οιστραδιόλη μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό σε απουσία ενεργοποίησης των MAP κινασών. Το Ras είναι λειτουργικό μόνο εφόσον είναι παρόν στην κυτταρική μεμβράνη. Η μετατόπιση του Ras στην κυτταρική μεμβράνη ενισχύεται από την προσθήκη μιας ομάδας ισοπρενυλίου στο καρβοξυτελικό του άκρο. Χωρίς αυτό, το Ras δεν μπορεί να προσδεθεί στην μεμβρανική πρωτεΐνη καβεολίνη. Καθότι οι αναστολείς της αναγωγής του HMG-Co-A είναι ισχυροί και μη τοξικοί αναστολείς της ισοπρενυλίωσης οι Bonapace και συν. (1996) χρησιμοποίησαν την μεβαστατίνη σε μελέτες στην κυτταρική σειρά MCF-7. Κύτταρα σε απουσία οιστρογόνων συγχρονίζονται στην G₀ φάση ηρεμίας. Όταν εκτεθούν σε οιστραδιόλη υπόκεινται σε αυξημένη σύνθεση DNA, δείχνοντας έτσι την ικανότητα τους να παρουσιάζουν αυξημένη σύνθεση DNA απουσία ενεργοποίησης των MAP κινασών. Οι ερευνητές έδειξαν ότι η ERK1 και η ERK2 δεν αυξάνεται από την οιστραδιόλη σε αυτά τα κύτταρα όταν χρησιμοποιείται μεβαστατίνη. Υπό αυτές τις συνθήκες η οιστραδιόλη διεγείρει το c-Myc που είναι γονίδιο με μιτογόνο δράση. Επί παρουσίας anti-sense c-Myc RNA η οιστραδιόλη δεν μπορεί να διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη. Η D1 κυκλίνη μπορεί επίσης να διεγερθεί από την οιστραδιόλη παρουσία μεβαστατίνης (Altucci και συν. 1996). Οι Jeng και συν. (1998) χρησιμοποιώντας τον αναστολέα των MAP κινασών PD 98059 έδειξαν ότι η οιστραδιόλη ήταν ικανή να προκαλεί την ενσωμάτωση τριτωμένης θυμιδίνης στο DNA παρά την απουσία ενεργοποιημένης MAP κινάσης.

Διέγερση από οιστραδιόλη μεσολαβούμενη από MAP κινάση

Γενωμικά μονοπάτια

Η οιστραδιόλη είναι γνωστό ότι αυξάνει τα επίπεδα αρκετών αυξητικών παραγόντων όπως του TGF- α , IGF-1 και του υποδοχέα του. Ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών θα αναμενόταν να αυξάνει την MAP κινάση. Μια κοινή αλληλουχία γεγονότων που προάγεται από τους αυξητικούς παράγοντες περιλαμβάνει την ενεργοποίηση υποδοχέων με δραστηριότητα κινάσης, φωσφορυλίωση της Shc και πρόσδεση της Shc στον υποδοχέα (Santen και συν. 2003). Συμπλέγματα που περιλαμβάνουν τα GRB-2 και SOS σχηματίζονται. Η SOS διευκολύνει την μετατροπή GDP σε GTP-Ras που πυροδοτεί την μεσολαβούμενη από το Raf-1 φωσφορυλίωση του MEK (Santen και συν. 2003) και ακολούθως την ενεργοποίηση της MAP κινάσης (**Εικόνα 6**).

Τα στοιχεία από τα MCF-7 κύτταρα δείχνουν ότι η οιστραδιόλη προκαλεί αύξηση της MAP κινάσης που έχει την αιχμή της στις 24 ώρες. Οι Lobenhofer και συν. (2000) έδειξαν αναστολή της σύνθεσης DNA στα MCF-7 κύτταρα με χρήση του PD 98059 αναστολέα. Πιθανοί μηχανισμοί όσον αφορά την δράση της αναστολής των MAP κινασών μπορεί να συμβαίνουν σε

δύο επίπεδα. Στο ένα επίπεδο η MAP κινάση διεγείρει την ενεργοποίηση του Elk-1 και άλλων παραγόντων που περιλαμβάνονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε ένα άλλο επίπεδο οι επιδράσεις της οιστραδιόλης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μπορεί να αυξάνονται μέσω διαλόγου μεταξύ της MAP κινάσης και των οιστρογονικών υποδοχέων, μέσω φωσφορυλίωσης των οιστρογονικών υποδοχέων στις σερίνες στις θέσεις 118 και 167.

Μη γενωμικές επιδράσεις των οιστρογόνων στην MAP κινάση

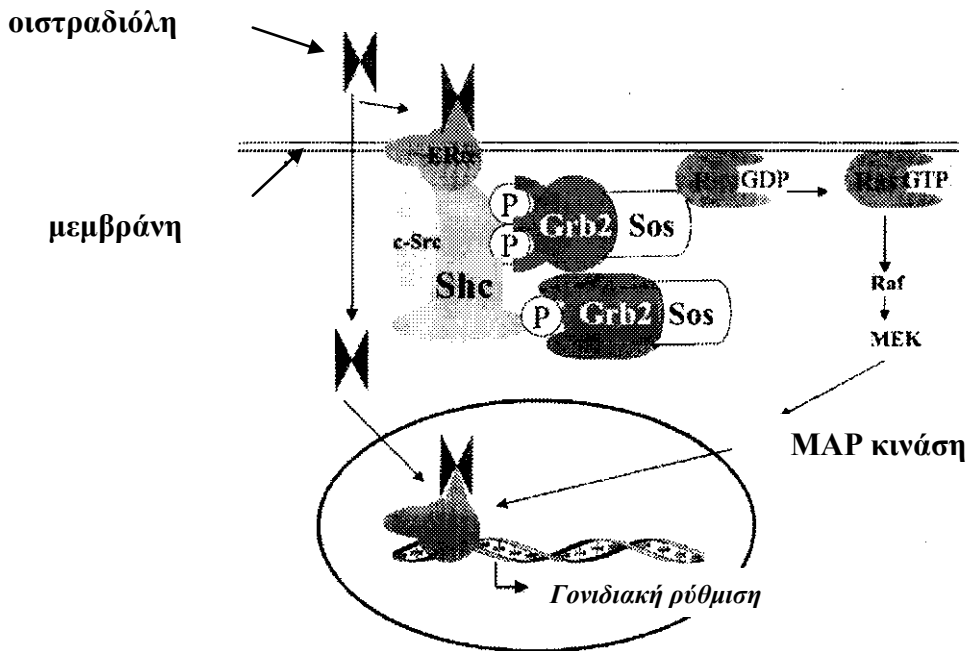
Η οιστραδιόλη εξασκεί αρκετές από τις δράσεις της στις κυτταρικές λειτουργίες με διαδικασίες που χαρακτηρίζονται ως μη γενωμικές όπως συμπεραίνεται από την ταχύτητα των δράσεων αυτών. Παραδείγματα αποτελούν η αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρίου ασβεστίου, η τροποποίηση των διαύλων καλίου, η φωσφορυλίωση του CREB (cAMP response element binding protein), η έκκριση προλακτίνης, η δημιουργία οξειδίου του αζώτου, η παραγωγή φωσφορικής ινοσιτόλης, η ενεργοποίηση *Gaq* και *Gas* πρωτεϊνών, η φωσφορυλίωση *Shc*, επαγωγή δραστηριότητας *c-SRC* κινάσης και μορφολογικές αλλαγές στις μικρολάχνες, στην επιφάνεια του αυλού κροσσών, σε ψευδοπόδια σε μορφή κύματος στην μεμβράνη και αξονικές άκανθες κερατίνης. Αρκετές από αυτές τις δράσεις σχετίζονται με αυξήσεις στα ποσά των ενεργοποιημένων ERK1 και ERK2 μέσα σε 3-5 λεπτά από την χορήγηση οιστραδιόλης (Castoria και συν. 1999). Κύτταρα όπως τα οστεοκύτταρα, τα Caco-2 κύτταρα καρκίνου του κόλου, τα MCF-7 κύτταρα, τα κύτταρα νευροβλαστώματος, οι νευρώνες του φλοιού, τα ER- α και ER- β διαμολυσμένα κύτταρα Rat-2 ανταποκρίνονται με αύξηση της MAP κινάσης σε 5 λεπτά (Di Domenico και συν. 1996, Castoria και συν. 1999, Wang και συν. 2014). Από το μικρό αυτό χρονικό διάστημα συνάγεται ότι δεν πρόκειται για διαδικασία που περιλαμβάνει μεταγραφή (μη γενωμική επίδραση).

Ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER) φαίνεται να ενέχεται στην μη γενωμική αυτή δράση καθώς η χρήση του ICI 164384 αντιοιστρογόνου αναστέλλει την δράση αυτή. Επιπρόσθετη απόδειξη είναι ότι η οιστραδιόλη δεν διεγείρει την ενεργοποίηση της MAP κινάσης σε COS κύτταρα επί απουσίας διαμόλυνσης με ER ενώ επί παρουσίας του προκαλείται σημαντική ενεργοποίηση. Και ο ER- α και ο ER- β μπορούν να προκαλέσουν την δράση αυτή. Για να λάβουν χώρα οι μη γενωμικές αυτές επιδράσεις πρέπει ο ER να είναι τοποθετημένος είτε μέσα, είτε κοντά στην πλασματική μεμβράνη (Coutts και Murphy, 1998). Διαμόλυνση με τον ER των cos κυττάρων οδήγησε σε εντόπιση του ER στην κυτταρική μεμβράνη σε ποσοστό 3% ενώ η πλειοψηφία του υποδοχέα ευρισκόταν στον πυρήνα. Με χρήση αντισωμάτων που κατευθύνονταν σε διαφορετικές περιοχές του ER δείχθηκε ότι ο ER εντοπιζόταν στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων υπόφυσης που παράγουν προλακτίνη. Χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξε ότι η

οιστραδιόλη κατευθύνει τον ER στην περιοχή της μεμβράνης που έχει μορφή κυματισμού ή εγγύς της σε MCF-7 κύτταρα. Επίσης διαμόλυνση των CHO κυττάρων με ER οδηγεί σε παρουσία του ER μέσα ή κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και ακολούθως και σε ενεργοποίηση της MAP κινάσης. Από τα ανωτέρω κάποιος θα υπέθετε ότι απαιτείται ολόκληρος ο ER ώστε να αρχίσουν οι ταχείες δράσεις της MAP κινάσης. Αυτό όμως δεν φαίνεται να ισχύει. Η περιοχή του ER που επιτρέπει την ενεργοποίηση της MAP κινάσης είναι διαφορετική από αυτή που απαιτείται για την μεταγραφή. Οι Castoria και συν. (1999) έδειξαν ότι σε κύτταρα NIH 3T3 που διαμολύνθηκαν με ER είναι δυνατόν να προσληφθεί τριτωμένη θυμιδίνη από ένα μεταλλαγμένο υποδοχέα ER που στερείται της περιοχής ER δ AA 303-407, περιοχή που προσδένει DNA. Ωστόσο ο μεταλλαγμένος αυτός υποδοχέας ER δεν μπορεί να διεγείρει την μεταγραφή. Οι Kousteni και συν. (2001) έδειξαν ότι μόνο η E περιοχή του ER είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της MAP κινάσης. Ο κολοβωμένος αυτός υποδοχέας ήταν επίσης αδρανής μεταγραφικά.

Προγεστερόνη και MAP κινάση

Σε κύτταρα T47D καρκίνου του μαστού η προγεστερόνη μπορεί να ενεργοποιήσει την MAP κινάση μέσα σε 3-5 λεπτά. Η δράση αυτή μπορεί να παρεμποδισθεί από το αμιγές αντισταρογόνο ICI 182780 (Zang και συν. 2009). Ο πλήρης προγεστερονικός υποδοχέας δεν απαιτείται για αυτή την δράση. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR) προσδένεται στο αμινοτελικό τμήμα 168 αμινοξέων του οιστρογονικού υποδοχέα και η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της MAP κινάσης. Είναι ενδιαφέρον ότι και τα αντισταρογόνα και τα αντιπρογεστερονικά μπορούν να παρεμποδίσουν αυτή την δράση. Τα προγεσταγόνα μπορούν επίσης να ευαισθητοποιήσουν τα κύτταρα στην δράση του EGF όσον αφορά την ενεργοποίηση της MAP κινάσης μέσω αύξησης της συγκέντρωσης του EGF υποδοχέα.



Εικόνα 6. Στα καρκινικά κύτταρα του μαστού η οιστραδιόλη μπορεί να προσδεθεί στον υποδοχέα των οιστρογόνων α στην περιμεμβρανική περιοχή. Ακολουθεί η έναρξη ενός καταρράκτη αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης –πρωτεΐνης που περιλαμβάνει την Shc, GRB-2, SOS και την MAP κινάση. Η οιστραδιόλη μπορεί επίσης να δώσει έναρξη σε μεταγραφικά γεγονότα στον πυρήνα (Santen και συν. 2003).

Ρύθμιση της MAP κινάσης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού

Η ορμονική θεραπεία των γυναικών με καρκίνο του μαστού συντελεί σε υποστροφή του όγκου που συντελείται εντός 12-18 μηνών. Αρκετοί ερευνητές έχουν υποθέσει ότι η θεραπεία αυτή οδηγεί σε προσαρμογή του όγκου με προς τα άνω ρύθμιση της MAP κινάσης. Υποθέτουν ότι, κατόπιν τούτου, η MAP κινάση ευδοκώνει τον πολλαπλασιασμό και οδηγεί στην ανάπτυξη του όγκου παρουσία πολύ μικρών ποσών οιστραδιόλης ή ακόμη και επί απουσίας της Ένας άλλος προσαρμοστικός μηχανισμός είναι η αύξηση του c-erbB-2 και η ενεργοποίηση της MAP κινάσης που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη αντοχής στην ταμοξιφαίνη. Οι Coutts και συν. (1998) υπέβαλλαν καρκινικά κύτταρα του μαστού στην πίεση προσαρμογής που προκαλεί η μακρόχρονη αποστέρηση οιστραδιόλης. Αυτά τα κύτταρα αρχικά σταμάτησαν να πολλαπλασιάζονται επί απουσίας της οιστραδιόλης, αλλά έπειτα ξανααναπτύχθηκαν. Κατά την φάση της εκ νέου ανάπτυξής τους, τα κύτταρα παρουσίαζαν μια σημαντική αύξηση του ποσού της ενεργοποιημένης MAP κινάσης. Αναστολείς της MAP κινάσης αναστέλλουν την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων υποδηλώνοντας τον ρόλο της MAP κινάσης στον πολλαπλασιασμό. Αμιγή αντιοιστρογόνα επίσης αναστέλλουν την αύξηση αυτών των κυττάρων και μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της MAP

κινάσης. Οι McCleskey και συν. (2001) ανέπτυξαν μια MCF-7 κυτταρική σειρά που προσαρμόστηκε σαν απάντηση στον ανταγωνισμό της οιστρογονικής δράσης από το αμιγές αντιστρογόνο ICI 182780. Αυτά τα κύτταρα ανέπτυξαν την ικανότητα να μπορούν να πολλαπλασιαστούν ξανά αν και το αντιστρογόνο ήταν παρόν μέσω αύξησης της MAP κινάσης. Η αύξηση της MAP κινάσης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει είτε συνεχή ενεργοποίηση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, συνεχή παραγωγή αυξητικών παραγόντων σε πλεόνασμα, είτε αυξημένες γενωμικές και μη γενωμικές απαντήσεις στην οιστραδιόλη. Στο μοντέλο του McCleskey και συνεργατών φαίνεται να υπήρχε συνεχής αύξηση της πρωτεΐνης του EGF και του μηνύματος που αυτός δίνει για αύξηση των επιπέδων της MAP κινάσης. Η μείωση της MAP κινάσης με ένα αμιγές αντιστρογόνο υποδηλώνει ότι δεν ήταν υπεύθυνη για την αύξηση της MAP κινάσης η συνεχής ενεργοποίηση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων ούτε η συνεχής έκκριση αυξητικών παραγόντων. Ο Song και συνεργάτες (2002) υπέθεσε ότι η αύξηση της MAP κινάσης στα κύτταρα αυτά μπορεί να οφείλεται σε αύξηση των μη γενωμικών δράσεων της οιστραδιόλης που δρουν μέσω του Shc- GRB-2, SOS μονοπατιού. Ως μαρτυρία για αυτό έδειξαν ότι κύτταρα στερημένα από οιστραδιόλη επί μεγάλο διάστημα είχαν μεγαλύτερα ποσά Shc προσδεμένα στον υποδοχέα οιστρογόνων κάτω από βασικές συνθήκες, από ότι έχουν τα κύτταρα φυσικού τύπου. Υποθέτουν ότι τα αυξημένα επίπεδα ER που είναι παρόντα σε μακρόχρονη στέρηση οιστραδιόλης, μπορεί να είναι ένας παράγοντας που μπορεί να αυξάνει την αλληλεπίδραση Shc-ER. Μια άλλη μελέτη που περιλαμβάνει μέτρηση ενεργοποιημένης MAP κινάσης σε κύτταρα που τους έχει αποστειρωθεί οιστραδιόλη έχει γίνει *in vivo* σε αλλομοσχεύματα (Shim και συν. 2000). Καρκινικά κύτταρα φυσικού τύπου και καρκινικά κύτταρα στα οποία έχει στερηθεί η οιστραδιόλη επί μακρόν (LTED) εμφυτεύθηκαν σε ποντίκια (*nude mice*) και εκτέθηκαν σε ποικίλες δόσεις οιστραδιόλης για 2 μήνες. Είναι ενδιαφέρον ότι οι όγκοι από LTED αναπτύχθηκαν σε μικρότερες δόσεις οιστραδιόλης από ότι αυτοί που προήλθαν από κύτταρα φυσικού τύπου. Κάτω από βασικές συνθήκες (χωρίς διέγερση από οιστρογόνα) μόνο 3% των φυσικού τύπου κυττάρων MCF-7 περιείχε ενεργοποιημένη MAP κινάση, ενώ 20% των κυττάρων από LTED ήταν θετικά. Μια δόσοεξαρτώμενη διέγερση της ενεργοποιημένης MAP κινάσης συνέβαινε στα φυσικού τύπου καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, συγκεντρώσεις οιστραδιόλης από 1,25 ως 20 pg/ml αύξησαν την δραστικότητα της ενεργοποιημένης MAP κινάσης από 3% ως 6,6%. Αντίθετα στα LTED καρκινικά κύτταρα δεν συνέβαινε διέγερση της MAP κινάσης. Τα ευρήματα αυτά από τις *in vitro* και *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι οι όγκοι προσαρμόζονται στην μακρόχρονη στέρηση οιστραδιόλης με αύξηση της δραστικότητας της MAP κινάσης.

Οι Sahl και συν. (1999) μελέτησαν το μονοπάτι των MAP κινασών στον καρκίνο του μαστού με διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις σε 23 ζεύγη δειγμάτων από καρκινικό ιστό και

μάρτυρες. Χρησιμοποιώντας σε Western blot αντίσωμα με διασταυρούμενη αντίδραση έναντι ERK1 και ERK2 παρατήρησαν ότι υπήρχε διπλάσια αύξηση στο ποσό ERK1 και ERK2 στα δείγματα του καρκινικού ιστού. Για προσδιορισμό της δράσης φωσφοτρανσφεράσης χρησιμοποίησαν βασική πρωτεΐνη της μυελίνης καθώς και τον υποδοχέα του EGF. Παρατήρησαν ότι η δραστηριότητα MAP κινάσης ήταν αυξημένη 2- ως 3- φορές σε ιστό από καρκίνο του μαστού που αντιστοιχούσε σε αυξημένη έκφραση ERK1 και ERK2. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημική τεχνική με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του ERK2 παρατήρησαν ότι η ERK2 πρωτεΐνη εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα στο φυσιολογικό επιθήλιο των πόρων όπως επίσης και σε φλεγμονώδη κύτταρα. Οι ερευνητές βρήκαν ότι σε καρκινικό ιστό, με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, τα επίπεδα της ERK2 ήταν μειωμένα. Πάντως αφού οι συμπαγείς βλάβες του μαστού συνίστανται κυρίως σε αδενικό επιθήλιο η ανάλυση με Western blot αναμένεται να δείξει υπερέκφραση της ERK2 όπως και πραγματικά συμβαίνει. Μελετήθηκε επίσης η δραστηριότητα των κινασών των MAP κινασών (MAPKK ή Mek1 και Mek2) προσδιορίζοντας τον βαθμό φωσφορυλίωσης μιας παραλλαγής της ERK κινάσης που είναι αδρανής. Υπήρχε μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα του καρκινικού ιστού και τα δείγματα από τους ιστούς μάρτυρες αλλά η μετρούμενη απόλυτη δραστηριότητα είναι μόλις πάνω από το φυσιολογικό. Οι ίδιοι ερευνητές με μελέτη Western blot παρατήρησαν αυξημένη έκφραση και της Mek1 και της Mek2. Οι von Lintig και συν. (2000) βρήκαν αυξημένη δραστηριότητα MAP κινάσης σε 11 από 20 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Κανένας δεν αντιπροσώπευε μεταλλάξεις του Ras. Σε επτά από τις έντεκα περιπτώσεις η αύξηση της δραστηριότητας της MAPK παρουσίαζε συσχέτιση με την συνέκφραση του παράγοντα EGF και του ERB-B-2/neu. Στις υπόλοιπες τέσσερις μόνο ένας από τους δύο υποδοχείς ήταν παρών. Έδειξαν επίσης σε κυτταροκαλλιέργεια ότι η δραστηριότητα του Ras μπορούσε να ρυθμισθεί από διαφορετικούς συνδέτες. Το συμπέρασμα από την μελέτη του von Lintig και συνεργατών είναι ότι αν υπάρχουν οι κατάλληλοι υποδοχείς τότε αύξηση των συνδετών μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αύξηση των MAP κινασών στον καρκίνο του μαστού του ανθρώπου. Οι μελέτες του Xing και Imagawa έδειξαν ότι ο EGF μπορεί να αυξήσει την ενεργοποιημένη MAP κινάση σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων μαστού του ποντικού. Οι Hori και συν. (2000) βρήκαν ανοσοϊστοχημική έκφραση της ERK1 σε 33 από 103 δείγματα καρκίνου του μαστού που εντοπιζόταν κυρίως στο τμήμα του καρκίνου που διηθούσε τους πέριξ ιστούς και λιγότερο στο τμήμα του που δεν τους διηθούσε (στατιστικά σημαντική διαφορά), ενώ υπήρχε και στο φυσιολογικό επιθήλιο των πόρων και των λοβίων. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που βρήκαν ήταν της αυξημένης έκφρασης της ERK1 με αυτήν της αυξημένης έκφρασης της Ras p21.

MAP κινάσες και κυτταρικός θάνατος

Αναφέρθηκε ο ρόλος των MAP κινασών παρουσία οιστρογόνων και άλλων αυξητικών παραγόντων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όμως η ενεργοποίηση των MAP κινασών όταν απουσιάζουν παράγοντες επιβίωσης (αυξητικοί παράγοντες) συνήθως διεγείρει την απόπτωση. Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο δεν είναι γνωστοί. Μια υπόθεση είναι ότι το ενεργοποιημένο *ras* προκαλεί ενεργοποίηση της PI-3 κινάσης όπως και της MAP κινάσης. Η PI-3 κινάση ενεργοποιεί το Akt που με την σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον παράγοντα επιβίωσης BAD. Οι αντιαποπτωτικοί παράγοντες της οικογένειας των πρωτεϊνών που ομοιάζουν με την Bcl-2 πρωτεΐνη μπορεί να αποτελούν στόχο της διέγερσης από οιστραδιόλη. Οι Fernando και συν. (2006) έχουν δείξει ότι η οιστραδιόλη αναστέλλει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Δεν είναι σαφές αν οι δράσεις αυτές περιλαμβάνουν ενεργοποίηση των MAP κινασών.

Γ. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν κύριο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και ογκογένεση (Turner και συν. 2007). Αυτές οι πρωτεΐνες μοιράζονται μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή ETS που προσδένει DNA και αποτελείται από 85 αμινοξέα (Oikawa 2004). Δομική ανάλυση της ETS περιοχής αρκετών ETS πρωτεϊνών ανέδειξαν μια δομή έλικας- στροφής- έλικας παρόμοια με αυτή της catabolite activator protein της *E. coli*. Οι ETS πρωτεΐνες προσδένονται σε μια αλληλουχία ~ 10 ζευγών βάσεων DNA στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους και γενικά ενεργοποιούν την μεταγραφή. Κάποια σπάνια μέλη αυτής της οικογένειας καταστέλλουν την μεταγραφή.

Τα ETS γονίδια ανευρίσκονται αποκλειστικά σε πολυκυττάριους οργανισμούς και πολλαπλά μέλη της οικογένειας των ETS γονιδίων είναι παρόντα σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί ως σήμερα. Η οικογένεια των ETS γονιδίων του ανθρώπου αποτελείται από ~ 30 μέλη (Dittmer 2003). Ορθόλογα των περισσότερων από αυτά έχουν επίσης ταυτοποιηθεί στον μυ. Αντιστοίχιση με ευθυγράμμιση των ETS περιοχών όλων των γνωστών ETS πρωτεϊνών επιτρέπει την ταυτοποίηση 13 υποοικογενειών. Ανάλυση της αλληλουχίας αυτών των μελών των υποοικογενειών τα οποία έχουν σχεδόν ταυτόσημες ETS περιοχές αναδεικνύει επίσης την παρουσία και επιπρόσθετες περιοχές με ομοιότητα αλληλουχιών εκτός των ETS περιοχών.

Ένα αμετάβλητο χαρακτηριστικό της οικογένειας αυτής είναι η παρουσία μιας κεντρικής 5'- GGAA/T-3' περιοχής (Watson και συν.1985) . Αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν του κεντρικού αυτού στοιχείου προσδιορίζουν την ειδικότητα πρόσδεσης από ειδικές ETS πρωτεΐνες (Dittmer 2003). Σε τουλάχιστον επτά μέλη της ETS οικογένειας, δύο ανασταλτικές περιοχές που περιβάλλουν την ETS περιοχή συνεργάζονται για την ρύθμιση της πρόσδεσης στο DNA. Έχει υποτεθεί ότι η αμινοτελική ανασταλτική περιοχή αλληλεπιδρά με την ETS περιοχή και η καρβοξυτελική ανασταλτική περιοχή επί απουσίας DNA. Το ζεδίπλωμα μιας α έλικας προκαλεί την διαταραχή αυτής της ανασταλτικής δομής και συνοδεύει την πρόσδεση στο DNA. Η δραστηριότητα των μελών της οικογένειας των ETS πρωτεϊνών ελέγχεται από την διαντίδραση τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που αποκαλούνται και σύντροφοι των ETS. Ένας τέτοιος σύντροφος των ETS είναι ο core binding factor $\alpha 2$ ο οποίος δρα αντίθετα προς το αποτέλεσμα της αυτοαναστολής και έτσι διεγείρει την πρόσδεση του ETS-1 στο DNA. Στην ETS-1 η περιοχή που κωδικοποιείται από το εξόνιο VII που είναι παρακείμενη στην περιοχή που

προσδένεται στο DNA περιέχει τέσσερα κατάλοιπα σερίνης που φωσφορυλιώνονται με την ενεργοποίηση ασβεστίου (Pappas και συν. 1986). Αυτή η φωσφορυλίωση τους αναστέλλει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA μέσω ενίσχυσης του μηχανισμού αυτοαναστολής. Τα ανθρώπινο γονίδιο ETS-1 δημιουργεί τρεις πρωτεΐνες μέσω εναλλακτικού ματίσματος και συρραφής των εξωνίων VII ή IV. Η ισομορφή του εξωνίου VII έχει βρεθεί και στο ποντίκι.

Μία άλλη πολύ συντηρημένη περιοχή ονομάζεται *pointed domain* (Oikawa 2004). Αυτή η περιοχή στην *Drosophila* περιέχει ένα κατάλοιπο θρεονίνης που αποτελεί στόχο του συστήματος σηματοδότησης Ras- MAPK κινασών κατά την ανάπτυξη του οφθαλμού της. Η φωσφορυλίωση των ομόλογων καταλοίπων θρεονίνης στις θέσεις 38 και 72 αντίστοιχα των ETS1 και ETS2 ελέγχει την μεταγραφική τους δραστηριότητα. Σε αντίθεση με την εξαιρετικά συντηρημένη ETS περιοχή, οι περιοχές ενεργοποίησης δεν είναι συντηρημένες. Αυτή η διαφορά μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ειδικότητα τους.

Οι περισσότερες ETS πρωτεΐνες ενεργοποιούν την μεταγραφή εκτός από τα Erf, Net και Tel που διαθέτουν ιδιότητες ανασταλτικές της μεταγραφής. Η ανασταλτική δράση του Erf πιθανόν να ρυθμίζεται από μια φωσφορυλίωση θρεονίνης στην θέση 526. Καθότι η υποξία είναι ένα συχνό χαρακτηριστικό στην αγγειογένεση και την διεύδυση του καρκίνου μελετήθηκε η σχέση της με την ETS-1 πρωτεΐνη. Η υποξία επάγει την ETS-1 μέσω της δραστηριότητας του hypoxia inducible factor-1 μέσω πρόσδεσης του στην περιοχή -424 ως -279 του υποκινητή (Oikawa και συν. 2001).

Γ.1. Πρότυπα έκφρασης των μελών της οικογένειας ETS κατά την φυσιολογική και παθολογική ανάπτυξη

Ένα πρώτο βήμα προς την κατανόηση των βιολογικών ρόλων της ETS-1 υπήρξε η ταυτοποίηση κυττάρων στα οποία η ETS-1 μπορεί να δρα. Μία κυρίαρχη έκφραση της ETS-1 ανακαλύφθηκε αρχικά στα όργανα του λεμφικού συστήματος στο νεογνό και ενήλικα μυ, σε διακριτά αναπτυξιακά στάδια των T και B λεμφοκυττάρων, σε πρόδρομους των λεμφοκυττάρων, σε ανώριμα κύτταρα δίκην NK κυττάρων και αιμοποιητικά κύτταρα της μυελικής σειράς (Kola και συν. 1993). In situ αναλύσεις υβριδισμού που διεξήχθησαν κατά την εμβρυική ανάπτυξη ανέδειξαν μια πιο διάσπαρτη έκφραση σε κύτταρα του μεσοδέρματος. ETS-1 μετάγραφα

πρωτοανιχνεύονται κατά το στάδιο του γαστριδίου όταν εξωβλαστικά κύτταρα αρχίζουν να εγκολπώνονται και να διεισδύουν στο μεσόδερμα. Σ' αυτό το στάδιο τα ETS-1 μετάγραφα είναι αφθονότερα στα κοιλιακά κύτταρα του μεσοδέρματος και σε στενή σχέση με το ενδόδερμα. Αυτά τα κύτταρα στην *area opaca* συμπυκνώνονται και σχηματίζουν εξωεμβρυικές νησίδες αίματος. Τα κεντρικά κύτταρα των νησίδων αυτών διαφοροποιούνται στην πρωτογενή ερυθρά σειρά και τα περιφερικά κύτταρα εξελίσσονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (Kola και συν. 1993). Η ανίχνευση ETS μεταγράφων καθόλη την έκταση των ανώριμων νησίδων αίματος υποδηλώνει ότι η ETS-1 εκφράζεται σε αιμαγγειοβλάστες που αποτελούν τους κοινούς πρόδρομους των ενδοθηλιακών και πρόδρομων ερυθροκυττάρων στην αρχική εμβρυική ζωή. Αργότερα όταν ωριμάσουν αυτές οι νησίδες αίματος η έκφραση της ETS-1 περιορίζεται στα περιφερειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ τα κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα δεν περιέχουν μετάγραφα ETS-1 (Wei και συν. 2009).

Κατά την διάρκεια της ανθρώπινης εγκυμοσύνης ETS-1 μετάγραφα ανιχνεύονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα των θηλωδών τροφοβλαστών και στα εξωθηλώδη τροφοβλαστικά κύτταρα διεισδύοντας στα αγγεία της μήτρας. Δεν ανευρίσκονται μετάγραφα στα ενδοθηλιακά κύτταρα της μητέρας (Wei και συν. 2009). Κατά τη εμφύτευση και την δημιουργία του πλακούντα του ποντικού υπάρχει έκφραση ETS-1 στο νεοσχηματισμένο αγγειακό δίκτυο του τοιχώματος του ενδομητρίου. Σε όλη την ανάπτυξη του εμβρύου μετάγραφα ETS-1 ανευρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τον σχηματισμό νέων αγγείων με τον μηχανισμό της αγγειογένεσης. Μια χωροχρονική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης ETS-1 και της δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων έχει αναφερθεί και στον υποθάλαμο και την υπόφυση του ποντικού (Kola και συν. 1993). Η έκφραση της ETS-1 μειώνεται όταν το τοίχωμα του αγγείου αποτελείται από αρκετές κυτταρικές στοιβάδες και μια βασική μεμβράνη και η έκφραση αυτή δεν ανιχνεύεται πλέον σε ενδοθηλιακά κύτταρα μεγάλων αιμοφόρων αγγείων ή τριχοειδή των ενηλίκων. Η συσσώρευση μεταγράφων ETS-1 στο αορτικό ενδοθήλιο του ποντικού μπορεί να επαχθεί μετά από βλάβη που προκαλείται με καθετήρα με μπαλόνι που προκαλεί απογύμνωση του ενδοθηλίου καθώς και όταν η αγγειογένεση επανέρχεται στον κοκκιώδη ιστό και κατά την διάρκεια ανάπτυξη όγκου. Έτσι στα ανθρώπινα αστροκυττώματα η έκφραση ETS-1 σχετίζεται με αγγειογένεση. Κατά την πρώιμη φάση της διεργασίας της επούλωσης του γαστρικού έλκους αναδεικνύεται θετικότητα για παρουσία ETS-1 και

MMP-1. Αντίθετα σε φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και στην φάση που έχει σχηματισθεί ουλή δεν υπάρχουν τα ανωτέρω ευρήματα.

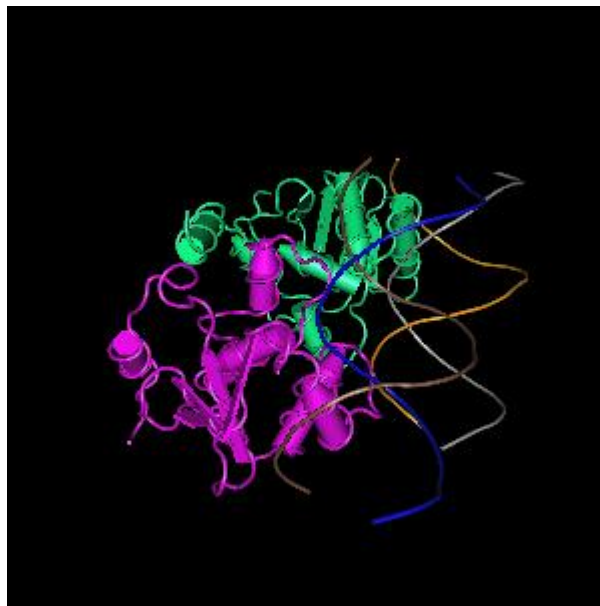
Η έκφραση της ETS-1 κατά την φυσιολογική και παθολογική ανάπτυξη δεν περιορίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. ETS-1 μετάγραφα συσσωρεύονται σε μεσεγχειματικά κύτταρα που αλληλεπιδρούν με στρώματα εγγύς επιθηλιακών κυττάρων κατά την οργανογένεση και στο στρώμα ινοβλαστών που περιβάλλει διηθητικούς όγκους. Η έκφραση του ETS-1 δεν ανιχνεύεται σε εμβρυικό επιθήλιο. Η έκφραση αυτή επάγεται όταν διαχωρίζονται τα στρώματα των επιθηλίων όπως στο κοιλιακό τοίχωμα των σωματιών και στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας ή στις άκρες των αναπτυσσόμενων πόρων του μαστού. Συνολικά η έκφραση της ETS-1 συσχετίζεται με διαδικασίες διήθησης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

Η έκφραση άλλων μελών της ETS-1 οικογένειας δεν έχει μελετηθεί τόσο όσο η ETS-1. Τα πρότυπα έκφρασης των *erg* και *Fli-1* ομοιάζουν με αυτό της ETS-1 κατά την έναρξη της οργανογένεσης (Kruse και συν. 2009). Κατά την ανάπτυξη της όρνιθας στην φάση E1 τα πρότυπα έκφρασης των ETS-1 και *erg* σε εξωεμβρυικές άωρες νησίδες αίματος δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Στην φάση E2 είναι παρόμοια σε μια ποικιλία κυττάρων μεσοδερματικής προέλευσης περιλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων (Dittmer 2003). Παρόμοια πρότυπα έκφρασης έχουν αναφερθεί για το *Fli1* του ποντικού, το *Fli* της μύγας και το *X1-Fli* του *Xenopus laevis* (Remy και Baltzinger 2000). Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι τα *Fli-1* και ETS-1 γονίδια βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, μέσα σε 240 kb και 400kb του γονιδιώματος του ποντικού και του ανθρώπου αντίστοιχα. Γιαυτό το λόγο είναι πιθανό, να ρυθμίζεται η έκφραση αυτών των γονιδίων από κοινούς μηχανισμούς. Η αρχική έκφραση του *Fli-1* του zebrafish επικαλύπτεται με αυτό του *gata2* σε έναν εν δυνάμει πληθυσμό αιμαγγειοβλαστών. Η έκφραση αυτών των γονιδίων δεν έχει περιγραφεί σε όγκους. Μετάγραφα των *Erm*, *Er81* και *Pea3* τριών υψηλώς συντηρημένων μεταγραφικών παραγόντων δεν έχουν ανιχνευθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την ανάπτυξη.

Γ.2. Δομή της ETS-1

Τα ομόλογα γονίδια των θηλαστικών της ETS περιοχής του γονιδίου με ικανότητα μετασχηματισμού του ιού ερυθροβλάστωσης των πτηνών E26 αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά χρωμοσώματα.

Χρησιμοποιώντας υβρίδια σωματικών κυττάρων το ομόλογο των θηλασικών της 5' v-ETS- περιοχής (ETS-1) χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 11 στον άνθρωπο και συγκεκριμένα στον τόπο 11q23, στο χρωμόσωμα 9 στο ποντίκι και στο χρωμόσωμα D1 στην γάτα. Το ομόλογο της 3' v-ETS περιοχής (ETS-2) χαρτογραφήθηκε αντίστοιχα στο χρωμόσωμα 21 του ανθρώπου, στο χρωμόσωμα 16 του ποντικού και στο χρωμόσωμα C2 της γάτας. Ο γενετικός τόπος της ETS-1 στον άνθρωπο κωδικοποιεί ένα μόνο mRNA μεγέθους 6,8 kb ενώ ο δεύτερος γενετικός τόπος ETS-2 χρωμόσωμα 21 κωδικοποιεί τρία διαφορετικά mRNA μεγέθους 4,7 kb, 3,2 kb, 2,7 kb. (Watson και συν. 1985, Pappas και συν. 1986). Το ανθρώπινο γονίδιο ETS-1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 441 αμινοξέα (**Εικόνα 7**). Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει περισσότερο από 95% ομολογία με το προϊόν του c-ETS-1 γονιδίου και έχει μοριακό βάρος 50,407 da (Watson και συν. 1992).



Εικόνα 7. Η κρυσταλλογραφική δομή της ETS-1 πρωτεΐνης στον άνθρωπο (Madej και συν. 2012, National Center Biotechnology Information Structure).

Γ.3. Αλληλεπίδραση των ETS με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες

Η δραστηριότητα των μελών της οικογένειας των ETS ελέγχεται όπως προαναφέρθηκε από την αλληλεπίδραση τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που αναφέρονται και ως σύντροφοι τους στην βιβλιογραφία (Dittmer 2003). Μια συνέργεια καταδείχθηκε αρχικά στην ενεργοποίηση του ενισχυτή του ιού polyoma

μεταξύ των ETS και AP1. Έχουν ανευρεθεί σε εγγύτητα ευρισκόμενες και λειτουργικές θέσεις ETS και AP1 στους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν την κολλαγενάση 1, την στρωμελυσίνη 1, τον τύπου ουροκινάσης ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (u-PA), την μεταλλοπρωτεϊνάση 9 (gelatinase B) και τον ιστικό αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης (TIMP1). Μελέτες με τους υποκινητές των γονιδίων της κολλαγενάσης 1 και της στρωμελυσίνης 1 έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας των ETS μπορεί να έχουν διαφορετικές δράσεις. Έτσι η ETS-2 πρωτεΐνη ενεργοποιεί και τους δύο υποκινητές ενώ η ERG πρωτεΐνη ενεργοποιεί μόνο τον υποκινητή της κολλαγενάσης 1 ενώ η Fli1 δεν έχει δράση σε κανέναν από τους δύο υποκινητές. Επιπλέον η Erg αναστέλλει πλήρως την ενεργοποίηση του υποκινητή της στρωμελυσίνης 1 που προκαλείται από την ETS-2 πρωτεΐνη μέσω διαντίδρασης με την περιοχή ενεργοποίησης. Σε μελέτες με gel-shifts και *in vitro* μελέτες αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών οι ETS-2 και Erg προσδένονται στο σύμπλεγμα cFos/cJun. Σε μελέτες *in vivo* και *in vitro* η ETS-2 αλληλεπιδρά και με την ETS-1 και την Erg (Dittmer 2003).

Μια πρωτεΐνη που μοιάζει με την AP1 λέγεται MafB και εκφράζεται στα μυελομονοκύτταρα περιέχει ένα φερμουάρ λευκίνης που μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με την περιοχή της ETS-1 που προσδένει DNA της ETS-1 (Hedge και συν. 1998). Η MafB καταστέλλει την ETS1 εξαρτώμενη ενεργοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα της τρανσφερρίνης. Αυτή η ανασταλτική δράση αντιπροσωπεύει μια στρατηγική ρύθμισης της δραστηριότητας της ETS μέσα στο πρωτεϊνικό δίκτυο ETS/AP1. Η EAP1/ Daxx πρωτεΐνη γνωστή ως προηγουμένως ως Pax3 προσδένουσα πρωτεΐνη απίσης αλληλεπιδρά με μια αμινοτελική περιοχή του ETS-1 που περιλαμβάνει την περιοχή pointed. EAP1/ Daxx αναστέλλει την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της κολλαγενάσης 1 που εξεργάται από την ETS-1 (Li και συν. 2000).

Η ETS-1 πρωτεΐνη έχει επίσης την ικανότητα να στρατολογεί τους μεταγραφικούς στρατολογητές CREB Binding protein (CBP) και την σχετιζόμενη πρωτεΐνη p300 και αυτή η αλληλεπίδραση απαιτείται για την δραστηριότητα ETS-1 (Yang και συν. 1998). Η CBP/p300 συνεργάζεται με τις ETS-1 και ETS-2 στην μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή της ανθρώπινης στρωμελυσίνης 1.

Η πρωτεΐνη Tel είναι ασυνήθης μεταξύ της οικογένειας ETS λόγω της ιδιότητας της να αυτοσυνδέεται *in vivo*. Εξάλειψη της περιοχής διμερισμού της βλάπτει την δραστηριότητα καταστολής που προκαλεί στην μεταγραφή την

οδηγούμενη από ETS Binding sites (EBS) (Lopez και συν. 1999). Επίσης το Tel είναι ικανό να συνδέεται με το Fli1 και να αναστέλλει την ενεργοποίηση των υποκινητών των μεγακαρυοκυττάρων την προκαλούμενη από το Fli1.

Μια άλλη αλληλεπίδραση συμβαίνει με το Sp100 πρωτεϊνικό πυρηνικό σωματίο της προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας. Ειδικότερα το Sp100 αντιδρά με δύο περιοχές του ETS-1 (περιοχές A+B και D+E+F) και δρα έτσι ως συνενεργοποιητής που αυξάνει την δραστικότητα του ETS-1 (Wasylyk και συν. 2002).

Σημαντικές παρατηρήσεις έχουν επίσης γίνει όσον αφορά την συνεργασία των Myb και ETS μεταγραφικών παραγόντων. Ο μετασχηματισμός των μυελοειδών κυττάρων από το ογκογονίδιο *v-myb* θεωρείται ότι προκαλείται από απορρυθμισμένη έκφραση ειδικών κυτταρικών γονιδίων που αποτελούν στόχους του *v-myb* στα μυελοειδή κύτταρα. Ειδικότερα το γονίδιο *tom-1* στο κοτόπουλο έχει δύο υποκινητές από τους οποίους μόνο ο *tom-1A* ενεργοποιείται από το *v-myb*. Το *v-myb* ενεργοποιεί τον υποκινητή *tom-1A* συνεργαζόμενο με τον μεταγραφικό παράγοντα ETS-2. Αντίθετα το μη ογκογόνο κυτταρικό ανάλογο του *v-myb* δηλαδή το *c-myb* συνεργάζεται με την ETS-1 και την ETS-2. Αποκοπή του αμινοτελικού άκρου του *c-myb* που είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί το ογκογόνο δυναμικό του *c-myb* αναστέλλει ειδικά την συνεργασία του με την πρωτεΐνη ETS-1. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ογκογόνος δράση του *c-myb* σχετίζεται με την απώλεια συνεργασίας μεταξύ Myb και *c-ETS-1* (Burk και Klempnauer 1999).

Γ.4. Έλεγχος της έκφρασης και της δραστικότητας των μελών της ETS οικογένειας

Η έκφραση των ETS-1 μεταγράφων συνδυάζεται *in vivo* με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την επαγωγή της αγγειογένεσης. *In vitro* η ETS-1 εκφράζεται από τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά όχι αφού αυτά τα κύτταρα συρρέουν. Επιπρόσθετα η ETS-1 υπερφωσφορυλιώνεται κατά την πρώιμη μίτωση των T κυτταρικών σειρών υποδηλώνοντας μια ρύθμιση της δραστηριότητας κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Dittmer 2003). Η έκφραση του ETS-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνεται σαν απάντηση σε αγγειογενετικούς παράγοντες όπως οι ακόλουθοι: tumour necrosis factor α , fibroblast growth factor 2, transforming growth factor β , vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor (Dittmer 2003). Η έκφραση του

ETS-1 επάγεται επίσης από την ενδοθηλίνη 1 και τον PDGF-BB στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Η έκφραση του Tel ανιχνεύεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τον πρώιμο σχηματισμό του σωλήνα και υπάρχουν ενδείξεις ότι ο VEGF μειώνει αυτή την έκφραση. Ανάλυση με Northern blot αποκάλυψε την υψηλή έκφραση των *erg* και *ERM* συγκριτικά με αυτή των ETS-1 και ER81 στα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής του βοός και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ποντικού, υποδηλώνοντας μια διαφορετική έκφραση των μελών της ETS οικογένειας.

Επιπρόσθετα προς την έκφραση τους και η δραστηριότητα των μελών της ETS οικογένειας μπορεί να ρυθμισθεί μετά από διέγερση του ενδοθηλίου από αγγειογενετικούς παράγοντες (Dittmer 2003). Έχει δειχθεί ότι οι ETS-1, ETS-2, Elk1 και PEA3 φωσφορυλιώνονται από κινάσες που έχουν επαχθεί από αυξητικούς παράγοντες. Η εξεργτώμενη από Ras φωσφορυλίωση ενός καταλοΐπου θρεονίνης στη περιοχή pointed των ETS-1 και ETS-2 επιτρέπει την ενεργοποίηση ενός στοιχείου εξαρτώμενου από το Ras και την από ασβέστιο εξαρτώμενη φωσφορυλίωση τεσσάρων καταλοΐπων σερίνης της ETS-1 που αναστέλλει την πρόσδεση του στο DNA.

Η PEA3 πρωτεΐνη ενεργοποιείται από τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης Her2/ Neu μέσω και του ERK μονοπατιού και του JNK/SAPK μονοπατιού που εξαρτώνται από το Ras (Chotteau-Lelievre και συν. 2001). Τέτοιες ρυθμίσεις έχουν επίσης περιγραφεί για τα μέλη Elk1, Sap1a και Net2/ Sap2 που εμπλέκονται στους *ternary complex factors* που αλληλεπιδρούν με τον serum response factor. Και οι λειτουργίες πρόσδεσης στο DNA και της ενεργοποίησης των *ternary complex factors* ρυθμίζονται από τις MAP κινάσες και μερικές από τις κινάσες JNK/ SAPK που ενεργοποιούνται από το stress (Buchwalter και συν. 2004). Οι μελέτες με τους *ternary complex factors* έδειξαν ότι ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα διαφορετικές κινάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν τον ίδιο ETS μεταγραφικό παράγοντα μέσω πρόσδεσης σε περιοχές που είναι διαφορετικές από τις περιοχές φωσφορυλίωσης (Buchwalter και συν. 2004). Έως σήμερα δεν υπάρχει παρατήρηση τέτοιων συμπλεγμάτων σε ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά είναι πιθανό ότι συμβαίνουν παρόμοιες ρυθμίσεις μετά αγγειογόνο διέγερση.

Γ.5. Από τις μελέτες υποκινητών στην ανακάλυψη γονιδίων στόχων

Ο ρόλος των μελών της ETS οικογένειας την διάρκεια της αγγειογένεσης έχει μερικώς προσδιορισθεί με μελέτες αποκοπής *cis* δρώντων στοιχείων που περιλαμβάνονται στην ρύθμιση γονιδίων ειδικών για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ένας εναλλακτικός τρόπος προσέγγισης είναι η υπερέκφραση ή η μείωση έκφρασης των παραγόντων αυτών σε ενδοθηλιακά κύτταρα και η ανάλυση μεταβλητών στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών. Αυτές οι μέθοδοι έχουν επιτρέψει την ανακάλυψη αρκετών γονιδίων στόχων των ETS στα ενδοθηλιακά κύτταρα. που παρατίθενται στον **πίνακα 7** (Dittmer 2003). Αναλύονται τα πιο αξιοσημείωτα και καλά τεκμηριωμένα παραδείγματα αυτής της δράσης χωρίς να λησμονείται ότι η δράση στα αναφερόμενα στον πίνακα γονίδια δημιουργεί πληθώρα διαφορετικών μοντέλων επίδρασης στην αγγειογένεση.

Γονίδια στόχοι: Τα Tie1 και Tie2 γονίδια

Τα Tie1 και Tie2 γονίδια κωδικοποιούν υποδοχείς κινασών τυροσίνης που εκφράζονται στο ενδοθήλιο των αγγείων κατά την εμβρυική ανάπτυξη και την αγγειογένεση στους ενήλικες (Schlaeger και συν. 1997). Η αδρανοποίηση οποιουδήποτε από αυτά τα γονίδια οδηγεί σε σοβαρά αγγειακά αναπτυξιακά προβλήματα. Μία προσέγγιση με χρήση διαγονιδιακών ζώων με χρήση Tie1 υποκινητή ποντικού (0,75 kb) και Tie1 υποκινητή ανθρώπου (5,0 kb) έδειξε ότι και τα δύο κλάσματα ωθούν την γονιδιακή έκφραση του γονιδίου αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης στο ενδοθήλιο (Korhonen και συν. 1995). Η σύγκριση του Tie1 υποκινητή του ποντικού με του ανθρώπου ανέδειξε την παρουσία αρκετών περιοχών συντηρημένων DNA συμπεριλαμβανομένων δύο EBS. Αυτά τα EBS είναι απαραίτητα για την δραστηριότητα του Tie1 υποκινητή. Άλλα πειράματα διαμόλυνσης έδειξαν ότι ο Nerf2 (ένας σχετιζόμενος με την ETS πρωτεΐνη που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*) καθώς και οι ETS-1 και ETS-2 είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον Tie1 υποκινητή (Ijijn και συν. 1999).

Παρόμοια πειραματική προσέγγιση έχει πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας κλάσματα του υποκινητή του Tie2 υποκινητή του ποντικού. Ένα κλάσμα 1,2 kb

Πίνακας 7. Γονίδια στόχοι των ETS μεταγραφικών παραγόντων (Dittmer 2003).	
Γονίδια στόχοι	ETS μεταγραφικοί παράγοντες
<u>Μεταγραφικός παράγοντας</u>	
Early growth response (Egr1)	Ets1
p53	Ets2
<u>Έλεγχος αύξησης</u>	
PDGF- B	Ets1
Flt- 1 (VEGF- R1)	Ets1, Ets2, Erg
Tie- 2	Nerf2, Ets1
Met	Ets1
<u>Αναδόμηση εξωκυττάριας μητρικής ουσίας</u>	
Tenascin- C	Fli1
Κολλαγενάση 1	Ets1, Ets2, Erg
Στρωμελυσίνη 1	Ets1, Ets2
MMP9	Ets1
u-PA	Ets1, Ets2
TIMP- 1	Ets1
Καθεψίνη Β	Ets1
<u>Προσκόλληση</u>	
VE- καντχερίνη	Ets1, Erg
ICAM- 1	ERM, Ets2
Παράγοντας von Willebrand	Ets1, Ets2, Erg
<u>Διάφορα</u>	
PARP	Ets1
Κυκλίνη D1	Ets2
GADD153	Ets1, Fli1
Συνθάση οξειδίου αζώτου (eNOS)	Ets1, Elf1
Οξυγενάση αίμης HO-1	Ets1, Fli1, Erg
Μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης 1β	Ets1

προσφέρει ειδική για την σειρά των ενδοθηλιακών κυττάρων έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης του διαγονιδίου (Schlaeger και συν. 1997). Πάντως η δράση του διαγονιδίου περιορίζεται σε πρώιμα στάδια της εμβρυικής ζωής και δεν ανιχνεύεται σε ιστούς ενηλίκων. Ένας συνδυασμός μιας upstream (αριστερά) του Tie2 αλληλουχίας μεγέθους 2,1 kb και ενός κλάσματος μεγέθους 10 kb από το 5' ήμισυ του πρώτου ιντρονίου προσφέρει υψηλή και ομοιόμορφη έκφραση του LacZ σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα του διαγονιδιακού ποντικού (Schlaeger και συν. 1997). Ένα κλάσμα 303 kb από αυτό το ιντρόνιο είναι αρκετό να ενεργοποιήσει με ειδικό τρόπο

τον υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης των ενδοθηλικών κυττάρων του διαγονιδιακού ποντικού. Ανάλυση της αλληλουχίας του κλάσματος αυτού έδειξε την παρουσία αρκετών πιθανών θέσεων πρόσδεσης για γενικούς και ιστοειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των ETS-1 και PEA3. Μετάλλαξη του EBS όπως και η εξάλειψη της περιοχής που περιέχει πιθανές θέσεις για την πρόσδεση του PEA3 οδηγεί σε πλήρη αδρανοποίηση της δράσης του ενισχυτή *in vivo*. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι αν και η ETS-1 ενεργοποιεί τον υποκινητή του Tie2, η δράση της είναι ασθενέστερη από αυτή του Nerf2 (Dube και συν. 1999). Παρόμοια στην ίδια εργασία η ETS-1 είναι πιο ισχυρός ενεργοποιητής από ότι ο Nerf2 στον υποκινητή του Flt-1 (VEGF- R1). Πειράματα με διαδοχικές εξαλείψεις στην περιοχή του υποκινητή του Tie2 υποδηλώνουν ότι η εγγύς περιοχή του υποκινητή είναι υπεύθυνη για την μείζονα δράση ενεργοποίησης του Nerf2 (Dube και συν. 1999). Μεταλλάξεις στο EBS4 και EBS5 που βρίσκονται μέσα σε ένα άθροισμα πέντε EBS εξαλείφει πλήρως την δράση του Nerf2. Σε πειράματα αλλαγής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας ο Nerf2 είναι ικανός να προσδένεται σε αυτά τα δύο EBS. Από τα ανωτέρω συνάγεται ότι σχετικά με την ρύθμιση του υποκινητή του Tie2 οι ETS παράγοντες φαίνεται ότι δεν ενέχονται στην βασική δραστηριότητα του υποκινητή αλλά και στην ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα έκφραση.

Γονίδια στόχοι: Το γονίδιο της VE-καντχερίνης

Η VE-καντχερίνη είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και μεσολαβεί στην εξαρτώμενη από ασβέστιο προσκόλληση κυττάρου σε κύτταρο (Lelièvre και συν. 2000). Αδρανοποίηση του γονιδίου της VE-καντχερίνης οδηγεί σε πρόωμη θνητότητα των εμβρύων με απουσία διαφοροποίησης των νησίδων αίματος του λεκιθικού ασκού σε πρωτογενές αγγειακό πλέγμα. Περίπου 2,5 kb της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της VE- καντχερίνης στον ποντικό είναι αρκετό για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της ακετυλτρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης στο ενδοθήλιο διαγονιδιακών εμβρύων και ενηλίκων ποντικών. Ανάλυση της εγγύς περιοχής του υποκινητή έδειξε την παρουσία δύο απαραίτητων EBS, η μετάλλαξη των οποίων δραματικά αλλάζει την δραστηριότητα του υποκινητή (Lelièvre και συν. 2000). Ευρήματα σε πειράματα αλλαγής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας υποδηλώνουν έναν ρόλο για το Erg στον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της VE- καντχερίνης. Από την άλλη υπερέκφραση της ETS1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα ινοβλαστών οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της VE-

καντχερίνης. Μελέτες ενεργοποίησης με χρήση 2,5 kb του υποκινητή της VE-καντχερίνης και τις μεταλλαγμένες παραλλαγές των EBS έδειξε ότι η ETS1 αυξάνει την δραστηριότητα του υποκινητή στην εγγύς περιοχή του υποκινητή (Lelièvre και συν. 2000). Σε αντίθεση με την ETS1 η VE- καντχερίνη εκφράζεται και στο ενδοθήλιο σε κατάσταση ηρεμίας, υποδηλώνοντας ότι και άλλα μέλη της ETS οικογένειας απαιτούνται για τον έλεγχο της έκφρασης της VE- καντχερίνης μετά τον σχηματισμό των νέων αγγείων.

Γονίδια στόχοι: Τα γονίδια Flt1 και Flk1

Οι δύο υποδοχείς VEGF Flt1 και Flk1 (αντίστοιχα VEGFR1 και VEGFR2) εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Η γονιδιακή αδρανοποίηση των Flt1 και Flk1 οδηγεί σε ανώμαλη αγγειακή ανάπτυξη. Συστηματική αποκοπή από τον ανθρώπινο υποκινητή του Flt-1 που ωθεί την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς (γονιδίου λουσιφεράσης) οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός κλάσματος περίπου 1 kb που υποστηρίζει την υψηλή έκφραση του Flt-1 σε παροδικά πειράματα διαμόλυνσης και συμπεριφέρεται με έναν τρόπο ειδικό για τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από διαμόλυνση από αδενοϊό (Morishita και συν. 1995). Εξάλειψη της εγγύς περιοχής του υποκινητή που περιέχει συντηρημένες αλληλουχίες CREB/ ATF και ETS περιοχές πρόσδεσης οδήγησε σε μείζονα μείωση της δράσης του υποκινητή. Ειδικότερα η περιοχή του υποκινητή που είναι κριτικής σημασίας για την έκφραση του Flt1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι η περιοχή από -229 ως +8 (Morishita και συν. 1995). Επίσης δεξιότερα αυτής της περιοχής βρίσκονται οι CREB/ ATF θέσεις και το EBS που είναι απαραίτητα για την δράση υποκινητή του Flt1 και το ETS-1, ETS-2 και Erg μπορούν να ενεργοποιούν αυτή την δραστηριότητα. Μια σημαντική συσχέτιση έχει αναφερθεί μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης της ETS1 και του Flt1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την φυσιολογική ανάπτυξη και κατά την ανάπτυξη του όγκου όπως στην περιοχή των μικρών αγγείων των ανθρώπινων γλοιωμάτων, υποδηλώνοντας ότι η ETS1 μπορεί να ρυθμίζει την μεταγραφή του Flt1 in vivo (Morishita και συν. 1995).

Παρά την δραστηριότητα τους σε καλλιιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλληλουχίες του flk1 που εκτείνονται ως και 5,5 kb αριστερότερα του δεν δύνανται να προσφέρουν διαγονιδιακή ενεργοποίηση. Σε συνδυασμό με ένα κλάσμα 2,3 kb από το πρώτο ιντρόνιο του flk1 γονιδίου, ένα κλάσμα 939 ζευγών βάσεων μπορεί ειδικά να ωθήσει την έκφραση LacZ στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Heidenreich και συν. 2000).

Το διαγονιδιακό αυτό πρότυπο έκφρασης αναπαράγει στενά αυτό του ενδογενούς *flk1* κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Μία περιοχή 430 ζευγών βάσεων που περιέχεται σε αυτό το πρώτο ιντρόνιο είναι επίσης αρκετή για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αρκετές πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες ETS, GATA και Scl/ Tal1 εμπεριέχονται στον ενισχυτή αυτό. Μία μετάλλαξη μιας θέσης GATA συντελεί στην έκτοπη γονιδιακή έκφραση, ενώ μετάλλαξη οποιωνδήποτε δύο Scl/ Tal1 θέσεων οδηγεί σε μειωμένη έκφραση LacZ σε διαγονιδιακά ποντίκια (Heidenreich και συν. 2000). Επιπρόσθετα η ETS-1 ενεργοποιεί την περιοχή αυτή των 939 ζευγών βάσεων υποκινητή μέσω δύο Ets Binding Sites (EBS) (Heidenreich και συν. 2000). Μία από αυτές απαιτείται για την υψηλή γονιδιακή έκφραση στο ενδοθήλιο. Άρα οι οικογένειες των μεταγραφικών παραγόντων ETS και GATA ενέχονται στην έκφραση του *Flt-1* στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ο ρόλος των ETS μελών στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα μέλη των ETS μπορούν να ενεργοποιήσουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες που αποδομούν το στρώμα, μόρια προσκόλλησης κυττάρων σε κύτταρα ή κυττάρων στο στρώμα όπως ιντεγκρίνες, καντχερίνες. Αρκετές μελέτες των επιδράσεων μεταλλαγμένων ETS έχουν δείξει ότι οι παράγοντες ETS μπορεί να συμμετέχουν στην ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, διασποράς και μετανάστευσης (Dittmer 2003). Έκφραση των περιοχών πρόσδεσης DNA των PU1, ETS-1, ETS-2 αναστρέφει τον μετασχηματισμό 3T3 κυττάρων που γίνονται μεγαλύτερα και πιο επίπεδα με αυξημένη πρόσφυση στο υπόστρωμα τους. ETS-1 antisense ολιγονουκλεοτίδια αναστέλλουν την από EGF και FGF-1 μετανάστευση και την από τον VEGF επαγόμενη διείσδυση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (Iwasaka και συν. 1996). Η περιοχή του ETS1 που προσδένει DNA έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να μειώσει την έκφραση της δραστηριότητας ETS σε ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου (Lelièvre και συν. 2000). Η έκφραση αυτού του κυρίαρχου αρνητικά διαγονιδίου συντέλεσε σε μια αυξημένη διασπορά και προσκόλληση σε διάφορα υποστρώματα της εξωκυττάριας θεμελίου ουσίας που συνοδεύονταν από αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Η ικανότητα ενδοθηλιακών κυττάρων να δημιουργήσουν δομές διακλάδωσης σε γέλη αυξήθηκε επίσης (Lelièvre και συν. 2000). Από την άλλη πλευρά, υπερέκφραση του ETS-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών του εγκεφάλου μείωσε την πυκνότητα τους και αύξησε την

έκφραση της VE-καντχερίνης της κυταρικής επιφάνειας, που εμπλέκεται στον σχηματισμό του ενδοθηλίου και την διατήρηση της ακεραιότητάς του. Στον ενήλικα το ενδοθήλιο είναι ένας ιστός που βρίσκεται σε ηρεμία που απαιτεί στενό έλεγχο της αύξησης όταν διεγείρεται για τον σχηματισμό νέων αγγείων. Αφότου η υπερέκφραση της ETS-1 οδηγεί σε μικρότερη αύξηση κυττάρων και πυκνότητα στην συρροή, η έκφραση της ETS-1 μπορεί να επαχθεί ώστε να μετριάσει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων παρά να τον επάγει, και να προσανατολίσει τα κύτταρα ώστε να διαφοροποιηθούν και να σχηματίσουν αυλούς μέσω επαγωγής VE- καντχερίνης (Lelièvre και συν. 2000).

Μελέτες in vivo αναφορικά με την ETS-1

Τα πρώτα αποτελέσματα που υποστήριξαν μια απαραίτητη λειτουργία για την ETS-1 στον σχηματισμό αγγείων προήλθε από μελέτες στην χοριοαλλαντοειδική μεμβράνη της όρνιθας. Είχε δειχθεί ότι ένα εικοσαμερές φωσφοροθειικό ολιγοπεπτίδιο συμπληρωματικό προς το κωδικόνιο έναρξης AUG ανέστειλλε την έκφραση της ETS-1 σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (Wernert και συν. 1999). Στην δοκιμασία της χοριοαλλαντοειδικής μεμβράνης, η διαμόλυνση με το ETS-1 antisense ολιγονουκλεοτίδιο κατά την πέμπτη ημέρα της ανάπτυξης ειδικά προκαλούσε μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της αγγειογένεσης μέσω μείωσης της διαμέτρου και του αριθμού των αγγείων (Wernert και συν. 1999)..

Σε αντίθεση καμιά επίδραση δεν έχει αναφερθεί μετά την αδρανοποίηση της ETS γονιδίου. Τα ETS-1 $-/-$ διαγονιδιακά ποντίκια ζουν και είναι γόνιμα αλλά εμφανίζουν μια αυξημένη περιγεννητική θνητότητα αφού περίπου τα μισά πεθαίνουν πριν τον απογαλακτισμό, τέσσερις εβδομάδες μετά την γέννηση. Η μείζονα ανωμαλία που περιγράφεται σ' αυτά τα ποντίκια είναι ο μειωμένος αριθμός των NK κυττάρων καθώς και η ελαττωματική κυτταρολυτική δραστηριότητα εναντίον καρκινικών κυττάρων και στόχων ελλειμματικών στο MHC-1 (Barton συν. 1998). Η ελαττωματική αυτή λειτουργία δεα αντανακλούσε ελαττωματική έκφραση υποδοχέων κυτταροκινών σημαντικών στην λειτουργία των NK κυττάρων (IL-2R, IL-15R, ή IL-18R) και η βλάβη αυτή δεν μπορούσε να διασωθεί από εξωγενείς κυτταροκίνες. Άρα η ETS-1 φαίνεται να παίζει έναν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των NK-κυττάρων (Barton συν. 1998). Ο λόγος για αυτούς τους πρόωπους θανάτους παραμένει άγνωστος αλλά η παρουσία ζώντων ETS-1 $-/-$ ποντικών δηλώνει ότι η ETS-1 είναι αναλώσιμο ως προς την διατήρηση λειτουργικής και αιμοποιητικής ανάπτυξης στο έμβρυο. Το Erg1 και

Fli1 των οποίων τα πρότυπα έκφρασης επικαλύπτονται με αυτά της ETS-1 στο ενδοθήλιο, μπορεί να παρέχουν ETS-1 δραστικότητα στα ETS-1 ^{-/-} ποντίκια (Barton συν. 1998).

Εδώ αξίζει να αναφερθούν και κάποια άλλα χαρακτηριστικά των ETS-1 ^{-/-} και RAG-2 ^{-/-} χιμαιρικών ποντικών (Eyquem και συν. 2004): 1. αυτά εμφανίζουν μια συνολική μείωση του αριθμού των θυμοκυττάρων, παρότι όλοι οι υπότυποι των κυττάρων αυτών ήταν παρόντες. 2. εμφανίζουν ένα αυξημένο ποσοστό διπλών αρνητικών κυττάρων (CD4⁻ CD8⁻) και ένα μειωμένο ποσοστό (CD4⁺ CD8⁺) κυττάρων του θύμου 3. εμφανίζουν μείωση του αριθμού των T κυττάρων λεμφαδένων και των σπληνικών T κυττάρων. Επιπλέον τα T λεμφοκύτταρα αυτά αποπίπτουν όταν καλλιεργούνται απουσία σημάτων ενεργοποίησης 4. αύξηση του αριθμού των IgM⁺/B220^{dull} B λεμφοκυττάρων που συνοδεύεται από αύξηση των πλασματοκυττάρων του σπλήνα και από πενταπλάσια ως και δεκαπλάσια αύξησης της IgM του ορού. 5. τα σπληνικά αδυνατούν να ανταποκριθούν σε ενεργοποίηση τους με καονκαβαλίνη A ή α-CD3 μονοκλωνικό αντίσωμα. Η μελέτη αυτή δείχνει ότι ενώ δεν είναι απαραίτητη η ETS-1 πρωτεΐνη για την ανάπτυξη ώριμων T και B λεμφοκυττάρων, η ανεπάρκεια της συντελεί σε μειωμένη ενεργοποίηση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα του T λεμφοκυτάρου, μείωση των ώριμων T λεμφοκυττάρων, αύξησης των B λεμφοκυττάρων του σπλήνα και των λεμφαδένων και αύξηση της IgM του ορού (Eyquem και συν. 2004) .

Οι Pourtier-Manzanedo και συν. (2003) χρησιμοποίησαν ένα μη τραυματικό μοντέλο που επιτρέπει την μακροσκοπική παρατήρηση της αγγειογένεσης στον ποντικό σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό. Η χρήση του φαρμακολογικού παράγοντα TNP-470 στο μοντέλο αυτό κατέστειλλε την αγγειογένεση που προκαλείται από τον παράγοντα FGF-2. Επίσης παρατήρησαν ότι χρήση της ETS-1 DB ανταγωνιστικής κυρίαρχα αρνητικής πρωτεΐνης μέσω διαμόλυνσης με ρετροϊό οδήγησε σε μείωση της αγγειογένεσης της προκαλούμενης από FGF-2 ενώ μειώθηκε και η αγγειογένεση στον καρκίνο.

Στην φυσιολογική αγγειογένεση αλλά και στην αγγειογένεση του καρκίνου φαίνεται ότι παίζει ρόλο επίσης η νευροπιλίνη 1 (NRP1) και η νευροπιλίνη 2 (NRP2). Οι νευροπιλίνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που δρουν ως μεσολαβητές στην νευρωνική μεταβίβαση προσδένοντας μέλη της τάξης 3 της οικογένειας των σηματοφορινών (semaphorins) αλλά και στην αγγειογένεση προσδένοντας μέλη της οικογένειας του VEGF (Wild και συν. 2012). Οι νευροπιλίνες εκφράζονται στα

ενδοθηλιακά κύτταρα και προσδένουν τον VEGF165. Η νευροπιλίνη 1 είναι ένας συνενεργοποιητής για τον υποδοχέα-2 του VEGF (VEGFR2) που αυξάνει την πρόσδεση του VEGF165 στον VEGFR2 και την προκαλούμενη από τον VEGF165 χημειοταξία (Klagsbrun και συν. 2002). Η έκφραση της νευροπιλίνης 1 ρυθμίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα από τον παράγοντα νέκρωσης του όγκου α , τους μεταγραφικούς παράγοντες dHAND και ETS-1 και την αγγειακή βλάβη. Κατά την αγγειογένεση στα πτηνά η NRP1 εκφράζεται μόνο στις αρτηρίες ενώ η NRP2 εκφράζεται μόνο στις φλέβες (Klagsbrun και συν. 2002) . Διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών δείχνουν ότι η NRP1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση στην εμβρυική ηλικία. Υπερέκφραση της NRP1 οδηγεί σε δημιουργία πλεονάσματος τριχοειδών.

Από την άλλη πλευρά διαγονιδιακά NRP1 knockout ποντίκια έχουν βλάβες στον λεκιθικό ασκό, στην αγγείωση του εμβρύου και του νευρικού ιστού και στην δημιουργία των μεγάλων αγγείων της καρδιάς. Καρκινικά κύτταρα επίσης εκφράζουν νευροπιλίνες και προσδένουν τον VEGF165. Η αύξηση της έκφρασης των νευροπιλινών σχετίζεται θετικά με την ανάπτυξη όγκων (Klagsbrun και συν. 2002). Συγκεκριμένα υπερέκφραση των νευροπιλινών σε καρκινικά κύτταρα ποντικού συντέλεσε σε μεγέθυνση των όγκων και σημαντικά αυξημένη αγγειογένεση των όγκων αυτών. Αντίθετα η διαλυτή NRP1 (soluble NRP1) είναι ανταγωνιστής της καρκινικής αγγειογένεσης (Klagsbrun και συν. 2002). Η σηματοδότηση 3A προσδένεται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα. In vitro αναστέλλει επίσης την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ανάπτυξη των τριχοειδών. Η σηματοδότηση 3A και ο VEGF165 είναι συναγωνιστικοί ανταγωνιστές για τις μεσολαβούμενες από την NRP1 δράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους νευρώνες (Klagsbrun και συν. 2002).

ETS-2

Η ETS-2 πρωτεΐνη δεν εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά η έκφραση της ανιχνεύεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα, που από πολλές πλευρές σχετίζονται στενά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Tymms και Kola 1994). Κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα αντικαθιστούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών του ενδομητρίου της μητέρας κατά την δημιουργία του πλακούντα και εκφράζουν ειδικούς ενδοθηλιακούς δείκτες όπως VE- καντχερίνη, PECAM-1, α V β 3 ιντεγκρίνη ή VCAM-1. Η αδρανοποίηση της ETS-2 οδήγησε στον θάνατο των ομόζυγων εμβρύων πριν την

όγδοη εμβρυική ημέρα. Τα έμβρυα αυτά παρουσίασαν διαταραχές την μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων που απέτυχαν να ενωθούν με την κυκλοφορία της μητέρας. Η έκφραση του PECAM-1 ήταν πολύ μειωμένη σ' αυτά τα κύτταρα (Tymms και Kola 1994). Η μεμβράνη του Reichert ήταν επίμονα παρούσα, πιθανώς λόγω της απουσίας έκφρασης της MMP9 που εξηγεί την αποτυχία αναδόμησης της εξωκυτταρίου θεμέλιας ουσίας. Όταν τα μεταλλαγμένα ποντίκια σώζονται με συσσώρευση με τετραπλοειδικά ποντίκια, που παρέχουν λειτουργικούς εξωεμβρυικούς ιστούς, συμβαίνει φυσιολογική ανάπτυξη και τα ETS2-/- ποντίκια είναι ζωντανά και γόνιμα (Tymms και Kola 1994).

Γ.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ETS-1 ΣΤΗΝ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟ STRESS

Η αλληλουχία GGAA/T που αναγνωρίζεται από τους ETS παράγοντες είναι παρούσα και στις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τους παράγοντες του θερμικού σοκ (heat shock factors) και έχουν ανευρεθεί ομοιότητες μεταξύ των περιοχών πρόσδεσης στο DNA των παραγόντων του θερμικού σοκ και των ETS παραγόντων (Donaldson και συν. 1994). Η πληροφορία αυτή σε συνδυασμό με την ρύθμιση της δραστηριότητας των παραγόντων ETS από κινάσες του στρες υποδηλώνει ότι τα μέλη της ETS οικογένειας ενέχονται στην κυτταρική απάντηση στο στρες (Yasuda και συν. 1999). Το αγγειακό ενδοθήλιο είναι ένας από τους πρώτους στόχους για οξειδωτικό στρες σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, που πιθανόν προκαλείται από ενεργοποιημένα μακροφάγα που εκλύουν ρίζες οξυγόνου. Το υπεροξείδιο του οξυγόνου (0,1-10 μM) αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού, την μετανάστευση και τον σχηματισμό του αυλού των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* μαζί με την αύξηση του mRNA του ETS-1 (Yasuda και συν. 1999). Ο τελευταίος φαινότυπος αναστέλλεται με την χρήση ETS-1 antisense ολιγονουκλεοτιδίου υποδηλώνοντας ότι η ETS-1 έχει άμεση δράση κατά την απάντηση σε H_2O_2 . Επιπρόσθετα η από το H_2O_2 επαγόμενη έκφραση του ICAM-1, μιας πρωτεΐνης επιφανείας των ενδοθηλιακών κυττάρων που εμπλέκεται στην δια του ενδοθηλίου μετανάστευση των λευκοκυττάρων κατά την φλεγμονώδη αντίδραση οφείλεται κατά ένα τμήμα στην ενεργοποίηση του AP1-EBS στοιχείου που βρίσκεται στον υποκινητή του ICAM-1 (Roebuck και συν. 1995).

Μηχανικό στρες όπως αυτό που δημιουργείται από την ροή του αίματος μπορεί επίσης να ρυθμίσει τους ETS παράγοντες. Η έκφραση της ETS-1 μειώνεται

στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων που υποβάλλονται σε μια μικρή παραμόρφωση πιθανώς μειώνοντας επίσης την έκφραση των στόχων των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος που αποτελούν στόχους των ETS (Milkiewicz και συν. 2008). Έτσι η έναρξη της αιματικής ροής σε νεοσχηματισμένα αγγεία μπορεί να πάρει μέρος στην αναστολή της έκφρασης της ETS-1 που παρατηρείται in vivo κατά την διάρκεια των όψιμων σταδίων της αγγειογένεσης. Σε σχέση με την γενική κυτταρική απάντηση στο stress, η ETS-1 επίσης ρυθμίζει την δραστικότητα της πολυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράσης που ενεργοποιείται από τα ρήγματα στις αλύσους του DNA και την δραστικότητα των υποκινητών του p53 (Seth και συν. 1999) . Πιο πρόσφατα ο υποκινητής του γονιδίου του στρες GADD153 δείχθηκε ότι ενεργοποιείται από την ETS-1 και το Fli1. Το GADD153 είναι και αυτό γονίδιο στόχος του p53 (Seth και συν. 1999). Ο παράγοντας Elk1 ενεργοποιείται από τις MAPK κινάσες σε απάντηση σε υποτονικό σοκ και έτσι επάγει την έκφραση του γονιδίου Egr-1 (Zhang και συν. 1998) που είναι επίσης στόχος του γονιδίου ETS-1 στην κυτταρική σειρά 3T3 (Robinson και συν. 1997). Οι ανωτέρω παρατηρήσεις δηλώνουν ότι επιπρόσθετα με τον ρόλο τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα οι παράγοντες ETS όπως η ETS-1 και ο Elk1 μπορεί να παίζουν έναν γενικό ρόλο στην κυτταρική απάντηση στο στρες.

Γ.7. ETS-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Οι ETS πρωτεΐνες θεωρείται ότι παίζουν αιτιολογικούς ρόλους στην γένεση και εξέλιξη των ανθρώπινων όγκων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Τρεις κύριοι μηχανισμοί φαίνεται να είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των ets γονιδίων σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες: 1. χρωμοσωμικές μεταθέσεις που οδηγούν σε έκφραση υπερδραστικών ETS πρωτεϊνών σύντηξης 2. αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μιας κατά τα άλλα φυσιολογικής πρωτεΐνης και 3. μεταβολισμός των N- ακετυλγλυκοζαμινογλυκανών.

Χρωμοσωμικές μεταθέσεις συμβαίνουν στο σάρκωμα Ewing και σε αρκετούς τύπους λευχαιμίας (Wang και συν. 2012). Αυξημένα μετάγραφα ets γονιδίων παρατηρούνται σε καρκίνο του μαστού και γαστρικό καρκίνο. Το σάρκωμα Ewing και οι σχετιζόμενοι πρωτοπαθείς όγκοι του νευροεξωδέρματος συνήθως συνδυάζονται με μεταθέσεις που παραθέτουν ένα τμήμα του EWS γονιδίου σε ένα από τέσσερα διαφορετικά ets γονίδια και ειδικότερα των Fli-1, Erg, ER81 και PEA3. Από τα ανωτέρω τα Fli-1 και Erg γονίδια είναι αυτά που μετατίθενται συχνότερα στο σάρκωμα Ewing. Το EWS εκφράζεται παντού και θεωρείται ότι κωδικοποιεί μια

πρωτεΐνη που προσδέσει RNA. Η μεταγραφή των μετατιθεμένων ETS γονιδίων καθορίζεται από στοιχεία υποκινητών EWS. Οι κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες σύντηξης φέρουν αμινοτελικά κατάλοιπα του EWS και καρβοξυτελικές αλληλουχίες που περιέχουν την ETS προσδένουσα το DNA περιοχή μιας εκ των προαναφερθέντων ETS πρωτεϊνών. Το EWS τμήμα αυτών των χιμαιρικών πρωτεϊνών φέρει μια ισχυρή ενεργοποίηση και έτσι οι EWS- Ets πρωτεΐνες σύντηξης έχουν αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα συγκριτικά με την αρχική ETS πρωτεΐνη από την οποία προήλθαν. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η αυξημένη δραστηριότητα των ETS πρωτεϊνών και η συνακόλουθη αυξημένη έκφραση των γονιδίων στόχων τους είναι κριτικής σημασίας για την ογκογένεση.

Μεταθέσεις στις οποίες ενέχονται ανθρώπινα ets γονίδια και γονίδια άλλα εκτός του EWS συμβαίνουν επίσης στην χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και την οξεία μυελογενή λευχαιμία (Yi και συν. 1997). Στην χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία η ETS περιοχή του ERG2 ή του TEL συντήκεται με μεταθέσεις με το TLS/FUS ή το MN1 αντίστοιχα. Το TLS/FUS κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που προσδέσει RNA σχετιζόμενη δομικά με το EWS, ενώ το MN1 μπορεί να κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα. Δεδομένης της δομής αυτών των πρωτεϊνών σύντηξης είναι πιθανόν ότι επίσης λειτουργούν ως διαρκώς ενεργοί ETS μεταγραφικοί παράγοντες (Yi και συν. 1997). Σε αντίθεση, στην οξεία μυελογενή λευχαιμία οι μεταθέσεις που περιλαμβάνουν το TEL δεν οδηγούν στην δημιουργία πρωτεϊνών σύντηξης που φέρουν την ETS προσδένουσα το DNA περιοχή και ο σύντροφος στην σύντηξη δεν είναι πρωτεΐνη που προσδέσει το RNA. Αντίθετα το TEL συνεισφέρει σε μια αλληλεπίδραση επιφάνειας πρωτεΐνης με πρωτεΐνη και το έτερο στοιχείο που συμμετέχει στην σύντηξη είναι μία από τις κινάσες τυροσίνης όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), το ABL και η Janus κινάση 2 (Golub και συν. 1994). Η αλληλουχία του TEL επιδρά στον διμερισμό των κινασών αυτών και όθεν διεγείρει την δραστηριότητα τους.

Οι N-γλυκοπρωτεΐνες ενοχοποιούνται στην εξέλιξη του καρκίνου και αυτές κατεργάζονται από ένζυμα που καλούνται N-ακετυλγλυκοζαμινογλυκοζυλτρανσφεράσες III και V. Η γονιδιακή έκφραση της N-ακετυλγλυκοζαμινογλυκάνης V ρυθμίζεται από την ETS-1. Όταν αναστέλλεται η παραγωγή των προϊόντων του ενζύμου αυτού, δηλαδή η παραγωγή N-ακετυλγλυκοζ-β1,6 διακλαδίσεων, μέσω υπερέκφρασης της N-ακετυλγλυκοζαμινογλυκοζυλτρανσφεράσης III, οδηγεί σε καταστολή των πνευμονικών μεταστάσεων από μελάνωμα (Taniguchi και συν. 1999).

ETS-1 και ο ρόλος του στρώματος στον καρκίνο

Τα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν πάντα η εστία του ενδιαφέροντος στην έρευνα κατά του καρκίνου αλλά τα τελευταία χρόνια όλο και πιο πολύ προσοχή έχει αποδοθεί στο στρώμα του όγκου. Παράγοντες που εκλύονται από τα καρκινικά κύτταρα επιδρούν στο στρώμα και παίζουν σημαντικό πόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και την μετάσταση. Οι σημαντικότεροι είναι η αγγειογένεση του όγκου που είναι το προαπαιτούμενο για την συνεχή ανάπτυξη του όγκου και η προαγωγή της διήθησης του καρκίνου μέσω της έκκρισης πολλών πρωτεασών από τις στρωματικές ινοβλάστες ή μυοϊνοβλάστες που αποδομούν την μητρική ουσία. Και η αγγειογένεση και η δραστηριότητα των πρωτεασών ελέγχεται στενά σε διάφορα επίπεδα: επαγωγή από αγγειογενετικούς και αυξητικούς παράγοντες, πρωτεολυτική ενεργοποίηση στην περίπτωση των μεταλλοπρωτεϊνών και παρουσία αρκετών αναστολέων.

Ένα σημαντικό επίπεδο ρύθμισης και για τις δύο διεργασίες είναι η μεταγραφή: αρκετές ενδείξεις δείχνουν ότι η ETS-1 πρωτεΐνη παίζει μείζονα ρόλο σε αυτή την διεργασία. Κωδικοποιείται από το c-ets 1 πρωτοογκογονίδιο, που είναι ιδρυτικό μέλος της ETS οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων. Συνδυασμένες μελέτες διαμόλυνσης και μελέτες εξάλειψης έχουν δείξει ότι η ETS-1 πρωτεΐνη απαιτείται για την ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεάσες που εμπλέκονται στην αποδόμηση της μητρικής ουσίας, όπως οι κολλαγενάσες I (MMP-1) και IV (MMP-2 και MMP-9) και η στρωμελυσίνη I (MMP-3) καθώς και ο τύπου ουροκινάσης ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (Behrens και συν. 2001). Όλες αυτές οι πρωτεάσες είναι απαραίτητες για την αποδόμηση της μητρικής ουσίας που απαιτείται κατά την διήθηση από τον όγκο και την πρόωμη φάση της νεοαγγειογένεσης του. Σε καλλιέργειες ινοβλαστών επάγονται από τις ίδιες κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως και η ETS-1 πρωτεΐνη. Η ETS-1 πρωτεΐνη επίσης εκφράζεται παροδικά μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση του όγκου και μειώνεται πάλι όταν τελειώσει ο σχηματισμός των αγγείων (Dittmer 2003). Σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων σημαντικοί αγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο VEGF και ο bFGF επάγουν την παραγωγή ETS-1 (Iwasaka και συν. 1996).

Έχει καταδειχθεί *in vivo* ο ρόλος της ETS-1 στην αγγειογένεση χρησιμοποιώντας μια στρατηγική με antisense ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια στην δοκιμασία της χοριοαλλαντοειδικής μεμβράνης (Wernert συν. 1999). Τα πρώτα βήματα στην δημιουργία του στρώματος είναι κριτικής σημασίας για την εξέλιξη του καρκίνου αφού και η αγγειογένεση και ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών αρχίζει

αυτή την χρονική στιγμή, αποτελώντας έτσι μια σημαντικότερη συνιστώσα στην αύξηση και διήθηση του όγκου. Η παρουσία του στρώματος γύρω από μη διηθητικά πορογενή και λοβιακά in situ καρκινώματα συσχετίζεται με έκφραση του VEGF μέσα στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Ο VEGF δεν είναι μόνο ο πιο ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας αλλά θεωρείται ότι συμμετέχει στην δημιουργία στρώματος μέσω μιας εκσεσημασμένης δράσης αύξησης της διαπερατότητας που οδηγεί σε διαφυγή ινικής και σχηματισμό κοκκιώδους ιστού. Και ο VEGF και ο bFGF (βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών) επάγουν την έκφραση της ETS-1 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών (Iwasaka και συν. 1996).

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ETS-1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

Καρκίνος του κόλου: Έτσι έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με καρκίνο του κόλου με θετικούς λεμφαδένες και σταδίου M1 είχαν αυξημένη έκφραση ETS-1 ανοσοϊστοχημικά και είχαν χειρότερη πρόγνωση (Tokuhara και συν. 2003). Η έκφραση των ETS-1 και ETS-2 δεν παρατηρείται στο φυσιολογικό κόλο ούτε στους υπερπλαστικούς πολύποδες, αλλά παρατηρείται σε αδένωμα και καρκίνωμα (Ito και συν. 2002). Τα ευρήματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και σε άλλη μελέτη (Sato και συν. 2002) όπου καταδείχθηκε αυξημένη παρουσία ETS-1 πρωτεΐνης μέσα σε στρωματικούς ινοβλάστες, μυοινοβλάστες και τριχοειδή και επίσης μέσα σε καρκινικά κύτταρα ενώ υπήρχε και συσχέτιση μεταξύ ανοσοαντίδρασης για ETS-1 του στρώματος και έκφρασης στα αγγεία της β3 ιντεγκρίνης. Μάλιστα υπήρχε σημαντική και ανεξάρτητη συσχέτιση της υπερέκφρασης στο στρώμα της ETS-1 πρωτεΐνης και της έκφρασης της β3 ιντεγκρίνης στα αγγεία. Στην ίδια μελέτη σε περιπτώσεις πνευμονικών μεταστάσεων ο δείκτης της αγγειακής β3 ιντεγκρίνης ήταν μειωμένος συγκριτικά με αυτόν του πρωτοπαθούς όγκου και των ηπατικών μεταστάσεων. Σε αντίθεση η έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στο στρώμα και τα καρκινικά κύτταρα δεν άλλαζε.

Έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης ανοσοϊστοχημικά έχει επίσης συσχετισθεί με το βάθος της διήθησης, την παρουσία λεμφαδενικής μετάστασης, την προσβολή των λεμφαγγείων και των φλεβών αλλά όχι την διαφοροποίηση του καρκίνου του κόλου (Nakayama και συν. 2001). Επιπρόσθετα έχει καταδειχθεί σε καρκίνο του κόλου ότι υπάρχει έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης μαζί με την πρωτεΐνη sox-4 ώστε να

ενεργοποιηθεί ο υποκινητής της πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης p56lck (McCracken και συν. 1997).

Καρκίνος του στόματος: Έχει παρατηρηθεί σε καρκίνο του στόματος εκ πλακώδους επιθηλίου υπερέκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης σε ποσοστό 61% που ήταν και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για λεμφαδενική μετάσταση (Pande και συν. 2002). Η πρόγνωση σε ασθενείς με ανοσοϊστοχημική ταυτόχρονη αυξημένη έκφραση ETS-1, p53 και P-γλυκοπρωτεΐνης ήταν χειρότερη συγκριτικά με αυτούς που δεν παρουσίαζαν υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών (Soni και συν. 2002).

Καρκίνος του ήπατος: Η υπερέκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης ανοσοϊστοχημικά έχει συσχετισθεί με την ιστολογική διαφοροποίηση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Έτσι σε μελέτη παρατηρήθηκε έκφραση ETS-1 σε 50% των καλώς διαφοροποιημένων καρκινωμάτων, 64% των μετρίως διαφοροποιημένων και 100% των κακώς διαφοροποιημένων καρκίνων του ήπατος. Η έκφραση μάλιστα της ETS-1 πρωτεΐνης ήταν ισχυρότερη στην περιφέρεια του όγκου (Kanda και συν. 2002). Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες έχουν δείξει ότι διαμόλυνση με το ανθρώπινο ETS-1 γονίδιο οδήγησε σε αύξηση του επιπέδου έκφρασης των c-met, MMP-1, MMP-9 και u-PA και άρα του δυναμικού διήθησης. Επίσης κύτταρα διαμολυσμένα με ETS-1 αν διεγερθούν ακολούθως με αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF) έχουν ακόμη μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης και κίνησης απ'ότι μόνο με τη χορήγηση του HGF (Jiang και συν. 2001). Μελέτες με RT-PCR έχουν δείξει υπερέκφραση του ETS-1 ογκογονιδίου που συνδυάζεται με υπερέκφραση της MMP-7 σε ανθρώπινα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (Ozaki και συν. 2000). Ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις έγιναν με ανοσοϊστοχημική μελέτη 99 περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου: αραιότατη έκφραση ETS-1 παρατηρήθηκε σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό αλλά έντονη αύξηση παρατηρήθηκε σε μη καρκινικές βλάβες παρακείμενες των περιοχών του ηπατοκυτταρικού καρκίνου και μάλιστα μεγαλύτερη από αυτή της περιοχής του καρκίνου αυτού καθ'εαυτού (Ito και συν. 2000). Απρόσμενα επίσης, ο μέσος δείκτης χρώσης ήταν μικρότερος σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο με υψηλό στάδιο TNM, κακή διαφοροποίηση, διήθηση της πυλαίας, ενδοηπατική μετάσταση, μεγάλο μέγεθος όγκου και υψηλό δείκτη χρώσης με ki-67 ενώ και η πρόγνωση των ασθενών με υψηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση ETS-1 ήταν καλύτερη αυτών με χαμηλή έκφραση (Ito και συν. 2000).

Έχει διερευνηθεί η δράση πρωτεογλυκανών και συγκεκριμένα της ηπαρίνης και της θεικής ηπαράνης του ηπατικού καρκινώματος πάνω στην αλληλεπίδραση DNA- μεταγραφικών παραγόντων και έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αναστείλουν αυτή την αλληλεπίδραση. Ειδικότερα η ETS-1 πρωτεΐνη και οι AP-1, SP-1 και ο πυρηνικός παράγοντας κB είναι ευαίσθητοι στην δράση της ηπαρίνης και της θεικής ηπαράνης ενώ ο TFIID δεν αναστελλόταν. Ενδιαφέρον ήταν ότι θεική ηπαράνη από την παρακείμενη του όγκου περιοχή ήταν πέντα φορές πιο δραστική από την ηπαρίνη. Αν και η θεική ηπαράνη από την περιοχή του καρκίνου ήταν λιγότερο δραστική από αυτή του παρακείμενου ηπατικού ιστού, η δράση της ήταν συγκρίσιμη με αυτή της ηπαρίνης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι δομικές διαφορές των γλυκοζαμινογλυκανών επιδρούν σημαντικά στην βιολογική συμπεριφορά τους (Dudás και συν. 2000). Και άλλοι ερευνητές έχουν ενοχοποιήσει την συμμετοχή N-ακετυλγλυκοζαμινοτρανσφερασών III και V στον καρκίνο του ήπατος στον οποίο αυξάνεται η έκφραση τους. Η γονιδιακή έκφραση της γλυκοζυλτρανσφεράσης V ρυθμίζεται από την ETS-1 πρωτεΐνη (Taniguchi και συν. 1999).

Καρκίνος πνεύμονος: Χρησιμοποιώντας RT-PCR (αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) έχει καταδειχθεί θετική συσχέτιση ανάμεσα σε επίπεδα ETS-1 mRNA και έκφρασης MMP-7. Τα επίπεδα ETS-1 mRNA ήταν αυξημένα σε ασθενείς σταδίου N2 ενώ τα επίπεδα MMP-7 mRNA ήταν αυξημένα σε ασθενείς σταδίου II-IV συγκριτικά με αυτούς σταδίου I και υψηλότερα σε αυτούς με λεμφαδενική μετάσταση (Sasaki και συν. 2001). Μελέτες με Northern blot και in situ υβριδισμό στις καρκινικές σειρές VMRC-LCD και NCI-H226 μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονος έδειξαν ότι διαμόλυνση τους με τον E1AF/ PEA3 οδηγεί σε αυξημένη κυτταρική κινητικότητα, διήθηση και διέγερση τους από τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων σε αντίθεση με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα. Επίσης ο E1AF/ PEA3 επάγει την έκφραση του ETS-1 γονιδίου και του γονιδίου του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης (Hiroumi και συν. 2001). Η πρόγνωση ασθενών με αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονος με θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση για ETS-1 σχετίζεται με την έκφραση u-PA και είναι χειρότερη αυτής ασθενών χωρίς ανοσοϊστοχημική έκφραση ETS-1 (Takanami και συν. 2001). Η διαμόλυνση της καρκινικής σειράς A549 με το γονίδιο HOXD3 (Homeobox containing gene) αύξησε την έκφραση mRNA των ETS-1, ETS-2, u-PA καθώς και την έκφραση της ιντεγκρίνης $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 3$ και αύξηση των

ικανοτήτων προσκόλλησης και μετανάστευσης σχετικά με την φιβρονεκτίνη και την βιτρονεκτίνη. Πιθανολογείται λοιπόν ότι ανώμαλη έκφραση του HOXD3 μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη διεισδυτική και μεταστατική ικανότητα του καρκίνου μέσω αύξησης έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την μετάσταση (Omatu 1999).

Μελάνωμα: Σε κυτταρική σειρά μελανώματος διαμόλυνση με cDNA των μεταγραφικών παραγόντων SP1 και ETS-1 και την περιοχή υποκινητή του α V γονιδίου ιντεγκρίνης του ποντικού οδηγεί σε περίπου τριπλάσια δραστηριότητα του υποκινητή (Tajima και συν. 2000). Ένας πολυμορφισμός στον υποκινητή της μεταλλοπρωτεΐνης 1 και συγκεκριμένα η παρουσία μιας επιπρόσθετης γουανίνης στην θέση -1607 δημιουργεί μια θέση πρόσδεσης ETS παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερο μεταγραφικό ρυθμό σε κύτταρα μελανώματος και φυσιολογικές ινοβλάστες και προσδένει πολύ περισσότερο ETS-1 (Rutter και συν. 1998).

Έχει ενοχοποιηθεί ο μεταβολισμός των γλυκοζαμινογλυκανών και στην περίπτωση του μελανώματος. Όταν ανασταλεί η παραγωγή του προϊόντος της γλυκοζυλτρανσφεράσης V που είναι η N-ακετυλγλυκοζαμίνη-β1-6 μέσω υπερέκφρασης της N-ακετυλγλυκοζαμινοτρανσφεράσης III, τότε μειώνονται οι πνευμονικές μεταστάσεις μελανώματος.

Καρκίνος οισοφάγου: Ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση της πρωτεΐνης ETS- 1 και c-Met έχει παρατηρηθεί και σε καρκίνο του οισοφάγου. Σε έξι κυτταρικές σειρές καρκίνου του οισοφάγου επιβεβαιώθηκε η στενή συσχέτιση μεταξύ υψηλών επιπέδων ETS-1 και cMet ενώ παρουσιαζόταν εξαιρετικά κινητικός φαινότυπος ως απάντηση σε διέγερση σε αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (Saeki και συν. 2002). Υψηλά σημαντικότερη ήταν η ανοσοϊστοχημική ενόπιση της ETS-1 σε περιοχές διείσδυσης συγκριτικά με περιοχές ενδοεπιθηλιακής διασποράς και σε περιφερικότερες θέσεις παρά εγγύτερα.

Καρκίνος στομάχου: Η πυκνότητα μικρών αγγείων είναι υψηλότερη σε καρκινώματα στομάχου θετικά για ETS-1 και η πρόγνωση των ασθενών αυτών είναι χειρότερη (Tsutsumi και συν. 2000).

Καρκίνος του θυρεοειδούς: Ανοσοϊστοχημική μελέτη έδειξε ότι θετική χρώση για καρκίνο υπήρχε συνολικά σε 89,7%. Ανάλογα με την ιστολογική ταξινόμηση το ποσοστό αυτό διαφοροποιούταν σε 97,9% για θηλώδη καρκινώματα, 87,5% για θυλακιώδη, 60% για μυελοειδή και 50% για αναπλαστικά. Υπήρχε θετική χρώση και για καλοήθεις παθήσεις και αυτή ήταν 40% για αδενώματα θυρεοειδούς και 16,7% για αδενωματώδεις βρογχοκήλες (Nakayama και συν. 1999).

Όγκοι εγκεφάλου: Μελέτες έδειξαν ότι σε καλοήθη μηνιγγιώματα υπάρχει ανοσοϊστοχημική έκφραση ETS-1 σε 38% και u-PA σε 62% ενώ σε άτυπα και αναπλαστικά μηνιγγιώματα το ποσοστό για την έκφραση ETS-1 και u-PA ήταν 100%. Επιπλέον υπήρχε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση ETS-1 και u-PA. Σε περιπτώσεις όπου υπήρχε διήθηση στον εγκέφαλο, σκληρά μήνιγγα ή οστό υπήρχε θετική χρώση για ETS-1 και u-PA στο 85,7% (Kitange και συν. 2000). Στην U251-DN κυτταρική σειρά γλοιώματος η έκφραση κυρίαρχων αρνητικών για ETS-1 διαγονιδίων καταστέλλει την διαμεσολαβούμενη από φιμπρονεκτίνη κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση μέσω μείωσης της έκφρασης ιντεγκρίνης α5 (Kita και συν. 2001). Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς γλοιώματος U-373 MG με ETS-1 οδήγησε σε αύξηση του mRNA της N-ακετυλγλυκοζαμινοτρανσφεράσης V και ακολούθως και στην αυξημένη παραγωγή γλυκανών που φέρουν β1,6-N-ακετυλγλυκοζαμίνη. Ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών παρουσίαζε μεγάλη αύξηση στην ικανότητα διήθησης (Yamamoto και συν. 2000).

Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση του u-PA μέσω επαγωγής της ETS-1 πρωτεΐνης. Και αντίθετα η χρήση antisense ETS-1 ολιγονουκλεοτιδίων ανέστειλλε ταυτόχρονα την έκφραση των ETS-1 και u-PA και μείωσε >59% την διήθηση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (Kitange και συν. 1999). Στις κυτταρικές σειρές γλοιώματος CCF και 1321N1 η φωσφορυλίωση της ETS-1 διεγείροταν από βραδυκίνη και καρβαχόλη. Η φωσφορυλίωση της ETS-1 αναστελλόταν δραματικά από την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης KT5926 (Fleischman και συν. 1995). Η έντονη αγγειογένεση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι χαρακτηριστικό των κακοήθων γλοιωμάτων. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου ενώ οι υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2 είναι αυξημένοι στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα γονίδια των υποδοχέων αυτών έχουν στους υποκινητές τους μια περιοχή ικανή να προσδέσει ETS.

Επίσης μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση της ETS-1 σε αστρογλιώματα. Τα ευρήματα έδειξαν χρώση κυρίως του πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων αυτών με επιθηλιοειδή μορφολογία συμβατή με μια ενεργοποιημένη κατάσταση, ενώ τα με πιο επίπεδο σχήμα “ήρεμα” ενδοθηλιακά κύτταρα κυρίως παρουσίαζαν χρώση του κυτταροπλάσματος. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι απαιτείται μετατόπιση στον πυρήνα της ETS-1 κατά την νεοαγγειογένεση. Μια υψηλώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης ETS-1 και Flt-1 (Valter και συν. 1999) .

Όγκοι νευροεξωδέρματος: Έχει δειχθεί με RT-PCR η παρουσία ETS-1 μεταγράφων σε νευροεπιθελίωμα και νευροβλάστωμα καθώς και σε σάρκωμα Ewing (Sacchi και συν. 1991).

Όγκοι χοληφόρων πόρων: Σε μελέτη ανοσοϊστοχημική 41 εξωπατικών καρκινωμάτων και 19 χολαγγειοκυτταρικών καρκινωμάτων παρατηρήθηκε θετική χρώση στο 61% και στο 21,6% αντίστοιχα. Η έκφραση της ETS-1 έδειξε αντίστροφη συσχέτιση με τον δείκτη χρώσης για το ki-67 και την αγγειακή και περινευρική διήθηση των καρκίνων των χοληφόρων πόρων, ενώ δεν υπήρχε τέτοια συσχέτιση στα χολαγγειοκυτταρικά καρκινώματα (Ito και συν. 2000). Επιπλέον υπήρχε μεγαλύτερη έκφραση ETS-1 στα καλώς διαφοροποιημένα καρκινώματα των χοληφόρων πόρων.

Καρκίνος του παγκρέατος: Ενώ στον φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό ήταν σε ελάχιστες περιπτώσεις θετική η χρώση, στον καρκίνο του παγκρέατος ήταν θετική σε ποσοστό 80,5%. Το θηλώδες καρκίνωμα, το μετρίως διαφοροποιημένο αδenoκαρκίνωμα και το καλώς διαφοροποιημένο αδenoκαρκίνωμα εκφράζουν μεγάλη θετικότητα για την ETS-1 ανοσοϊστοχημικά. Αντίθετα τα κακώς διαφοροποιημένα παγκρεατικά καρκινώματα παρουσιάζουν σχετικά ασθενή θετική χρώση. Στον παγκρεατικό καρκίνο δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της ETS-1 και την παρουσία λεμφαδενικής μετάστασης, μεγέθους όγκου, πρόγνωσης ή ταξινόμησης κατά το σύστημα TNM (Ito και συν. 1998).

Καρκίνος του ενδομητρίου: Σε μελέτη 60 ενδομητρικών καρκίνων παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό μικρών αγγείων του όγκου και των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης της ETS-1. Ανοσοϊστοχημική χρώση ανέδειξε ότι η

εντόπιση της ETS-1 ήταν παρόμοια με αυτή των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Το επίπεδο του mRNA της ETS-1 αυξανόταν με αυξανόμενο στάδιο της νόσου. Επιπρόσθετα το επίπεδο του mRNA της ETS-1 συσχετιζόταν με τα επίπεδα του VEGF στα καλώς διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα του ενδομητρίου και με αυτά του bFGF σε μετρίως και κακώς διαφοροποιημένα καρκινώματα. Επίσης το επίπεδο του mRNA της ETS-1 συσχετιζόταν με τα επίπεδα του Platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) και της ιντερλευκίνης 8 (Fujimoto και συν. 2002).

Καρκίνος της ωοθήκης: Χρησιμοποιώντας *in situ* mRNA υβριδισμό οι Davidson και συν. 2003 έδειξαν ότι υπήρχε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της β1 υπομονάδας της ιντεγκρίνης στα καρκινικά κύτταρα με αυτή των PEA, ETS-1, IL-8, bFGF, MMP2 καθώς και θετική συσχέτιση της β1 υπομονάδας της ιντεγκρίνης στα στρωματικά κύτταρα με την έκφραση του ETS-1 και TIMP-2. Επίσης σημαντική συσχέτιση υπήρχε ανάμεσα στην αV υπομονάδα της ιντεγκρίνης στα καρκινικά κύτταρα και στην έκφραση στα στρωματικά κύτταρα του ETS-1. Περαιτέρω, η έκφραση του mRNA της β1 υπομονάδας της ιντεγκρίνης στα καρκινικά κύτταρα έδειξε σημαντική συσχέτιση με αυτή των ETS-1, IL-8 και bFGF στα κύτταρα του στρώματος, ενώ η παρουσία mRNA της β1 υπομονάδας της ιντεγκρίνης στα κύτταρα του στρώματος σχετίζεται με την παρουσία PEA3 στα καρκινικά κύτταρα (Davidson και συν. 2003). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι υπάρχει διάλογος ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος ενώ υποδηλώνουν και την πιθανή αλληλουχία ενεργοποίησης στον καρκίνο των ωοθηκών που περιλαμβάνει την β1 υπομονάδα της ιντεγκρίνης, τον ETS-1, την IL-8, το PEA3 και την MMP (Davidson και συν. 2003). Μελέτες με *in situ* υβριδισμό σε 67 κακοήθεις συλλογές και 90 πρωτοπαθή νεοπλάσματα της ωοθήκης και μεταστάσεις της έδειξαν ότι το mRNA της ETS-1 ανιχνεύθηκε σε 36% των συλλογών (Davidson και συν. 2001). Η έκφραση δε αυτή ήταν παρόμοια σε πλευριτικές και περιτοναϊκές συλλογές. Στις συμπαγείς αλλοιώσεις η έκφραση του mRNA της ETS-1 που υπήρχε και στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του στρώματος ήταν στο 38%. Η έκφραση της ETS-1 στα καρκινικά κύτταρα των συμπαγών βλαβών συσχετιζόταν με αυτή στα κύτταρα του στρώματος και επίσης με αυτή της έκφρασης του mRNA του VEGF και του bFGF (στα καρκινικά και στα κύτταρα του στρώματος) και της IL-8 (μόνο στα καρκινικά κύτταρα). Η έκφραση του mRNA της ETS-1 στις συλλογές συσχετίστηκε μόνο με την έκφραση του bFGF στις συλλογές αυτές. Η έκφραση του mRNA στις μεταστάσεις ήταν

μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή στις συλλογές. Η πρόγνωση ασθενών με παρουσία ETS-1 σε συλλογή ήταν χειρότερη ενώ το ίδιο ισχύει και για την πρωτοπαθή βλάβη αυτή καθεαυτή (Davidson και συν. 2001). Έχει αναφερθεί ότι πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης ETS-1, MMP1 και MMP4 υπάρχουν σε καλοήγη ορώδη κυσταδενώματα, υψηλότερη αύξηση στο στρώμα ινοβλαστών αλλά όχι στο επιθήλιο οριακών όγκων ενώ η πιο ισχυρή έκφραση υπάρχει και στο στρώμα αλλά και στο επιθήλιο των ορώδων διηθητικών καρκίνων. Γίνεται η υπόθεση ότι η αναδόμηση του στρώματος και η παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να επιτρέπουν την διασπορά του όγκου (Behrens και συν. 2001).

Καρκίνος του μαστού: Μελετήθηκε η έκφραση της ETS-1 με ποσοτική real-time fluorescence PCR σε 123 σποραδικές περιπτώσεις καρκίνου του μαστού από τους Span και συν. (2002). Βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης ETS-1 με αυτά του VEGF και PAI-1 στον ίδιο ιστό. Σε μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση η έκφραση της ETS-1 ήταν ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας χρονικού διαστήματος ελεύθερου υποτροπής.

Το γονίδιο ESX που αποτελεί μέλος της οικογένειας ETS και είναι ειδικό των επιθηλίων ενισχύεται σε πρώιμα καρκινώματα του μαστού και υπερεκφράζεται σε πορογενές καρκίνωμα *in situ* του μαστού. Οι Eckel και συν. (2003) έδειξαν ότι το ESX διεγείρει τον υποκινητή του HER2/neu και της κολλαγενάσης αλλά δεν καταφέρνει να ενεργοποιήσει τον άθικτο υποκινητή της στρωμελυσίνης. Πάντως το ESX ενεργοποιεί με δόσοεξαρτώμενο τρόπο έναν ετερόλογο υποκινητή που περιλαμβάνει οκτώ αντίγραφα της ETS προσδένουσας θέσης που προέρχεται από το γονίδιο της στρωμελυσίνης. Ανάλυση εννιά διαφορετικών μελών της ETS οικογένειας να ενεργοποιήσουν τον υποκινητή Her2/neu ανέδειξε τρία μοντέλα γονιδιακής ενεργοποίησης: 1. καμμία επίδραση ή καταστολή του υποκινητή (Elk-1 και NET) 2. ενδιάμεση δραστηριότητα (ER81, GABP, ESX, Ets-2) και 3. μέγιστη δραστηριότητα ενεργοποίησης (ETS-1, VP-16-ETS-1, EHF).

Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης είναι ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεασών σερίνης και μπορεί να διασπάσει διάφορα συστατικά της εξωκυτταρίου θεμελίας ουσίας ώστε να προάγει την αύξηση, διήθηση και μετάσταση. Ο υποκινητής του u-PA βρίσκεται υπό τον άμεσο έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα ETS-1. Το mRNA του u-PA εκφράζεται στην αρκετά

διηθητική, μη ορμονοευαίσθητη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 αλλά όχι στην ορμονοευαίσθητη σειρά MCF-7. Χρησιμοποιώντας PCR ευαίσθητη σε μεθυλίωση έδειξαν ότι 90% των δινοκλεοτιδίων CpG στον υποκινητή u-PA είναι μεθυλιωμένα στα MCF-7 κύτταρα, ενώ πλήρως μη μεθυλιωμένα CpG ανιχνεύθηκαν στα MDA-MB-231 κύτταρα. Επίσης η δραστικότητα μεθυλτρανσφεράσης του DNA είναι σημαντικά υψηλότερη στην σειρά MCF-7, ενώ η δραστικότητα απομεθυλάσης είναι υψηλότερη στην σειρά MDA-MB-231. Υποδηλώνεται από τα ευρήματα αυτά ότι ο συνδυασμός αυξημένης μεθυλτρανσφεράσης DNA και μειωμένης απομεθυλάσης προκαλεί μεθυλίωση και αναστολή έκφρασης του u-PA στα MCF-7 κύτταρα. Το αντίστροφο είναι αληθές στην σειρά MDA-MB-231 που αντιπροσωπεύει ένα προχωρημένο στάδιο διηθητικού καρκίνου. Ο αναστολέας της αποκετυλάσης της ιστόνης, τριχοστατίνη A, επάγει την έκφραση του γονιδίου u-PA στην σειρά MDA-MB-231 αλλά όχι στην σειρά MCF-7 (Guo και συν. 2002).

Σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μελών της οικογένειας ETS και γονιδίων των MMP στις δύο προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές. Βρέθηκε ότι υπήρχαν υψηλότερα επίπεδα mRNA των ETS-1, ETS-2, PEA3, ERM, Tel, Net, MMP-13 και MMP-14 στην σειρά MDA-MB-231 συγκριτικά με την MCF-7. Η έκφραση mRNA των MMP-1, MMP-3 και MMP-16 ήταν ίδια και στις δύο σειρές. Η τριχοστατίνη A διέγειρε την παραγωγή MMP-1, MMP-9 και TIMP-1 mRNA και στις δύο σειρές ενώ δεν ανιχνευόταν mRNA των MMP-2 και MMP-7. Η πρωτεΐνη ETS-1 ανιχνεύθηκε μόνο στην σειρά MDA-MB-231 και το επίπεδο της αυξανόταν μετά από διέγερση με τριχοστατίνη A. Η τριχοστατίνη A προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας της MMP-9 στην σειρά MCF-7 και στην σειρά MDA-MB-231, αλλά δεν ανευρέθηκε δραστικότητα MMP-2 (Barrett και συν. 2002).

Οι Theillet και συν. (1996) μελέτησαν κατά πόσο ενισχύεται ή όχι καθένας από τους δείκτες BCL-1, HST, INT-2, SEA στο 11q13 και η ETS-1 στο 11q23 σε 297 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Η ETS-1 σπάνια ενισχυόταν και όποτε συνέβαινε αυτό πάντα ανεξάρτητα από τα άλλα πρωτοογκογονίδια. Σε 50 περιπτώσεις υπήρχε συνενίσχυση των BCL-1, HST, INT-2, σε 3 περιπτώσεις η ενίσχυση επεκτεινόταν και στο SEA γονίδιο και σε 6 περιπτώσεις το BCL-1 ήταν το μόνο γονίδιο που ενισχυόταν.

Αναφορικά με τις μέχρι τώρα πληροφορίες από την βιβλιογραφία μόνο μία μελέτη πραγματεύεται την ανοσοϊστοχημική έκφραση της ETS-1 στον καρκίνο του μαστού, στην οποία όμως δεν αναφέρονται κλινικοπαθολογοανατομικές συσχετίσεις

(Behrens και συν. 2001). Στην μελέτη αυτή βρέθηκε και mRNA ETS-1 και ETS-1 πρωτεΐνη μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε ινοβλάστες σε πορογενή και λοβιακά *in situ* καρκινώματα. Η ETS-1 πρωτεΐνη εντοπιζόταν και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα υποδηλώνοντας έτσι πυρηνική μετατόπιση. Αφού και η MMP-1 και η MMP-9 είναι ανάμεσα στους στόχους της ETS-1 οι Behrens και συν. προσπάθησαν να διαπιστώσουν κατά πόσον υπήρχε συσχέτιση της έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων σε προδιηθητικά και διηθητικά καρκινώματα. Οι MMP1 και MMP9 ήταν αυξημένες και τοπογραφικά συνεκφράζονταν με το ETS-1 και μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και μέσα στις στρωματικές ινοβλάστες γύρω από *in situ* καρκινώματα του μαστού. Υπήρχε και περαιτέρω αύξηση της έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων σε διηθητικούς καρκίνους. Επίσης ανευρέθηκε έκφραση της ETS-1 και MMP-1 και MMP-9 μέσα σε επιθηλιακά κύτταρα και *in situ* και διηθητικών καρκινωμάτων. Στην ίδια μελέτη (Behrens και συν. 2001) έγινε προσπάθεια να διαπιστωθεί ποια από τις τρεις μορφές εναλλακτικού ματίσματος και συρραφής του ETS-1 μεταγράφου υπάρχει. Συγκεκριμένα υπάρχουν μορφές που είτε δεν έχουν το εξόνιο IV είτε δεν έχουν το εξόνιο VII είτε δεν έχουν κανένα από τα δύο αυτά εξόνια. Σε RT-PCR ανάλυση των προαναφερθέντων περιπτώσεων βρήκαν μόνο τα μετάγραφα που δεν έχουν το εξόνιο VII που κωδικοποιεί τμήματα της περιοχής που προσδένει DNA, ενώ άλλα τμήματα της περιοχής αυτής κωδικοποιούνται από τα εξόνια VIII και IX. Το προϊόν μετάφρασης αυτό που καλείται p42 ETS-1 μπορεί λοιπόν να παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες πρόσδεσης DNA από ότι η πρωτεΐνη ETS-1 που έχει πλήρες μήκος. Στο καρκίνωμα του κόλου η p42 ETS-1 πρωτεΐνη έχει βρεθεί ότι σώζει από την απόπτωση που προκαλείται από το Fas υποδηλώνοντας ότι μπορεί να εξασκεί παρόμοια δράση και στον καρκίνο του μαστού (Li και συν. 1999). Σε αντίθεση, τα ανθρώπινα αστροκυττώματα εμφανίζουν μόνο το μετάγραφο με το πλήρες μέγεθος c-ETS-1 δηλώνοντας έτσι την παρουσία μηχανισμών ειδικών των ιστών όσον αφορά το εναλλακτικό μάτισμα και συρραφή του ETS-1 (Fleischman και συν. 1995).

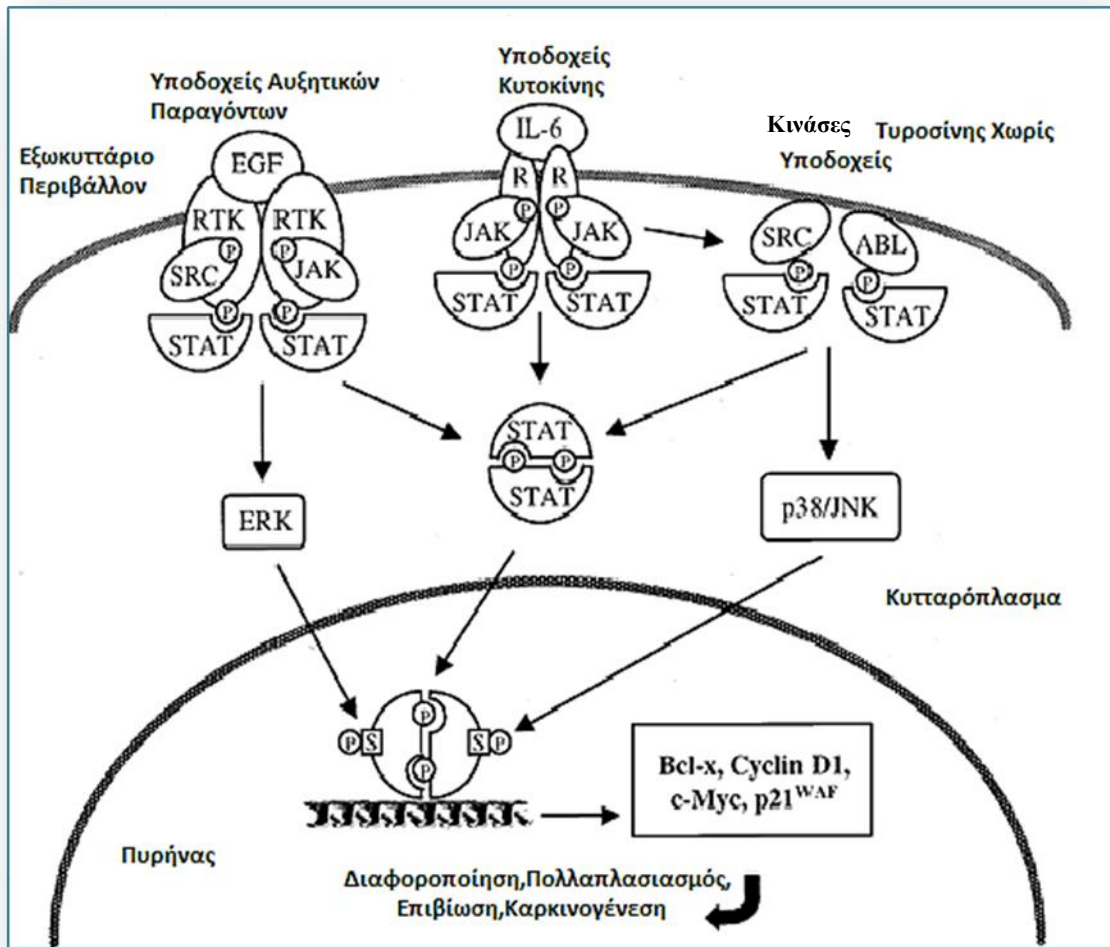
Οι Watabe και συν. 1998 μελέτησαν τις απαιτήσεις για μεταγραφικούς παράγοντες για την επαγωγή u-PA και της 92 kDa κολλαγενάσης IV από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα σε κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3 που υπερεκφράζουν τον ErbB-1. Πειράματα διαμόλυνσης με φορείς έκφρασης ETS-1 και ETS-2 ενίσχυσαν την ενεργοποίηση των υποκινητών του uPA και MMP9 σε απάντηση στον EGF.

Δ. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ STATs

Η κατανόηση των μονοπατιών μέσω των οποίων οι εξωκυττάρειες κυτοκίνες δρουν πάνω στα ενδοκυτταρικά μόρια επετεύχθη πρώτα με τον προσδιορισμό των υποδοχέων κυτοκίνης και μετά μέσω της μοριακής κλωνοποίησης εξασφαλίζοντας έτσι την αμινοξική αλληλουχία τους (Ihle και συν. 1995, Kishimoto και συν. 1994). Δεύτερον, τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν για ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες μέσω των οποίων τα σήματα περνούν από τον προσδεμένο συνδέτη στον πυρήνα των κυττάρων. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες αλλάζουν τη συμπεριφορά κυττάρων μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης. Ένα τέτοιο μονοπάτι που αποκαλύφθηκε λεπτομερώς ήταν η σηματοδότηση IFN μέσω υποδοχέα σχετιζόμενου με JAK κινάση τυροσίνης σε λανθάνοντες κυτταροπλασματικούς μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι τελικά ονομάστηκαν STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription, μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής) (Darnell και συν. 1994, Stark και συν. 1998).

Κατά τη διάρκεια της περασμένης δεκαετίας, νέα στοιχεία αναδείχθηκαν με αποτέλεσμα να αποδείξουν ότι οι κυτοκίνες διαβιβάζουν τα μηνύματά τους μέσω μιας νέας οικογένειας κινασών τυροσίνης που ονομάστηκαν JAK κινάσες (Janus tyrosine Kinases) (Ihle και συν. 1995, Darnell και συν. 1994).

Συμβατικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PTKs), κατέχουν καταλυτικές επικράτειες οι οποίες κυμαίνονται από 250 έως 300 αμινοξέα και αντιστοιχούν σε περίπου 30 kDa (Hanks και συν. 1998). Η θέση της καταλυτικής επικράτειας της κινάσης, στα περισσότερα ένζυμα, βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο εκτελεί ρυθμιστικό ρόλο (Rane και συν. 2000). Οι καταλυτικές επικράτειες αποτελούνται από χαρακτηριστική σειρά συντηρητικών αμινοξικών καταλοίπων. Οι PTKs μπορούν να ομαδοποιηθούν περαιτέρω σαν μέλη είτε της Src οικογένειας, είτε της Tec υπο-οικογένειας ή μιας από τις υπο-οικογένειες των αυξητικών παραγόντων, για παράδειγμα της υπο-οικογένειας του EGF-υποδοχέα, της υπο-οικογένειας του υποδοχέα ινσουλίνης ή της υπο-οικογένειας του PDGF-υποδοχέα (Rane και συν. 2000). Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης κωδικοποιούνται από τα c-abl και c-fes/fps γονίδια και έχουν μακρινή συσχέτιση με την Src υπο-οικογένεια (Pierce 1989). Εκτός από τις καταλυτικές επικράτειες της κινάσης, οι PTK κατέχουν και ορισμένα άλλα χαρακτηριστικά μοτίβα, τα οποία επιτρέπουν στις κινάσες να αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς μηνυματοδότες-διαμεσολαβητές (όπως είναι οι STAT μεταγραφικοί παράγοντες) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης κινασών (JAK) με μεταγραφικούς παράγοντες (STAT) (Tammy και συν. 2000).

Δ.1. ΤΟ JAK-STAT ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

Ο χαρακτηρισμός της ικανότητας της IFN-α να επάγει ταχύτατα την έκφραση των γονιδίων, οδήγησε στην ανακάλυψη του μηνυματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT. Μελέτες που ακολούθησαν καθόρισαν ότι οι JAK και οι STAT παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της βιολογικής απόκρισης στα αιμοποιητικά μέλη της οικογένειας κυτοκινών των θηλαστικών. Οι αιματοποιητίνες ασκούν ισχυρή βιολογική επίδραση στην ενεργοποίηση εξειδικευμένων υποδοχέων, οι οποίοι μπορούν να διαχωριστούν σε πέντε υπο-ομάδες με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά και το μέλος STAT που ενεργοποιούν. Ένας αριθμός υποδοχέων κινάσης τυροσίνης και πρωτεϊνικών-ζευγών G-υποδοχέων έχει επίσης αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν τους STAT μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά ο ρόλος αυτών των

μηνυμάτων αμφισβητείται ακόμα. Όταν οι αιμοποιητίνες προσδένουν τους διμερείς υποδοχείς τους, υπόκεινται σε μια αλλαγή διαμόρφωσης, η οποία οδηγεί στη στρατολόγηση των υποδοχέων που σχετίζονται με τους JAK (**Εικόνα 8**) (Tammy και συν. 2000). Στη συνέχεια, οι JAK ενεργοποιούν ο ένας τον άλλο, μέσω φωσφορυλίωσης εξειδικευμένων υποδοχέων με μοτίβα τυροσίνης. Οι STAT και άλλα μόρια μηνυματοδότησης, που αναγνωρίζουν αυτά τα μοτίβα, στρατολογούνται στους υποδοχείς τυπικά μέσω των SH2 επικρατειών τους και έπειτα αυτο-ενεργοποιούνται με ένα JAK-εξαρτώμενο γεγονός φωσφορυλίωσης μέσω τυροσίνης. Η στρατολόγηση μοναδικών ζευγαριών STAT σε κάθε υπο-οικογένεια υποδοχέων αποτελεί σημαντικό βήμα στον καθορισμό της ιδιομορφίας της υποκείμενης βιολογικής απόκρισης.

Μετά την ενεργοποίησή τους, οι STAT απελευθερώνονται από τον υποδοχέα και στη συνέχεια μέσω μιας αμοιβαίας φωσφορυλίωσης από τυροσίνη της SH2 επικράτειας διμερίζονται («κλαστικός διμερισμός») (Chen και συν., 1998). Μόνο οι STAT με την κλασική ενεργοποίηση και τον κλασικό διμερισμό είναι ικανοί για την ταχύτατη πυρηνική μετατόπιση και πρόσδεση στο DNA. Αν και μελέτες που αφορούν στη δομή μας δίνουν μια λεπτομερή περιγραφή στο πώς τα STAT διμερή προσδένονται στο DNA, το δομικά μοτίβα που ρυθμίζουν την πυρηνική μετατόπιση δεν είναι πλήρως κατανοητά (Chen και συν. 1998)

Μέσα στον πυρήνα, τα περισσότερα STAT διμερή αναγνωρίζουν και προσδένουν τους ενισχυτές της γ -ενεργοποιούμενης πλευράς (GAS) (Kisseleva και συν. 2002, Decker και συν. 1997), αν και το STAT-1-STAT-2 ετεροδιμερές – το οποίο σχηματίζεται ως απόκριση στην ενεργοποίηση από τις IFN τύπου I – παρουσιάζει μια μοναδική συγγένεια με μια ξεχωριστή οικογένεια ενισχυτών (Decker και συν. 1997, Kisseleva και συν. 2002). Μέσα σε ώρες, τα σήματα τα οποία υποκινήθηκαν από αιμοποιητίνες αποσυντίθενται και οι STAT εξάγονται πίσω στο κυτταρόπλασμα, μέσω μιας διαδικασίας η οποία απαιτεί την αποφωσφορυλίωση της STAT από την Crm1/Ran-GTPase (McBride και συν. 2000).

Μερικοί ενεργοποιημένοι STAT μπορεί επίσης να υπόκεινται σε στοχευμένη αποδόμηση (Wang και συν. 2000). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η κύρια κυτταροπλασματική εντόπιση των STAT βρίσκεται σε ήρεμα κύτταρα, όπως συμβαίνει με την ισορροπία στη βασική πυρηνική εισαγωγή και εξαγωγή (Schindler και συν. 2002). Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, οι STAT μπορεί να είναι ικανοί να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση ακόμα και όταν απουσιάζει η κλασική μηνυματοδότηση (Kumar και συν. 1997).

Δ.2. Εισαγωγή για STAT

Οι πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής (STAT) είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος των κυτοκινών, των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων έτσι ώστε να μεσολαβήσουν σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών στις οποίες περιλαμβάνονται η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η απόπτωση (Darnell 1997, O'Shea και συν. 2013). Επτά μέλη της STAT οικογένειας έχουν εντοπιστεί: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5α, STAT-5β και STAT-6. Οι ακριβείς χρωμοσωμικοί τόποι των STAT γονιδίων στον άνθρωπο εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (O'Shea και συν. 2013). Αρκετές περιοχές είναι συντηρητικές σε όλους τους STAT (**Πίνακας 8**) (Chen και συν. 1998, Becker και συν. 1998).

Οι STAT ισομορφές στις οποίες λείπουν μέρη στην καρβοξυτελική (COOH) περιοχή (STATβ) φαίνεται να κατέχουν έναν ανταγωνιστικό κυρίαρχο αρνητικό (DN) ρόλο, έναντι της πλήρους μήκους ισομορφής, STATα (Chakraborty και συν. 1996). Οι μεταγραφικές δραστηριότητες των διαφόρων ισομορφών είναι διαφορετικές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ισορροπία αυτών των ισομορφών ρυθμίζει την ενεργοποίηση του γονιδίου (O'Shea και συν. 2013), που οδηγεί σε διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις (**Πίνακας 8**). Οι STATβ αν και στερούνται του καταλοίπου τυροσίνης στη θέση 699 έως 705 μπορούν ακόμα να στρατολογηθούν στους φωσφορυλιωμένους από τυροσίνη υποδοχείς των πρωτεϊνών μέσω των επικρατειών SH2, αλλά η STAT μηνυματοδότηση τερματίζεται. Οι STATβ ισομορφές παράγονται είτε από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA (Chakraborty και συν. 1996) είτε από πρωτεολυτική διαδικασία (Azam και συν. 1997). Ο χαρακτηρισμός αυτής της πρωτεολυτικής δραστηριότητας αποκάλυψε μια ενδοπεπτιδάση σερίνης ικανή για τη διάσπαση τόσο της STAT-3 όσο και της STAT-5, αλλά όχι της STAT-6 (Xia και συν. 2001). Μια πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι η καθεψίνη G είναι μια STAT-5 πρωτεάση και υποστηρίζει ότι τα καρβοξυτελικά κωλοβά STAT-5 ήταν στην πραγματικότητα ένα προϊόν που παράγεται σε *in vitro* πειράματα δεν έχει καμιά *in vivo* σημασία (Schuster και συν. 2007). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί αυτή η διαμάχη (Benekli 2009).

Πίνακας 8. Δομή των STAT.	
<i>Επικράτεια</i>	<i>Λειτουργία</i>
Ολιγομερισμού	Μεσολαβεί στον ολιγομερισμό των STAT διμερών προς σχηματισμό τετραμερών και αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες
Σύνδεσης στο DNA	Μεσολαβεί στα απομακρυσμένα μηνύματα για ειδικούς συνδέτες για να ορίσει την ειδικότητα σύνδεσης στο DNA
SH2	Μεσολαβεί στις ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ STAT υποδοχέων, JAK-STAT και STAT-STAT
Καρβοξυτελική (-COOH)	Ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα των STAT και παρέχει την λειτουργική ειδικότητα
Κατάλοιπο τυροσίνης	Πλευρά φωσφορυλίωσης στην -COOH επικράτεια, περίπου 700 αμινοξέα από το αμινικό (NH ₂ -) άκρο, ελέγχει ενεργότητα πρόσδεσης στο DNA
Κατάλοιπο σερίνης	Μια δεύτερη πλευρά φωσφορυλίωσης στο -COOH άκρο, δεν υπάρχει στην STAT-2 και στην STAT-6

Δ.3. Γενικά για STAT-1 πρωτεΐνη

Η STAT-1 πρωτεΐνη ήταν το πρώτο μέλος της πολυγονιδιακής οικογένειας ο οποίος ανακαλύφθηκε ως ο αρχικός στόχος ενεργοποίησης της ιντερφερόνης (IFN) τόσο του τύπου I όσο και του τύπου II (Darnell και συν., 1994, Ihle και Kerr, 1995). Η σημαντική εξέλιξη προς την κατανόησή μας για τον ρόλο της STAT-1 στην κυτταρική φυσιολογία περιλαμβάνει δημιουργία είτε STAT-1^{-/-} ποντίκια που εκφράζουν μια κολοβή πρωτεΐνη-δηλαδή λειτουργικά μειωμένη πρωτεΐνη- (Meraz και συν. 1996) είτε ποντίκια που στερούνται STAT-1 έκφρασης (Durbin και συν. 2000). Οι συγγραφείς αυτοί έδειξαν ότι ποντίκια με ανεπάρκεια STAT-1 έχουν χάσει την απόκρισή τους και στους δύο τύπους IFN και απέκτησαν αυξημένη ευαισθησία σε βακτηριακούς και ιογενείς παθογόνους παράγοντες. Μέσω αυτών των πειραμάτων, επιβεβαιώθηκε ο πρωτογενής φυσιολογικός ρόλος της STAT-1 στη μεσολάβηση σε αντι-ιικές και ανοσιακές επιδράσεις των IFN (Darnell και συν. 1994). Έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός της STAT-1 λειτουργίας στο πλαίσιο της άμυνας του ανοσοποιητικού περιλαμβάνει την επαγωγή ανοσιακών γονιδίων, π.χ. MHC, IRF1, FcγRI, κ.λπ. Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές σχετικά με το ρόλο της STAT-1 στη διατήρηση ανοσιακής

αυτο-αντοχής (Nishibori και συν. 2004) καθώς και ευρήματα στα οποία η STAT-1 ρυθμίζει τις φλεγμονές των αρθρώσεων σε πειραματικά μοντέλα (de Hooge και συν. 2004) δείχνουν ότι αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας δραστηριοποιείται στην ευρύτερη επίπεδο της ανοσιακής ομοιόστασης από ότι αρχικά του αναγνωρίστηκε.

Τόσο η STAT-1 πρωτεΐνη όσο και η STAT-2, ως οι κύριοι μεσολαβητές των βιολογικών επιδράσεων των ιντερφερονών IFN-α και IFN-γ, σκιαγραφούν ένα σημαντικό μοριακό μηχανισμό που ελέγχει την κυτταρική αύξηση και απόπτωση. Πολλά στοιχεία που συγκεντρώθηκαν από STAT-1-ελλιπή κυττάρια *in vitro* (Durbin και συν. 1996, Meraz και συν. 1996) καθώς και από ποντίκια που στερούνται το STAT-1 γονίδιο (Bromberg και συν. 1996; Kumar και συν. 1997, Ramana και συν. 2000) έφεραν σαφείς ενδείξεις ότι η STAT-1 ενεργοποίηση από συνδέτες IFN κυριαρχεί σε προ-αποπτωτικά και αντι-πολλαπλασιαστικά γεγονότα. Τα στοιχεία που παρουσιάζονται από τους Lee και συν. (2000b) έχουν δείξει ότι η επιβίωση των λεμφοκυττάρων, ο πολλαπλασιασμός και η αντίδραση σε ερεθίσματα θανάτου απαιτούν επίσης μεταγραφικά ενεργή STAT-1, αλλά η ενεργοποίηση της στην περίπτωση αυτή φαίνεται να εξαρτάται μόνο από την IFN μηνυματοδότηση. Η παρατήρηση ότι ανεξάρτητα των IFN, η STAT-1 μπορεί να ενεργοποιηθεί από την IL-4 και ότι απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης από κυτοκίνες (Chang και συν. 2000) καθώς και στοιχεία που αποδεικνύουν τη σημασία της STAT-1 στο σχηματισμό των οστών (Takayanagi και συν. 2002).

Δ.3.1. Δομή της STAT-1 πρωτεΐνης

Τα επτά διαφορετικά μέλη της οικογένειας STAT κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια. Παρά τις λειτουργικές διαφορές σε μεμονωμένους STAT παράγοντες, μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Vinkemeier και συν. 1998) και σύγκριση πρωτεϊνικών ακολουθιών αποκάλυψαν συντηρητικές επικράτειες στους STAT παράγοντες, κάθε μια εκ των οποίων έχει επιτακτική λειτουργία για την ενεργοποίηση της STAT.

Η STAT-1 πρωτεΐνη αποτελείται από 750 αμινοξέα και το μέγεθός της είναι 91kDa (Horvarth και συν. 1995). Σημειώνεται ότι η STAT-1 έχει τη φυσική συρραμμένη μορφή (STAT-1β) στην οποία λείπει η συντηρητική σερίνη 727 αλλά όχι η συντηρητική τυροσίνη 701 στην καρβοξυτελική μεταγραφική επικράτεια. Η STAT-1β έχει αναφερθεί να λειτουργεί ως κυρίαρχος αρνητικός καταστολέας έναντι στην

πλήρους μήκους STAT-1α. Η αμινοτελική επικράτεια της STAT-1 κυμαίνεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 1 και 135. Αν και δεν υπάρχει συγκεκριμένη έρευνα της αμινοτελικής επικράτειας της STAT-1, ωστόσο είναι εξαιρετικά συντηρητική, εμπλέκεται σε δια-πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και είναι απαραίτητη στην αλληλεπίδραση διμερών (Leaman και συν. 1996), τα οποία και απαιτούνται για τη διευκόλυνση του σχηματισμού τετραμερών ή ολιγομερών STAT. Το τετραμερές συμβάλλει στη σταθεροποίηση της STAT-DNA σύνδεσης, αυξάνοντας έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα.

Η περιοχή της STAT μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 136 και 137, περιλαμβάνεται από επικράτεια τεσσάρων, περιελιγμένων σαν πηνία, έλικων (Schindler και συν. 2007). Αυτή η επικράτεια βρέθηκε ότι συνδέεται με έναν αριθμό δυνητικά σημαντικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των N-myc πρωτεϊνών (Nmi-1), οι οποίες ενισχύουν την CBP στρατολόγηση αυξάνοντας έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα (Matikaninen και συν. 1999). Η επικράτεια μέσω της οποίας συνδέεται με το DNA, βρίσκεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 318 και 488 και είναι δομικά ομόλογη με την αντίστοιχη όμοια επικράτεια της ανοσοσφαιρίνης. Αυτή η επικράτεια επίσης εμπεριέχει πολλές β-πτυχωτές επιφάνειες οι οποίες είναι αναδιπλωμένες όπως εκείνες που βρέθηκαν και στις επικράτειες σύνδεσης στο DNA των μεταγραφικών παραγόντων p53 ή NF-κB (Schindler και συν. 2007).. Η σύνδεση στο DNA, η οποία είναι ειδική για κάθε STAT, προσδιορίζεται από αυτή την επικράτεια (**Εικόνα 9**).

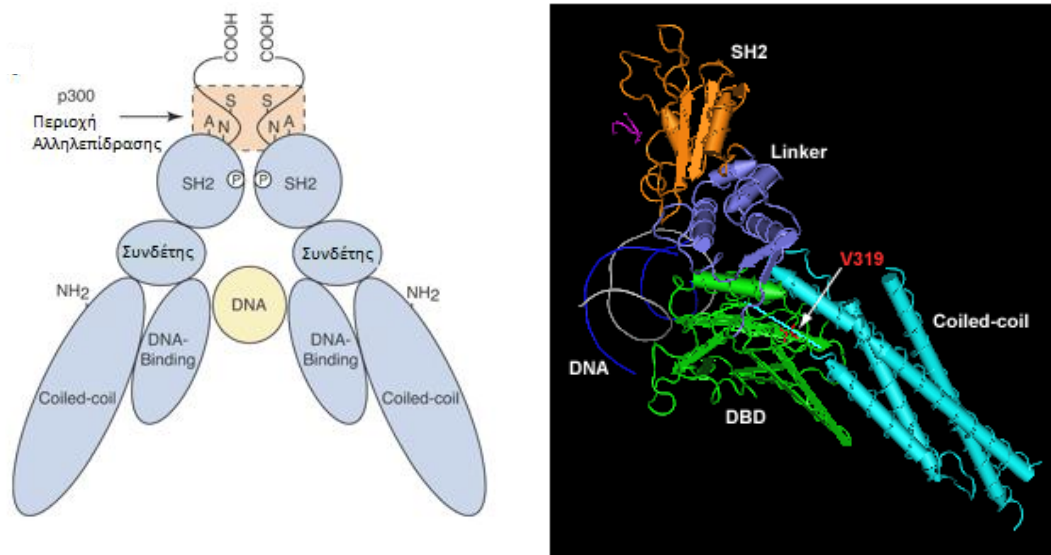
Ως επί το πλείστον, η επικράτεια σύνδεσης που έχει μορφή α-έλικας και βρίσκεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 489 και 576, διαχωρίζει την επικράτεια σύνδεσης στο DNA από την SH2 επικράτεια (Levy και Darnell, 2002). Μεταλλάξεις στο ενδιάμεσο αυτής της συγκεκριμένης επικράτειας επιδρούν στη σταθερότητα σύνδεσης με το DNA, οδηγούν στον ταχύ ρυθμό διακοπής της σύνδεσης με το DNA και επομένως και στην ανικανότητα ενεργοποίησης γονιδίων μετά από διέγερση με IFN-γ (Levy και Darnell, 2002). Αυτή η επικράτεια σύνδεσης είναι απαραίτητη για την πυρηνοκυτταροπλασματική ανακύκλωση, μιας που η αλκυλίωση ενός μόλις καταλοίπου κυστεΐνης παρεμποδίζει την ανεξάρτητη από κυτοκίνες μετατόπιση της STAT-1 στον πυρήνα (Reich 2013).

Η SH2 επικράτεια μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 577 και 685 είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση της STAT-1 στους φωσφορυλιωμένους από τυροσίνη υποδοχείς καθώς και για τις αμοιβαίες φωσφορυλιώσεις της SH2 από

αλληλεπιδράσεις σε θέσεις τυροσίνης των μονομερών STAT-1 για το σχηματισμό διμερών. Σε πειραματικά μοντέλα αποδείχθηκε ότι μεταλλάξεις σε αυτήν την επικράτεια μπορεί να οδηγούν στη φωσφορυλίωση, στο διμερισμό, τη συσσώρευση στον πυρήνα και την πρόσδεση στο DNA αλλά δεν επιτρέπουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής (Poat και συν. 2010).

Η καρβοξυτελική μεταγραφική επικράτεια ενεργοποίησης (TAD) βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 684 και 750 και εμπλέκεται στην επικοινωνία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συν-ενεργοποιητές (Varinou και συν. 2003). Ενώ οι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα απολύτως κατανοητοί, πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στη γονιδιακή ρύθμιση φαίνεται να σχετίζονται με την STAT-1 μέσω TAD.

Η φωσφορυλίωση της 701 τυροσίνης εντός της TAD επικράτειας είναι απαραίτητη για τον διμερισμό της STAT-1 πρωτεΐνης, την πυρηνική μετατόπιση και τη σύνδεση στο DNA. Επιπροσθέτως, η φωσφορυλίωση της σερίνης 727 εντός της επικράτειας TAD φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για τη μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα της STAT-1 (Bancerek και συν. 2013). Φαίνεται ότι η μεταλλαγμένη STAT-1 στη σερίνη 727 έχει μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα κατά 20% και αποτυγχάνει να στρατολογήσει μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές. Οι πρόσφατα ανακαλυφθέντες παράγοντες που συνδέονται στην TAD επικράτεια της STAT-1 είναι οι CREB συνδετικές πρωτεΐνες (CBP/p300) -οι οποίες ανήκουν στις ακετυλοτρανφεράσες ιστονών -, οι MCM5 και BRCA1 (Korzus και συν. 1998). Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό των ρόλων αυτών των πρωτεϊνών ως μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών της STAT-1 (Korzus και συν. 1998).



Εικόνα 9. Επικράτεια σύνδεσης στο DNA (Zhang και συν. 2005) της p-STAT-1 και κρυσταλλογραφική μορφή (mutagenetix.scripps.edu).

Δ.3.2. Βιολογία της STAT-1 πρωτεΐνης

Πολλές από τις ρυθμιστικές λειτουργίες της STAT-1 για το ανοσοποιητικό μπορούν να εξηγηθούν με βάση το ρόλο του στην διαμεσολάβηση στις αντιδράσεις των IFN. Πειράματα γονιδιακής στόχευσης (Lionel 2004), αποδεικνύουν ότι ο πρωταρχικός ρόλος της STAT-1 *in vivo* είναι η μεσολάβηση στην IFN μηνυματοδότηση, διότι αποκρίσεις σε άλλες κυτοκίνες, οι οποίες ενεργοποιούν την STAT-1, φαίνεται να διατηρούνται ακόμα και σε STAT-1-ελλιπή ποντίκια. Η STAT-1 ανεπάρκεια οδήγησε στην αυξημένη ευαισθησία στις ιογενείς λοιμώξεις και οδηγεί επίσης σε μια ανικανότητα χειρισμού λοιμώξεων από ενδοκυτταρικά παθογόνα (O'Shea και συν. 2013). Η STAT-1 μεσολαβεί σε αντι-ιικές και σε αντιφλεγμονώδεις δράσεις των IFN μέσω της επαγωγής των ανοσοδραστικών και φλεγμονωδών γονιδίων, όπως το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC), το costimulatory μόριο, οι χημειοκίνες, το συμπλήρωμα, η IRF1, η συνθετάση του οξειδίου του αζώτου (iNOS) και τα FcγRI γονίδια (O'Shea και συν. 2013). Επιπροσθέτως, η STAT-1 μεσολαβεί στα αντι-πολλαπλασιαστικά και προ-αποπτωτικά μονοπάτια των IFN, γεγονός που υποδηλώνει ότι η STAT-1 έχει επίσης τη δυνατότητα να περιορίσει τη φλεγμονή (O'Shea και συν. 2013). Επιπλέον, επιμόλυνση ενός STAT-1-ελλιπούς ποντικού με ένα εξασθενημένο στέλεχος γρίπης οδηγεί σε χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση των πνευμόνων που καταλήγει στο θάνατο, παρά τη φυσιολογική κάθαρση του ιού. Επιπλέον, STAT-1-null ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία

σε πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα και αυξημένη σοβαρότητα στην αρθρίτιδα, γεγονός που υπονοεί έναν ρόλο της STAT-1 *in vivo*, στην καταστολή ορισμένων αυτοάνοσων διαταραχών.

Αυτοί οι αντιτιθέμενοι ρόλοι της STAT-1 είναι σύμφωνοι με ένα παράδειγμα ομοιοστατικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος στην οποία μόρια που επάγουν την κυτταρική ενεργοποίηση και τη λειτουργική ενεργότητα, έχουν επίσης ένα ρόλο στον περιορισμό της απόκρισης έτσι ώστε να αποφεύγεται υπερβολική ενεργοποίηση και αυτοανοσία. Η STAT-1 είναι επίσης σημαντική σε αποκρίσεις ξενιστή και ως αντικαρκινικός παράγοντας. Οι ενδογενείς STAT-1 λειτουργίες, οι οποίες παίρνουν μέρος στο σύστημα καταστολής του όγκου, διαμορφώνουν τον ανοσογενετικό φαινότυπο των αναπτυσσόμενων όγκων, φαινόμενο που ονομάζεται «ανοσοεπιτήρηση του καρκίνου». Εκτός από την σαφή ρόλο της στη διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης, η STAT-1 διαθέτει επίσης μη-ανοσοποιητικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση του σχηματισμού των οστών και η καταστροφή αυτών υπό ομοιοστατικές και παθολογικές καταστάσεις (Ivashkin και Hu 2004). Η δράση της STAT-1 στα οστά είναι πολύπλοκη, διότι μειώνει τόσο το σχηματισμό των οστεοκλαστών όσο και τη διαφοροποίησή τους σε οστεοβλάστες. Η αύξηση στην οστική μάζα σε STAT-1-ελλειπή ποντίκια δείχνει ότι κατά τη διάρκεια της ομοιόστασης η δράση της STAT-1 στις οστεοβλάστες είναι πιο σημαντική από ό, τι η δράση της STAT-1 στις οστεοκλάστες (Ivashkin και Hu 2004).

Δ.4. IFN-εξαρτώμενη μηνυματοδότηση

Δ.4.1 Ρόλοι της STAT-1 πρωτεΐνης στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Η φλεγμονώδης απόκριση ρυθμίζεται αυστηρά και από θετικά και από αρνητικά σήματα, όπου τελικά οργανώνεται από διάφορες προ- και αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και μεσολαβητές. Απώλεια της ισορροπίας, οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως ελαττωματική φλεγμονώδης απόκριση ή χρόνια φλεγμονή (Regis και συν. 2008). Επιπλέον, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου, με αποτέλεσμα η ένταση και η διάρκεια των φλεγμονωδών αντιδράσεων να επηρεάζουν την ανάπτυξη ευνοϊκού μικροπεριβάλλοντος για νεοπλασματικό μετασχηματισμό και ανάπτυξη (Hun και συν. 2006).

Η STAT-1 ενεργοποίηση, ελεγχόμενη κυρίως από τις IFN, λειτουργεί ως προ-φλεγμονώδης παράγοντας άμεσα, μέσω επαγωγής αποπτωτικών γεγονότων και

έμμεσα, μέσω επαγωγής ενός αριθμού γονιδίων τα οποία ευνοούν την ενεργοποίηση και τη στρατολόγηση των ανοσιακών κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής. Η STAT-1 ενεργοποίηση από τις IFN τύπου I και II επίσης επάγει την αντιγονοπαρουσίαση τόσο μέσω ενίσχυσης της επεξεργασίας αντιγόνων όσο και με την υπερ-έκφραση των MHC μορίων τάξης I και II.

Η σημασία της STAT-1 στην IFN- γ και IFN- α/β σηματοδότηση έχει σαφώς διευκρινιστεί από μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές και STAT-1-ελλιπή ποντίκια. Τα STAT-1 knockout ποντίκια δείχνουν μεγάλη ευαισθησία σε μικροβιακές και ιϊκές μολύνσεις και στο σχηματισμό όγκων εξαιτίας της κατάργησης πολλών γνωστών IFN-επαγόμενων γονιδίων. Ενώ η IFN- γ επάγει τον ομοδιμερισμό της STAT-1, η IFN- α/β διεγείρει κυρίως τον ετεροδιμερισμό της STAT-1, ο οποίος σχετίζεται με p48/ISGF3/IRF9 για να δημιουργήσει το σύμπλοκο μεταγραφικού παράγοντα ISGF3 (Ivashkin και Hu 2004).

Ο IFN- γ υποδοχέας αποτελείται από δύο διαφορετικές α - και β -υπομονάδες οι οποίες σχετίζονται με δύο κινάσες τυροσίνης, JAK. Η α -υπομονάδα (IFN γ R1), που εμπλέκεται στην IFN- γ πρόσδεση, σχετίζεται με την JAK1 και η β -υπομονάδα (IFN γ R2), που είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή σήματος, σχετίζεται με την JAK2. Η πρόσδεση της IFN- γ στον υποδοχέα επάγει το διμερισμό των α - και β -υπομονάδων, όπως επίσης και την ενεργοποίηση των σχετιζόμενων JAK μέσω αμοιβαίας φωσφορυλίωσης. Στη συνέχεια οι JAK φωσφορυλιώνουν σε κατάλοιπα τυροσίνης τον υποδοχέα της κυτταροπλασματικής επικράτειας, η οποία παρέχει το STAT-1 σημείο πρόσδεσης. Εν συνεχεία, λανθάνουσα κυτταροπλασματική STAT-1 πρωτεΐνη προσδένεται στους υποδοχείς μέσω SH2-φωσφοτυροσινικών αλληλεπιδράσεων. Ενώ ενώνεται με τους υποδοχείς, η STAT-1 φωσφορυλιώνεται στη συντηρητική 701 τυροσίνη από τις JAK, όπου και επιτρέπεται η δημιουργία του διμερούς.

Το STAT-1 διμερές φωσφορυλιώνεται περαιτέρω στη συντηρητική σερίνη 727, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενεργού μεταγραφικού παράγοντα. Το STAT-1 διμερές μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται στο DNA σε υποκινητές που περιέχουν GAS ακολουθία (IFN-ενεργό άκρο) και ρυθμίζει την έκφραση στοχευμένων γονιδίων.

Σε απόκριση στην IFN- γ διέγερση, παράγεται επίσης το ομοδιμερές για την πρόσδεση στο DNA, STAT-1 β . Αυτό το ομοδιμερές δεν περιέχει τα τελευταία 38 καρβοξυ-τελικά αμινοξέα, τα οποία:

(1) είναι μοναδικά για την STAT-1 α

(2) περιέχουν όλη την πληροφορία που είναι απαραίτητη για την επικοινωνία με το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης και

(3) πιθανόν αντιπροσωπεύουν μια περιοχή η οποία είναι σημαντική για την στρατολόγηση ειδικών για γονίδια και γενικών μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών.

Ο IFN- α/β υποδοχέας αποτελείται επίσης από δύο υπομονάδες, IFN α R1 και IFN α R2, οι οποίες και αυτές σχετίζονται με JAK. Η IFN α R1 σχετίζεται με την Tyk2 και η IFN α R2 με την JAK1. Η πρόσδεση της IFN- α στον υποδοχέα της επάγει το διμερισμό των δύο υπομονάδων και την ενεργοποίηση σχετιζόμενων JAK μέσω αμοιβαίας φωσφορυλίωσης της Tyk2 και της JAK1. Οι JAK τότε φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα στην κυτταροπλασματική επιφάνεια πάνω σε κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία παρέχουν μια περιοχή πρόσδεσης για STAT-2. Η STAT-2 τότε προσδένεται στον υποδοχέα, στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από JAK στην τυροσίνη 690 και ευνοείται έτσι η πρόσδεση της STAT-1 στον υποδοχέα. Η STAT-1 στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο τυροσίνης 701 από JAK, οι οποίες επιτρέπουν την απελευθέρωση του ετεροδιμερούς STAT-1/STAT-2 και την σύνδεσή του με τον παράγοντα p48/ISGF3/IRF9 για τη δημιουργία του συμπλόκου μεταγραφικών παραγόντων ISGF3. Αυτό το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα και προσδένεται στον υποκινητή γονιδίων που περιέχουν την ISRE αλληλουχία (IFN- α stimulated gene response element) ρυθμίζοντας την έκφραση αυτών των γονιδίων. Η STAT-2 είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του ISGF3 συμπλόκου μεταγραφικών παραγόντων. Αυτό φάνηκε από πειράματα στα οποία η ανεπάρκεια της STAT-2 έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλίωσης της STAT-1 στην τυροσίνη καθώς και τη μείωση της ενεργοποίησής του. Ακολουθώντας την IFN- α διέγερση, η STAT-1 μπορεί επίσης να δημιουργήσει ετεροδιμερές με την STAT-3 ή ομοδιμερές με την STAT-1 γεγονός το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της GAS αλληλουχίας στην περιοχή του υποκινητή (Ivashkin και Hu 2004).

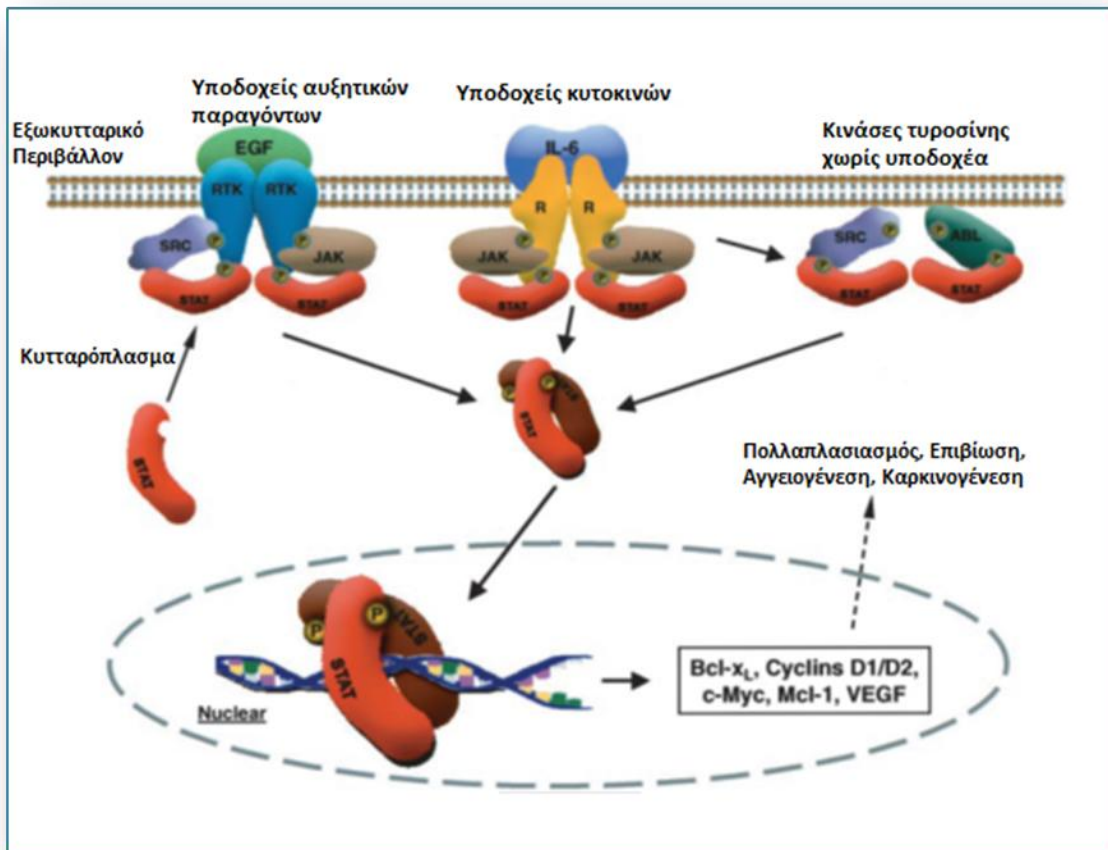
Δ.4.2. Ρόλοι της STAT-1 πρωτεΐνης στη μηνυματοδότηση ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες

Η STAT-1 έχει εμπλακεί ως μεσολαβητής σε βιολογικές αποκρίσεις σε μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, βασιζόμενος σε εξαρτώμενη από συνδέτη φωσφορυλίωση τυροσίνης και ενεργοποίηση. Ωστόσο οι παρατηρήσεις αυτές από μόνες τους δεν αποδεικνύουν ότι η STAT-1 είναι απαραίτητη στη μεταγωγή σήματος. Οι JAK1, STAT-1 και STAT3 φωσφορυλιώνονται σε απόκριση

στον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF). Επιπλέον, η JAK1 δεν ευθύνεται ούτε για την ενεργοποίηση STAT ούτε για την επαγωγή του γονιδίου c-fos (Leaman και συν. 1996). Η STAT-1 ενεργοποίηση σε ανενεργά JAK2 και Tyk2 κύτταρα ως απόκριση στον EGF είναι φυσιολογική. Σε κύτταρα επιμολυσμένα με μεταλλαγμένο EGF υποδοχέα (χωρίς κινάση), δεν υπάρχει STAT ενεργοποίηση σε απόκριση στον EGF υποδοχέα και το c-fos δεν επάγεται. Αυτό δείχνει ότι η ενεργότητα της κινάσης είναι άμεσα ή έμμεσα απαραίτητη για τις δύο αυτές αποκρίσεις (Leaman και συν. 1996). Cell-free μελέτες έδειξαν επίσης ότι η ενεργοποίηση της STAT-1 επιβάλλει την ενεργοποίηση της MAP κινάσης και την επαγωγή του c-fos για να αλληλεπιδράσει άμεσα με τον υποδοχέα PDGF (Vignais και Gilman, 1999). Αυτές αλλά και άλλες μελέτες, όπως επίσης και οι φαινότυποι των STAT-1 ενενεργών ποντικών μπορεί να δείξουν ότι η STAT-1 δεν έχει κυρίαρχο ρόλο στις αποκρίσεις με αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες.

Δ.4.3. STAT-1 και διασταυρωτή σηματοδότηση

Ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα της φωσφατάσης της τυροσίνης, Shp1, και η IFN- α/β προωθεί περισσότερο τον ομοδιμερή σχηματισμό της STAT-1 και τη μεταγραφή του μέσω GAS επικράτειας από IFN- γ (Min και συν. 1998). Υπερέκφραση της Shp1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα καταστέλλεται από την IFN- α/β σηματοδότηση μέσω GAS επικράτειας, προτείνοντας ότι τα επίπεδα της Shp1 μπορούν να ρυθμιστούν από τη διασταύρωση των μηνυματοδοτικών μονοπατιών IFN- α/β και IFN- γ (Min και συν. 1998). Η διέγερση των NIH3T3 ινοβλαστών από PDGF έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και πυρηνική μετατόπιση της STAT-1 αλλά τα IFN- γ ρυθμιζόμενα μονοπάτια δεν επάγονται (Silvennoinen και συν. 1993). Ωστόσο, η διέγερση του αυξητικού παράγοντα μεταλλαγμένου PDGF υποδοχέα, μέσω του οποίου εκφράζει μόνο το RAS/GAP σημείο πρόσδεσης (771 τυροσίνη), προωθεί την επαγωγή των IFN- γ -αποκρινόμενων κυττάρων και όχι τα διάμεσα πρώιμα γονίδια (Fambrough και συν. 1999). Ο Shp2 είναι ένας θετικός ρυθμιστής της PDGF μηνυματοδότησης, ένας αρνητικός ρυθμιστής της JAK-STAT μηνυματοδότησης και είναι υποψήφιος για την τροποποίηση της αναμετάδοσης σήματος ενζύμων που συμμετέχουν στη διασταυρωτή σηματοδότηση.



Εικόνα 10. Γενικός μηχανισμός μηνυματοδοτικών μονοπατιών της STAT-1 που οδηγεί σε ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Buettner και συν. 2002).

Δ.5. Ρύθμιση της STAT-1 μηνυματοδότησης

Η διάρκεια και ο βαθμός της STAT-1 μηνυματοδότησης (Εικόνα 10) γίνεται υπό αυστηρή ρύθμιση (θετική και αρνητική) μέσω μιας σειράς πολύπλοκων ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι σε ένα μεγάλο βαθμό εξαρτώνται από μετα-μεταφραστικές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η ενεργότητα της STAT-1 πρωτεΐνης μπορεί επίσης να υποστεί διασταυρωτή ρύθμιση και από άλλους STAT παράγοντες.

Δ.5.1. Θετική ρύθμιση της STAT-1 μηνυματοδότησης

Παρά το γεγονός ότι μεγάλη προσοχή έχει επικεντρωθεί στα αρνητικά ρυθμιστικά μονοπάτια της JAK-STAT μηνυματοδότησης, γίνεται όλο και πιο εμφανές ότι η επαγωγή σήματος από κυτοκίνες μπορεί επίσης να τροποποιείται και θετικά (Εικόνα 11). Η IFN- γ μηνυματοδότηση ρυθμίζεται θετικά από προηγούμενη

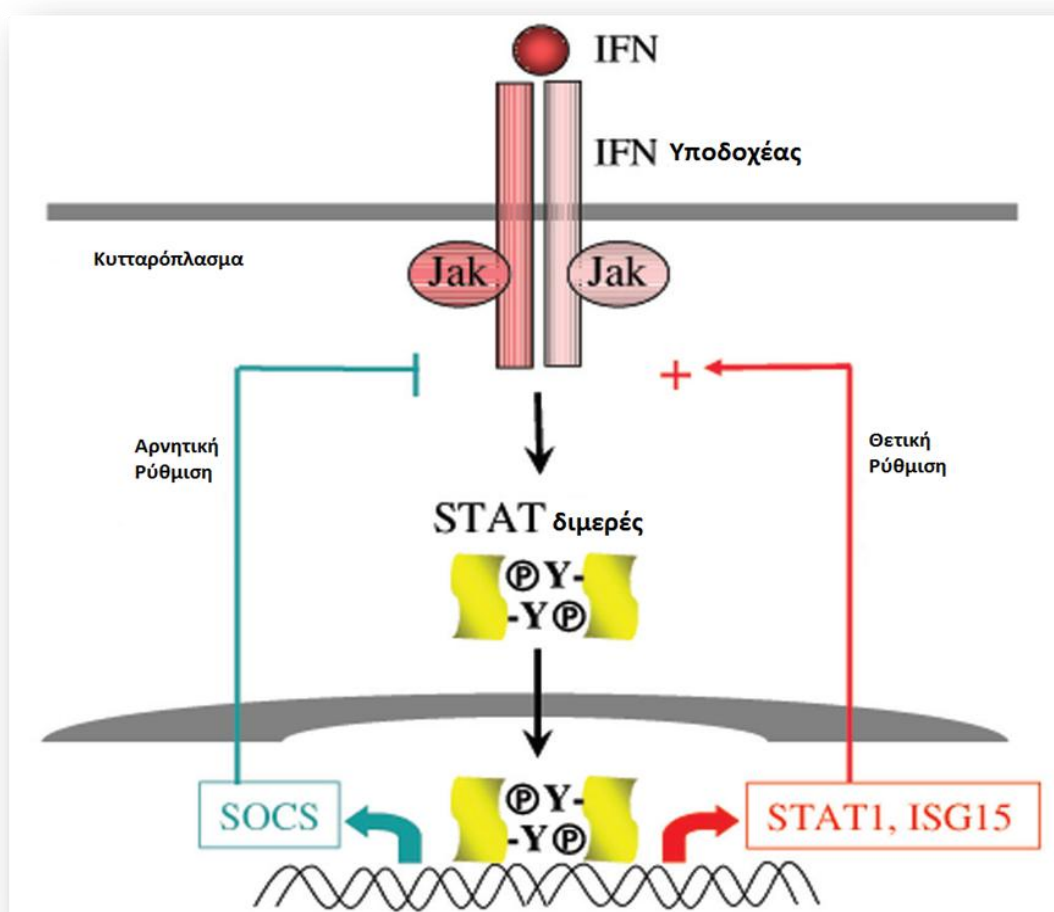
έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις IFN τύπου I (IFN- α/β). Ο μηχανισμός της διέγερσης της IFN- γ μηνυματοδότησης από υποδοχέα IFN τύπου I εξαρτάται από τα χαμηλά επίπεδα της IFN- α/β μηνυματοδότησης, η οποία οδηγεί σε σύνδεση μεταξύ δύο ανεξάρτητων προσδετών συνδετικών μονάδων υποδοχέων, IFN α R1 και IFN γ R2 και αυξημένου διμερισμού στην φωσφορυλίωση από τυροσίνη της STAT-1 (Ivashkin και Hu 2004).

Ευαισθησία στην IFN- γ μηνυματοδότηση διαμεσολαμβάνεται από διαρκή αύξηση της STAT-1 έκφρασης που προκαλείται από χαμηλές συγκεντρώσεις IFN- γ που δεν ασκούν αποτελεσματική αναστολή ανατροφοδότησης από SOCS πρωτεΐνες. Η IFN- γ είναι σημαντικός επαγωγέας μακροφάγων και ευαισθητοποίηση στην IFN- γ μηνυματοδότηση μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική στην επίτευξη της πλήρους ενεργοποίησης των μακροφάγων στα αρχικά στάδια ανοσιακής απόκρισης, όταν τα επίπεδα της IFN- γ είναι χαμηλά. Ένα άλλο παράδειγμα τέτοιας θηλειάς θετικής αυτορύθμισης είναι η επαγωγή του IFN-επαγόμενου γονιδίου 15 (ISG15) από τις IFN και η θετική ρύθμιση της IFN μηνυματοδότησης από την IFN επαγόμενη ISG15 (Ivashkin και Hu, 2004). Η ISG15 είναι μια μικρή πρωτεΐνη ομόλογη της ουβικουΐτινης, μπορεί να ενώνεται με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σε μια διαδικασία που ονομάζεται ISGylation και η ISGylation με τη σειρά της να ενισχύει σημαντικά την IFN επαγόμενη JAK-STAT μηνυματοδότηση (**Εικόνα 11**).

Δύο έως και πεντακόσια γονίδια ενεργοποιούνται σε απόκριση στις IFN (Boehm και συν. 1998) συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων, όπως IRF1, οι οποίοι διατηρούν τη μεταγραφική απόκριση. Η STAT-1 συνδέεται με μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές CBP, p300, pCIP, MCM-5, Nmi και BRCA1 (Ouchi και συν. 2000). Οι CBP και p300 σχετίζονται με πρωτεΐνες που δρουν ως συν-ενεργοποιητές για πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες (Shikama και συν. 1997). Το CBP/p300 σύμπλοκο εξυπηρετεί σημαντικές λειτουργίες ως ακετυλοτρανσφεράση ιστονών, μέσο για την αποσυσπείρωση της χρωματίνης κοντά στα σημεία έναρξης της μεταγραφής και σαν βάση για πολλές σημαντικές σχετιζόμενες πρωτεΐνες. Η σύνδεση της STAT-1 με το CBP/p300 απαιτεί τόσο την καρβοξυτελική όσο και την αμινοτελική περιοχή της STAT-1. Το CBP/p300 σύμπλοκο αλληλεπιδρά με τον pCIP, οι οποίοι και υφίστανται μεταγραφική ενεργοποίηση από STAT-1 (Korzuz και συν. 1998). Η φωσφορυλίωση της σερίνης 727 της STAT-1 απαιτείται για την αλληλεπίδραση με MCM-5 και BRCA1 και για τη μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα.

Η STAT-1 επίσης σχετίζεται με γενικούς (SP1) και επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες (AP1, NFκB) (Korzus και συν. 1997).

Ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας της STAT-1 μηνυματοδότησης αποκαλύπτεται από της παρουσία παράλληλων GAS αλληλουχιών στους υποκινητές κάποιων IFN-επαγόμενων γονιδίων. Η STAT-1 δημιουργεί τετραμερή σε τέτοια σημεία, διαδικασία η οποία απαιτεί την παρουσία των αμινοτελικών περιοχών (Vinkemeier και συν. 1996). Συνεργιστική πρόσδεση του ISGF3 έχει επίσης παρατηρηθεί σε συνδεδεμένα ISGF στον υποκινητή του IFN-α-αποκρινόμενου 6-16 γονιδίου (Li και συν. 1998). Η αμινοτελική περιοχή της STAT-1 είναι επίσης σημαντική για τη συνεργιστική πρόσδεση του ISGF3 σε συνδεδεμένα ISGF. Οι συνεργιστικές DNA ικανότητες δέσμευσης τόσο της STAT-1 όσο και του ISGF3 είναι πιθανό να συμβάλλουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση των πρόσθετων IFN-αποκρινόμενων γονιδίων που έχουν παράλληλες θέσεις πρόσδεσης.



Εικόνα 11. Ενεργοποίηση θετικής και αρνητικής ρύθμισης της STAT-1 από τις IFN (Ivashkin και Hu, 2004).

Δ.5.2. Αρνητική ρύθμιση της STAT-1 μηνυματοδότησης

Σύνδεση των υποδοχέων κυτοκίνης συχνά οδηγεί σε παροδική ενεργοποίηση του JAK-STAT μηνυματοδοτικού μονοπατιού. Η STAT-1 ενεργότητα συχνά γίνεται μέγιστη για 5-10 λεπτά μετά την από κυτοκίνη διέγερση, ακολουθούμενη από επιστροφή πίσω στην αρχική της κατάσταση για τις επόμενες 1-4 ώρες, αν και υπάρχουν επίσης αρκετά παραδείγματα για αναπτυσσόμενη STAT-1 ενεργοποίηση (Ivashkin και Hu, 2004). Επιπλέον, έχει καταστεί σαφές ότι η μηνυματοδότηση από το JAK-STAT μονοπάτι μπορεί να παρεμποδιστεί μετά από προ-επώαση με ανταγωνιστικούς παράγοντες. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι πρέπει να υπάρχουν ανασταλτικοί μηχανισμοί για την καταστολή του JAK-STAT μονοπατιού που έχει μηνυματοδοθεί από τις κυτοκίνες.

Καταστολή της μηνυματοδότησης των κυτοκινών είναι πιθανόν σημαντική για την ομοίωση και πρόληψη από τη χρόνια φλεγμονή και από την αυτοανοσία. Έχουν περιγραφεί τόσο τα μονοπάτια που περιλαμβάνουν αναστολές όσο και οι επαγόμενοι μηχανισμοί. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να δράσουν σε πολλά επίπεδα, όπως στην κυτοκίνες-μηνυματοδότηση, στόχευση υποδοχέων, JAK ή και στα ίδια τα STAT (Ivashkin και Hu, 2004). Συνεχείς κατασταλτικοί μηχανισμοί συμπεριλαμβάνουν πρωτεόλυση, αποφωσφορλίωση και αλληλεπίδραση με ανασταλτικά μόρια, που ονομάζονται αναστολές των ενεργοποιημένων STAT (PIAS). Τρεις είναι οι κύριοι ρυθμιζόμενοι ή επαγόμενοι ανασταλτικοί μηχανισμοί, οι οποίοι έχουν περιγραφεί, διαμεσολαβούμενοι από καταστολή στην έκφραση υποδοχέων, μέσω της επαγωγής κατασταλτικών μορίων, τα οποία ονομάζονται πρωτεΐνες καταστολές της μηνυματοδότησης από κυτοκίνες (SOCS), και από την ταχέως επαγόμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (PKC) C-εξαρτώμενη από την τροποποίηση προϋπαρχόντων μηνυματοδοτικών στοιχείων.

Η μεταγραφή πολλών γονιδίων καταστέλλεται από την IFN- γ . Μείζονες στόχοι της αρνητικής ρύθμισης είναι γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του εξωκυττάριου στρώματος: μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος (MMPs), περλεκάνη, BPAG1, γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (c-myc, cyclin-D, cyclin-A) και πολλά ειδικά για το θυρεοειδή γονίδια (θυρεοσφαιρίνη, θυρεοειδική υπεροξειδάση) και υποδοχέα θυρεοτροπίνης. Μέλη της οικογένειας MMP των ουδέτερων πεπτιδασών που εξαρτώνται από τον ψευδάργυρο, συμπεριλαμβανομένων των κολλαγενασών, ζελατινασών και στρωμελυσινών, εμπλέκονται στην αποδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος, την διήθηση και

μετάσταση των κακοηθών κυττάρων και την καρκινο-επαγόμενη αγγειογένεση (Westermarck και Kahari, 1999). Η περλεκάνη είναι μια ηπαρίνη θειικής πρωτεογλυκάνης η οποία βρέθηκε σε βασικές μεμβράνες και πάνω σε κυτταρικές επιφάνειες (Lozzo και συν. 1994). Η IFN-διαμεσολαβούμενη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου της περλεκάνης είναι STAT-1-εξαρτώμενη και απαιτεί μια ακραία περιοχή υποκινητή που περιέχει πολλές GAS αλληλουχίες (Sharma και Lozzo, 1998).

Αντίθετα, η AP-1 οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων εμπλέκεται στην έκφραση της στωμελυσίνης η οποία επάγεται από την IFN- γ (Lewis και συν. 1999). Καταστολή της έκφρασης ειδικού για τον θυρεοειδή γονιδίου από την IFN- γ μπορεί να συνεπάγεται και καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα έκφρασης θυρεοειδούς (TF2) και της ενεργότητας στην DNA πρόσδεση (Miyazaki και συν. 1999). Η IFN- γ καταστέλλει την έκφραση του c-myc στον άγριο τύπο αλλά όχι σε STAT-1-ελλειπείς εμβρυϊκές ινιβλάστες ποντικού (Ramana και συν. 2000). Η συμμετοχή GAS αλληλουχίας στον υποκινητή του c-myc είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για την καταστολή. Επιπλέον η φωσφορυλίωση τόσο των καταλοίπων τυροσίνης όσο και των καταλοίπων σερίνης της STAT-1 είναι απαραίτητες στη c-myc καταστολή (Ikeda και συν. 1999, Ala-aho και συν. 2000). Η ελάχιστη περιοχή του υποκινητή που απαιτείται για την αναστολή της έκφρασης του BPAG1 και της cyclin-A περιέχει πολλά cis-ενεργά στοιχεία αλλά όχι GAS (Tamaï και συν. 1995, Sibiga και συν. 1999). Είναι πιθανό ότι σε αυτές τις περιπτώσεις η καταστολή συνεπάγεται και την μετατροπή συν-ενεργοποιητών ή γενικών μεταγραφικών παραγόντων ανάμεσα σε σύμπλοκα που καθοδηγούν τη μεταγραφή. Μεταγραφική καταστολή σε ευκαρυωτικά κύτταρα διαμεσολαβείται από αλληλεπίδραση καταστολέων με αποσιώπηση ή αρνητικά ρυθμιζόμενα στοιχεία. Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν διπλή λειτουργία, όντας ικανοί να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν τη μεταγραφή, εξαρτώμενοι από το τη σύσταση των ειδικών υποκινητών μέσω στρατολόγησης συν-ενεργοποιητών ή συν-καταστολέων (Ogbourne και Antalis, 1998, Torchia και συν. 1998). Ο προσδιορισμός και χαρακτηρισμός των συν-καταστολέων που αλληλεπιδρούν με την STAT-1 θα αποσαφηνίσουν τους μηχανισμούς μεταγραφικής καταστολής από την IFN- γ .

Δ.5.3. Αλληλεπίδραση της STAT-1 με ρυθμιστικές πρωτεΐνες

Η STAT-1 ενεργότητα μπορεί να διαφοροποιηθεί μέσω της σύνδεσης της STAT-1 με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μέλη της οικογένειας PIAS, τα οποία δρουν στον πυρήνα, ή με εκείνες της οικογένειας των πρωτεϊνών φωσφατάσης της τυροσίνης (PTPs), τα οποία δρουν είτε στον πυρήνα είτε στο κυτταρόπλασμα. Έχει αναγνωριστεί καλά ο ρόλος της καταστολής της σηματοδότησης από κυτοκίνες (SOCS) στην αρνητική ρύθμιση της IFN-εξαρτώμενης μηνυματοδότησης. Ωστόσο, οι SOCS πρωτεΐνες στοχεύονται κυρίως από τις JAK για την καταστολή της STAT μηνυματοδότησης.

Υπάρχουν τέσσερα μέλη της οικογένειας PIAS τα οποία κωδικοποιούνται από απομακρυσμένα γονίδια (PIAS1, PIAS3, PIASx, PIASy). Όπως συμβαίνει και με τον STAT-1, υπάρχουν διάφορα συρραμμένα προϊόντα των πρωτεϊνών PIAS, συμπεριλαμβανομένων των PIAS3β, PIASx-α, PIASx-β. Ακολουθώντας την IFN διέγερση, η PIAS1, και όχι άλλες PIAS, παρεμποδίζει την DNA δεσμευτική ικανότητα της STAT-1 και επομένως και την διαμεσολαβούμενη γονιδιακή ενεργότητα της STAT-1. Η αλληλεπίδραση PIAS1-STAT-1 απαιτεί τη φωσφορυλίωση της STAT-1 στην τυροσίνη 701, κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι η PIAS είναι ειδικός αναστολέας της STAT-1 μεσολαβούμενης ενεργοποίησης. Επιπλέον, η PIASy επίσης εμφανίζεται να σχετίζεται με την STAT-1 και να λειτουργεί ως μεταγραφικός συν-καταστολέας της STAT-1 χωρίς να επιδρά στην DNA ενεργότητα πρόσδεσης της STAT-1. Όπως ειπώθηκε παραπάνω, οι πρωτεΐνες PIAS επίσης μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή προβάλλοντας την SUMOylation των στοχευμένων μεταγραφικών παραγόντων. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η STAT-1 μπορεί να SUMOylated από πρωτεΐνες PIAS στη λυσίνη 703, αλλά παραμένει αδιευκρύνιστη η πραγματική απόδειξη αυτής της μετατροπής της ρύθμισης της STAT-1 (Hun και συν. 2006).

Η STAT-1 μπορεί επίσης να ρυθμιστεί αρνητικά από PTPs όπως η TC45 (ενεργεί και σε πυρήνα και σε κυτταρόπλασμα) ή η SHP2 (ενεργεί στον πυρήνα). Η αποφωσφορυλίωση της STAT-1 από την πυρηνική PTP είναι ένα σημαντικό σήμα που διεγείρει την έξοδο της STAT-1 πίσω στο κυτταρόπλασμα. Μια μελέτη αποκαλύπτει ότι η TC45, μια πυρηνική ισομορφή της T-κυττάρου PTP, είναι σχετική πυρηνική PTP και για την STAT-1 (ten Hoeve και συν. 2002). Η TC45 μπορεί άμεσα να αποφωσφορυλιώσει την STAT-1 και στα TC45-ελλιπή κύτταρα, η STAT-1 αποφωσφορυλίωση στον πυρήνα είναι ελαττωματική στην απόκριση στην IFN.

Σημειώνεται επίσης ότι χαμηλά επίπεδα της TC45, που εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα, πιθανόν να εμπλέκονται στην αποφωσφορυλίωση της STAT-1. Η SHP2 μπορεί επίσης να αναφερθεί ως εμπλεκόμενη πρωτεΐνη στην αποφωσφορυλίωση της STAT-1 στον πυρήνα (Wu και συν. 2002). Στις SHP2-ελλειπείς ινοβλάστες, η STAT-1 φωσφορυλίωση από IFN- γ τόσο στο κατάλοιπο τυροσίνης όσο και στο κατάλοιπο σερίνης ενισχύεται και παρατείνεται, ενόσω η υπερέκφραση του SHP2 αναστέλλεται από την IFN- γ -εξαρτώμενη STAT-1 φωσφορυλίωση και καταστέλλεται από τη STAT-1-εξαρτώμενη μεταγραφική. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η SHP2 είναι διπλο-ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση, η οποία εμπλέκεται στη STAT-1 αποφωσφορυλίωση, τόσο στο κατάλοιπο τυροσίνης όσο και στο κατάλοιπο σερίνης, στον πυρήνα και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της λειτουργίας της STAT-1 (Wu και συν. 2002).

Η STAT-1 ενεργότητα επίσης ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες SOCS, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαμόρφωση της STAT μηνυματοδότησης δρώντας πάνω στις JAK. Οι SOCS πρωτεΐνες, οι οποίες συναντώνται σε χαμηλά επίπεδα στα ήρεμα κύτταρα, επάγονται ταχύτατα μέσω θεραπείας με κυτοκίνες και έτσι αναστέλλουν τη STAT-1 μηνυματοδότηση και δημιουργούν μια θηλειά αρνητικής ανάδρασης. Για παράδειγμα, η SH2 επικράτεια της SOCS1 προσδένεται άμεσα στις JAK που έχουν φωσφορυλιωθεί από τυροσίνη, με αποτέλεσμα την άμεση παρεμπόδιση της JAK ενεργότητας. Γενετικές μελέτες αποκάλυψαν ότι SOCS-ελλιπή ποντίκια πέθαναν μέσα σε τρεις εβδομάδες από τη γέννησή τους, κυρίως εξαιτίας των απορρυθμισμένων IFN- γ αποκρίσεων (Kile και Alexander, 2001). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι SOCS πρωτεΐνες επιδρούν ειδικά στη διάρκεια της JAK-STAT μηνυματοδότησης, αλλά όχι στην αρχική διαδικασία ενεργοποίησης ή στη μηνυματοδοτική δύναμη. Επομένως η SOCS ανεπάρκεια έχει σαν αποτέλεσμα την παρατεταμένη ενεργοποίηση της STAT ενεργότητας στις κυτοκίνες (Imada και Leonard, 2000).

Δ.5.4. Τερματισμός της STAT-1-εξαρτώμενης μηνυματοδότησης

Η STAT-1 ταχέως και παροδικά ενεργοποιείται ως απόκριση στηδιέγερση του συνδέτη. Πειράματα Pulse-chase δείχνουν ότι, αν και η ενεργοποίηση του STAT1 είναι βραχύβια, η STAT1 πρωτεΐνες είναι σχετικά σταθερή (Haspel και συν., 1996). Πολλαπλοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην απορρύθμιση της STAT1-εξαρτώμενης

μηνυματοδότησης. Οι σχετιζόμενες με υποδοχέα τυροσινικές φωσφατάσες Shp1 και Shp2 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της JAK-STAT1 μηνυματοδότησης αδρανοποιώντας τους υποδοχείς των IFN και JAK μέσω αποφωσφορυλίωσης (David και συν. 1993, Haque και συν. 1997). Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης και της πρόσδεσης στο DNA της STAT1 είναι ενισχυμένη σε IFN-θεραπεία Shp2-null ινοβλάστες (Yon και συν. 1999). Μια πυρηνική φωσφατάση τυροσίνης έχει ενοχοποιηθεί για την απενεργοποίηση της ενεργοποιημένης STAT-1 (Haspel και Darnell, 1999).

Η SOCS1, ένας ειδικός αναστολέας της STAT-1 μηνυματοδότησης, μπορεί να προσδεθεί απευθείας στις JAK και να αναστείλει την ενεργότητά τους ως κινασών τυροσίνης (Starr και συν. 1997, Endo και συν. 1997). Πρωτεολυτική αποδόμηση του STAT-1 διμερούς ακολουθούμενη από ουβικουϊτίνωση είναι ένας άλλο μηχανισμός με τον οποίο η STAT-1 ρυθμίζεται αρνητικά (Kim και Maniatis, 1996). Αποτελεσματική λήξη της επαγωγής από κυτοκίνες ενεργοποίησης είναι σημαντική για την ρύθμιση των STAT-1-εξαρτώμενων γονιδίων που φυσιολογικά σιωπούν ή εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα σε μη-διεγερμένα κύτταρα.

Δ.5.5. Διασταυρωτή ρύθμιση μέσω άλλων STAT

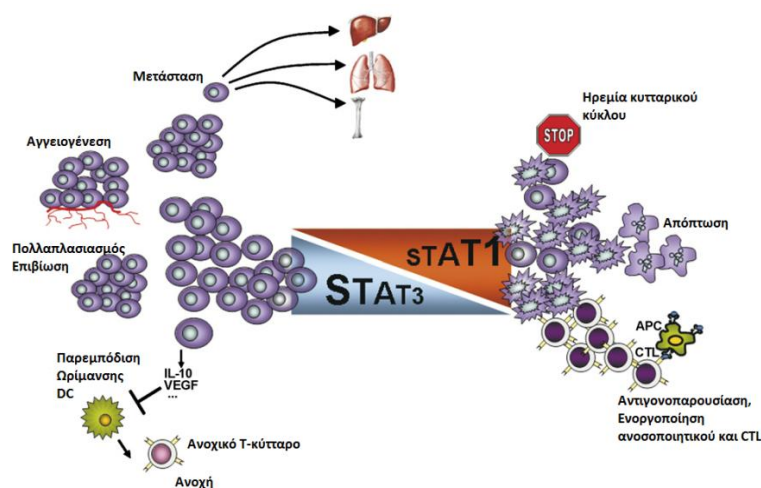
Η ενεργότητα της STAT-1 μπορεί να ρυθμιστεί από άλλα μέλη της οικογένειας των STAT, όπως η STAT3. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι διασταυρωτή ρύθμιση ανάμεσα στις STAT παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μηνυματοδοτικής ειδικότητας της κυτοκίνης. Για παράδειγμα, οι STAT-1 και STAT3 ενεργοποιούνται και οι δύο από διέγερση της IL-6, γεγονός το οποίο οδηγεί στη δημιουργία τριών διακριτών διμερών:

- (α) STAT-1-STAT-1,
- (β) STAT-1-STAT3 και
- (γ) STAT3-STAT3.

Σε εμβρυϊκές ινοβλάστες ποντικού στις οποίες λείπει η STAT3, η IL-6 μεσολαβεί στις IFN-γ όμοιες αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης και της παρατεταμένης ενεργοποίησης της STAT-1 και της επαγωγής πολλαπλών IFN-γ επαγόμενων γονιδίων. Αυτό το αποτέλεσμα προτείνει ότι η ειδικότητα σηματοδότησης της IL-6 διαφοροποιείται από την ενεργοποίηση της STAT3 και την αμοιβαία ενεργοποίηση μεταξύ των STAT-1 και STAT-3 (Kovarik και συν. 2001). Ένα άλλο παράδειγμα της διασταυρωτής ρύθμισης της STAT-1 με την STAT-3 είναι

το πόρισμα ότι, σε απάντηση στην IFN- γ , η STAT-3 ενεργοποίηση είναι ισχυρότερη και πιο παρατεταμένη στις STAT-1-ελλειπείς εμβρυϊκές ινοβλάστες ποντικών σε σύγκριση με του αγρίου τύπου κύτταρα. Η IFN- γ διεγείρει την κυρίαρχη ενεργοποίηση της STAT-1 και την ασθενή ενεργοποίηση της STAT-3 (Qing και Stark, 2004). Οι STAT-1 και STAT-3 ανταγωνίζονται για τον ίδιο υποδοχέα και η ενεργοποιημένη STAT-3 μπορεί να αντικαταστήσει την STAT-1 σε STAT-1-ελλιπή κύτταρα και να οδηγήσει στη μεταγραφή συγκεκριμένων IFN- γ εξαρτώμενων γονιδίων (Qing και Stark, 2004). Οι δύο αυτές STAT συμμετέχουν σε αντίθετες διεργασίες στην κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη. Η διασταυρωτή ρύθμιση μεταξύ των STAT-1 και STAT-3 μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στο STAT-1-εξαρτώμενο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου (Regis και συν. 2008).

Η STAT-1 ενεργοποίηση θεωρείται ότι επάγει την απόπτωση, ενώ η ενεργοποιημένη STAT-3 μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα από την απόπτωση. Η αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ των STAT-1 και STAT-3 στον κυτταρικό θάνατο υποστηρίχθηκε από τους Regis και συν. (2008), που έδειξαν ότι η συνεχής ενεργοποίηση της STAT-3 προστατεύει τις ινοβλάστες από την απώλεια ορού και την UV-επαγόμενη απόπτωση και επίσης ανταγωνίζεται τις προ-αποπτωτικές επιδράσεις της ενεργοποιημένης STAT-1 σε απόκριση στην IFN- γ (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της STAT-1 με την STAT-3 (Regis και συν. 2008).

Δ.6. STAT-1 και καρκίνος

Η STAT-1 ως ρυθμιστής της αύξησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης.

Η απόδειξη ότι η STAT-1 παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της προόδου του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση προέρχεται από τρεις πηγές:

- (1) πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες,
- (2) πειράματα σε ζώα και
- (3) κλινικές παρατηρήσεις σε ανθρώπινα καρκινώματα.

Από αυτές τις μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η STAT-1 είναι σημαντική για τον έλεγχο της αύξησης και μπορεί να θεωρηθεί ως μεσολαβητής στο μονοπάτι καταστολής του καρκίνου (Bromberg και συν. 2001).

Μετά την ανακάλυψη της αντι-ϊικής δράσης της IFN, παρατηρήθηκε και η επίδραση αυτής σε καλλιέργεια κυττάρων. Η IFN- γ , για παράδειγμα, οδηγεί στην ενεργοποίηση της STAT-1 και τα ποντίκια που στερούνται STAT-1 δεν έχουν έμφυτη απάντηση σε ιικά ή σε βακτηριακά παθογόνα, διότι η άμυνα εναντίον αυτών των παθογόνων συνήθως απαιτεί μια απόκριση σε IFN- β (O'Shea και συν. 2013). Οι IFN- α και IFN- γ απαιτούν την STAT-1 για να ασκήσουν την αρνητική δράση τους στον πολλαπλασιασμό.

Είναι ενδιαφέρον ότι σε συστήματα στα οποία ο EGF ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό, παρατηρείται ενεργοποίηση της STAT-1 και είναι απαραίτητη η έκφρασή του. Απαιτείται η ενεργοποίηση συμπλέγματος κυκλίνης/CDK και σε επαρκές ποσοστό, έτσι ώστε οι μεταβάσεις φάσεων G1/S και G2/M να συμβούν φυσιολογικά. Αναστολή της κυτταρικής αύξησης από την STAT-1 συμβαίνει κυρίως μέσω της ρύθμισης των γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Δύο αναστολείς CDK (κυκλίνη-εξαρτώμενη κινάση), p21/waf1 και p27kip1 - τα οποία θα συνδεθούν στα CDK και θα παρεμποδίσουν την ενεργότητα κινάσης τους -επάγονται από την STAT-1. Επίσης καταστέλλονται και η κυκλίνη A, και κυκλίνες B, D2, D3 και E. Η STAT-1 είναι επίσης υπεύθυνη για την αναστολή της έκφρασης του c-myc. Όσο το c-myc καταστέλλει την έκφραση του p21/waf1 τόσο ενισχύεται η αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Najjar και Fagard, 2010).

Η STAT-1 επάγει την έκφραση των προ-κασπασών, τις λανθάνουσες μορφές των κασπασών, οι οποίες είναι πρωτεάσες που μεταβιβάζουν τα αποπτωτικά μηνύματα στο κυτταρόπλασμα. Η STAT-1 αποδεικνύεται ότι διαρκώς επάγει την έκφραση των προ-κασπασών -1, -3 και -11 (Battle και Frank, 2002). Οι προ-κασπάσες -1 και -11 απαιτούνται για την επακόλουθη διάσπαση των προ-κασπασών-3 και -8 σε μυελοειδή λεμφοκύτταρα. Η STAT-1 επάγει την έκφραση των προ-κασπασών ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα: η έκφραση της προ-κασπάσης-3 σε απόκριση στον TNF- α απαιτεί STAT-1. Οι IFN- γ , EGF, 7-κετοχοληστερόλη και θρομβίνη έχει αποδειχθεί ότι επάγουν την έκφραση των

προ-κασπασών με έναν STAT-1-εξαρτώμενο τρόπο, αλλά με σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με τα ερεθίσματα που φθάνουν τα κύτταρα. Η STAT-1 μεσολαβεί επίσης στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την IL-21 στο λέμφωμα από κύτταρα μανδύα (Gelebart και συν. 2009). Τα γονίδια των προ-κασπασών δεν είναι τα μόνα προ-αποπτωτικά γονίδια που επάγονται από την STAT-1. Το γονίδιο Fas (CD95/APO-1) επάγεται σε απόκριση στην IFN- γ στο αδένωμα του παχέος εντέρου, στα κύτταρα μικρογλοίας και στις ινοβλάστες (Lee και συν. 2000). Στα καρδιομυϊκά κύτταρα, η επαγόμενη από την ισχαιμία απόπτωση συνοδεύεται από την ενεργοποίηση της STAT-1, η οποία επάγει την έκφραση των γονιδίων FasL (Fas ligand), Fas και κασπάση-1 (Stephanou και συν. 2001). Η τελευταία αναστέλλεται από STAT-1 αντι-πληροφοριακό RNA. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της STAT-1 οδηγεί στην αναστολή των υποκινητών των αντι-αποπτωτικών γονιδίων Bcl2 και Bcl-X.

Ένα υψηλό επίπεδο έκφρασης STAT-1 διεγείρει το TNF- α προ-αποπτωτικό μονοπάτι. Η STAT-1 έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον TRADD και ως εκ τούτου αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF- κ B, η STAT-1 ανταγωνίζεται με τον TRAF2 και αποτρέπει το σχηματισμό του NF- κ B ενεργοποιημένου από το σύμπλοκο TRADD/TRAF2/RIP (Wang και συν. 2000). Η STAT-1 δραστηριοποιείται σε δύο διαφορετικά επίπεδα για να ενισχύσει την TNF- α -επαγόμενη απόπτωση:

- (α) αναστέλλει την NF- κ B σηματοδότηση (Wang και συν. 2000) και
- (β) επάγει τη βασική έκφραση της προ-κασπάσης-3, ένα συστατικό το οποίο απαιτείται για κασπάση-8-επαγόμενη απόπτωση (Thara και συν. 2013).

Η STAT-1 επίσης αλληλεπιδρά με το p53, έναν σημαντικό ρυθμιστή της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου (Soond και συν. 2007). Ο p53 μεταγραφικός παράγοντας, απαντά σε χαμηλά βασικά επίπεδα και επάγεται μετά από:

- (α) υποξία,
- (β) έλλειψη τροφής,
- (γ) DNA βλάβη ή
- (δ) ενεργοποίηση από ογκογονίδια.

Η ενεργοποίηση του p53 συνεπάγεται αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης καθώς και μεθυλίωσης. Η φωσφορυλίωση του p53 είναι ένα βασικό γεγονός της ενεργοποίησής του και εμπλέκει περίπου δεκαπέντε διαφορετικές κινάσες, ενώ η ουβικουϊτίνωση από την ουβικουϊτίνική λιγάση Mdm2 (mouse double minute 2) είναι

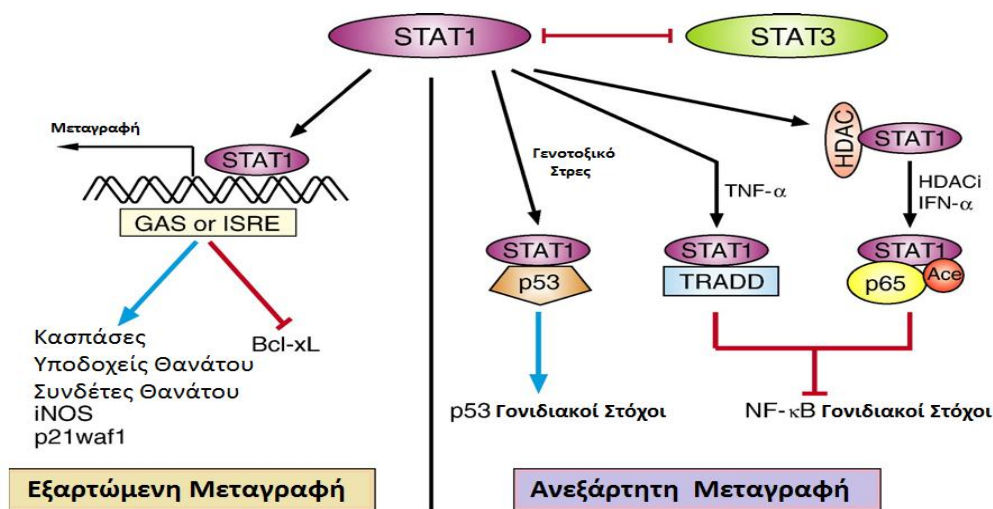
ένας αρνητικός ρυθμιστής. Η συχνότητα εμφάνισης αυθόρμητων ή χημικά επαγόμενων όγκων έχει βρεθεί να είναι υψηλότερη σε STAT-1/p53 διπλά knockout ποντίκια από ότι σε p53 knockout ποντίκια. Σε εμβρυϊκές ινοβλάστες ποντικού (MEF), η απόπτωση που προκαλείται από κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως η σισπλατίνη ή δοξορουβικίνη απαιτεί την έκφραση ενός λειτουργικού STAT-1 (Bergeron και συν. 2000). Σε αυτά τα κύτταρα, η STAT-1 ενισχύει το p53 με την αύξηση της έκφρασής του μέσω της καταστολής της έκφρασης του Mdm2 αναστολέα του. Επιπλέον, η STAT-1 αλληλεπιδρά άμεσα με το p53 και αυξάνει της μεταγραφική του ενεργότητα σε στόχους όπως οι Noxa, Bax και Fas. Στις ανθρώπινες ινοβλάστες, η ενεργοποίηση του p53 σε DNA βλάβες μετά από έκθεση σε ακτίνες-X ρυθμίζεται από STAT-1. Σε αυτό το σύστημα, η STAT-1 ρυθμίζει την φωσφορυλίωση της p53 στην σερίνη 15 από την ATM (ataxia telangiectasia mutated) και στη σερίνη 20 από Chk2 (σημείο ελέγχου 2). Επίσης, διευκολύνει την ενεργοποίηση των Chk2 από ATM (Townsend και συν. 2005). Στα B κύτταρα, έχει επίσης παρατηρηθεί φυσική αλληλεπίδραση του p53 και της STAT-1 και έχει διαπιστωθεί ότι η αναστολή της STAT-1 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από φλουδαραβίνη, μια κυτταροτοξική ένωση που χρησιμοποιείται κυρίως στα B κύτταρα του λεμφώματος και της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, των οποίων η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από ένα λειτουργικό p53. Η φλουδαραβίνη έχει επίσης βρεθεί να μειώνει ειδικά την STAT-1 και τα mRNA επίπεδα στα περιφερικά λεμφοκύτταρα και λεμφοβλαστοειδή B-κυττάρα (Frank και συν. 1999). Ωστόσο, τα ίδια κύτταρα, μέσω υπερέκφρασης της STAT-1, ευαισθητοποιούνται στη θεραπεία με φλουδαραβίνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η STAT-1 μπορεί να ενεργεί σε διαφορετικά ανταγωνιστικά επίπεδα των μονοπατιών που προκαλούνται από φλουδαραβίνη. Πράγματι, τα τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι η θεραπεία των κυττάρων με γενοτοξικούς παράγοντες, όπως η δοξορουβικίνη και σε μικρότερο βαθμό η φλουδαραβίνη, ενεργοποιεί την STAT-1 (Youlyouz-Marfak και συν. 2008). Η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από το p53, ακόμη και αν αυτό είναι μεταγραφικά ανενεργό. Έτσι, η λειτουργία της STAT-1 πηγαίνει πέρα από την ενεργοποίηση της μεταγραφής των προ-αποπτωτικών γονιδίων. Μέσω της δράσης της στο p53 συμμετέχει στην επιλογή του μονοπατιού - που θα οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, ή στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου - όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε διαφορετικά είδη stress. Παρά το γεγονός ότι έχουν διεκρινιστεί ορισμένοι από τους

σχετικούς μηχανισμούς, είναι ακόμα ασαφές το πώς η STAT-1 επηρεάζει την έκφραση των στόχων του p53 (Najjar 2010).

Ένας ρόλος για την STAT-1 στην κυτταρική διαφοροποίηση έχει αποκαλυφθεί σε STAT-1 $-/-$ ποντικούς. Σε αυτούς τους ποντικούς, η υπερβολική οστεοβλαστογένεση είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα Runx-2, ο οποίος φυσιολογικά δεσμεύεται στο κυτταρόπλασμα από αποφωσφορυλιωμένη STAT-1 (Miyazono και συν. 2004). Επιπλέον βρέθηκε ότι η διαφοροποίηση κυττάρων οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, η οποία επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ, απαιτεί και την φωσφορυλίωση της STAT-1 στη σερίνη 727.

Η STAT-1 είναι αρνητικός ρυθμιστής της ογκογένεσης, της αγγειογένεσης (Battle και συν. 2006) και του σχηματισμού μετάστασης (Huang και συν. 2002). Σε STAT-1-ελλιπή ποντίκια, αυθόρμητοι και χημικά επαγόμενοι όγκοι προκύπτουν συχνότερα από ότι σε άγριου τύπου ζώα, καθώς και η αντικαρκινική δραστηριότητα της IFN-α μειώνεται, προσδιορίζοντας έτσι την STAT-1 ως "ογκοκατασταλτική" (Εικόνα 13). Στους όγκους Wilms, η φωσφορυλίωση της STAT-1 στη σερίνη 727 επίσης σχετίζεται με καλή πρόγνωση (Timofeena και συν. 2006).

Επιπλέον, η STAT-1 αναστέλλει την έκφραση του Rho, Rac και Cdc42, καθώς και τη δραστηριότητα των Ras/MAP κινάση μονοπατιών στα Ras ενεργοποιημένα κύτταρα. Η λειτουργία της STAT-1 ως ογκοκατασταλτικού παράγοντα είναι πιθανόν να συνδέεται με τη λειτουργία του στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η STAT-1 ενεργοποιεί άμεσα την έκφραση της μεταγραφικού παράγοντα CIITA (τάξη II του MHC), η οποία ενεργοποιεί την μεταγραφή του μείζονος σύμπλεγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC II). Επιπλέον, η STAT-1 εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της MMP-9 που χρησιμεύει ως αγγειογενετικός παράγοντας (Nozell και συν. 2004). Ωστόσο, παρόλο που η STAT-1 είναι ογκοκατασταλτικός παράγοντας, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να λειτουργήσει θετικά στην ανάπτυξη των όγκων. Μια μελέτη έδειξε ότι μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη των αιμοποιητικών όγκων, ανεξάρτητα από την IFN σηματοδότηση και σε συνδυασμό με αύξηση στην έκφραση των MHC μορίων τάξης I, γεγονός που υποδηλώνει μια IFN-ανεξάρτητη ογκογόνο λειτουργία της STAT-1 (Kovacic και συν. 2006).



Εικόνα 13. Ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου από τον STAT-1 μέσω μεταγραφής- ανεξάρτητων και εξαρτημένων μηχανισμών (Από Kim και Lee 2006).

STAT-1 και καρκίνος του μαστού

Δεδομένα από κυτταρικές σειρές: Στον καρκίνο του μαστού, η p21 ενεργοποίηση από την STAT-1 μπορεί επίσης να περιλαμβάνει αλληλεπίδραση με το BRCA1, σημαντικό γονίδιο για προδιάθεση σε κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Στην πραγματικότητα, BRCA1 και STAT-1 συμβάλλουν συνεργιστικά στην p21/waf1 μεταγραφή μέσω μιας αλληλεπίδρασης μεταξύ των BRCA1 αμινοξέων 502-802 και της STAT-1 TAD επικράτειας. Η επικράτεια αυτή περιέχει σερίνη 727, της οποίας η φωσφορυλίωση είναι κρίσιμη για την μεταγραφική ενεργότητα της STAT-1 και η οποία είναι άμεσα συσχετιζόμενη με τη στρατολόγηση των STAT-1 μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών. Η μετάλλαξη του προκαλεί ελαττωματική STAT-1-BRCA1 δέσμευση (Ouchi και συν. 2000).

Δεδομένα από μοντέλα ποντικών: Μελέτες σε μοντέλα ποντικών ελλιπή στον STAT-1, έχουν δείξει μειωμένη ευαισθησία στην απόπτωση των λεμφοκυττάρων (Lee και συν. 2000b). Δεδομένα από μελέτες με διαγονιδιακούς ποντικούς επιβεβαιώνουν τον προ-αποπτωτικό ρόλο της STAT-1 in vivo καθώς και τα

ελαττωματικά αποπτωτικά μονοπάτια στα STAT-1-ελλιπή συστήματα (Kumar και συν. 1997). Επιπλέον όταν υπάρχει και p53 -/-, οι STAT-1 -/- ποντικοί αναπτύσσουν μεγαλύτερο εύρος γρηγορότερης εμφάνισης τύπων όγκων (Regis 2008).

Δεδομένα από ανθρώπινους ιστούς: Το πλεονέκτημα της ανοσοϊστοχημικής προσέγγισης είναι η ευκολία στην εφαρμογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων των ασθενών. Το μειονέκτημα σε αυτή την προσέγγιση είναι το τεκμήριο ότι η φωσφορυλίωση και ο πυρηνικός εντοπισμός συνεπάγονται μεταγραφικά ενεργή STAT-1. Εναλλακτικά, το επίπεδο της STAT-1 πρόσδεσης στο DNA μπορεί να μετρηθεί με ηλεκτροφορητική ανάλυση μετατόπισης της κινητικότητας (EMSA). Αν και αυτή η μέθοδος είναι ίσως καλύτερη στο να μετρήσει την STAT1 ενεργοποίηση, είναι χρονοβόρα και δεν υπόκειται σε μικρά δείγματα ιστού. Στην ιδανική περίπτωση, τόσο η ανάλυση με ανοσοϊστοχημική μέθοδο όσο και με EMSA θα μπορούσαν να συγκριθούν στον ίδιο αριθμό ανθρώπινων δειγμάτων και δυστυχώς, μόνο μία μελέτη (Widschwendter και συν. 2002) έχει προβεί σε τέτοια άμεση σύγκριση. Στην μελέτη αυτή βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των φωσφορυλιωμένων STAT-1 και STAT-3 (από μετρήσεις που πάρθηκαν από ανάλυση Western) και της DNA πρόσδεσης (όπως μετρήθηκε από EMSA) σε ιστούς ανθρώπου. Αν και η μελέτη αυτή διαπίστωσε συσχέτιση μεταξύ της STAT-1 ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης και της επιβίωσης, το δείγμα αυτής της μελέτης ήταν μικρό (68 περιπτώσεις, που συμπεριλάμβαναν τόσο αρνητικούς λεμφαδένες όσο και θετικούς λεμφαδένες) και η STAT-1 φωσφορυλίωση δεν αξιολογήθηκε με ανοσοϊστοχημεία (δηλαδή, η συνεισφορά του ανενεργού STAT-1 από τους γύρω στρωματικούς ιστούς ενδέχεται να ήταν σημαντική). Ως τελική παρατήρηση, καμία μελέτη δεν έχει αναφερθεί σχετικά με τον εντοπισμό της STAT-1 ή τη φωσφορυλίωσή του στα μη-επιθηλιακά στοιχεία των φυσιολογικών ή καρκινικών ιστών του μαστού, ή στους διάφορους ιστολογικούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της έκφρασης της κινάσης ERK2, της ETS-1 πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης STAT-1 πρωτεΐνης σε αρχειακό υλικό τομών παραφίνης από διηθητικά καρκινώματα μαστού με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συσχετίστηκαν με: 1) κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (προ-εμμηνοπαυσιακές ή μετα-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς, ιστολογικός τύπος, μέγεθος όγκου, ιστολογικός βαθμός κακοήθειας, πυρηνικός βαθμός κακοήθειας, στάδιο της νόσου, ύπαρξη ή μη διήθησης λεμφαδένων, έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, έκφραση προγεστερονικών υποδοχέων) 2) την επιβίωση των ασθενών (ολική και ελεύθερη νόσου).

Με τον τρόπο αυτό γίνεται προσπάθεια εξαγωγής συμπερασμάτων για τον ρόλο της έκφρασης της κινάσης ERK2, της πρωτεΐνης ETS-1 και της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης STAT-1 στην εξέλιξη και την πρόγνωση των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού.

II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 151 πρωτοπαθή, διηθητικά καρκινώματα μαστού από θήλεις ασθενείς, ηλικίας από 25 έως 86 ετών (μέση ηλικία: 57,1 έτη). Οι ασθενείς ήταν 53 προ-εμμηνοπαυσιακές και οι 98 μετα-εμμηνοπαυσιακές. Δεν είχαμε επαρκές υλικό για την ανοσοϊστοχημική μελέτη της ETS-1 σε 2 ασθενείς. Οι ασθενείς χειρουργήθηκαν για την συγκεκριμένη νόσο στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Αλεξάνδρα. Η χειρουργική θεραπεία τους περιλάμβανε τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή ή συντηρητική χειρουργική επέμβαση με λεμφαδενικό καθαρισμό της μασχάλης και μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία. Καμία από τις ασθενείς δεν έλαβε προεγχειρητική ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία. Μετεγχειρητικά οι ασθενείς έλαβαν συστηματική επικουρική θεραπεία (ορμονοθεραπεία ή χημειοθεραπεία) βάσει θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Τα χειρουργικά παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%, τα δε ιστικά δείγματα που ελήφθησαν για παθολογοανατομική εξέταση σκηνώθηκαν σε παραφίνη. Η μικροσκοπική εξέταση πραγματοποιήθηκε με χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Η ιστολογική ταξινόμηση έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO 1981). Από τα καρκινώματα της μελέτης 121

ταξινομήθηκαν ως διηθητικά πορογενή καρκινώματα ενώ τα 30 ως διηθητικά λοβιακά καρκινώματα. Ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων αποδόθηκε σύμφωνα με το σύστημα των Bloom και Richardson το οποίο αναγνωρίζει τρεις ιστολογικούς βαθμούς κακοήθειας και συγκεκριμένα Grade 1 (καλής διαφοροποίησης), Grade 2 (μέτριας διαφοροποίησης) και Grade 3 (φτωχής διαφοροποίησης) μετά από συναξιολόγηση και βαθμολόγηση του ποσοστού σωληναριακής διαμόρφωσης, της πυρηνικής πολυμορφίας και του αριθμού των μιτώσεων. Από τα καρκινώματα της μελέτης 51 ήταν ιστολογικού βαθμού κακοήθειας 1, 68 ήταν ιστολογικού βαθμού κακοήθειας 2 και 32 ήταν ιστολογικού βαθμού κακοήθειας 3. Ο πυρηνικός βαθμός κακοήθειας των διηθητικών καρκινωμάτων αποδόθηκε σύμφωνα με το σύστημα των Black και συνεργατών (1989) βάσει του οποίου τα καρκινώματα υποδιαιρέθηκαν σε τρεις κατηγορίες 1,2,3 οι οποίες περιελάμβαναν 57, 52 και 42 περιπτώσεις αντίστοιχα. Η σταδιοποίηση των καρκινωμάτων έγινε σύμφωνα με το σύστημα της Διεθνούς ένωσης κατά του καρκίνου (TNM system of the International Union against cancer). Από τα καρκινώματα της μελέτης 27 ήταν σταδίου I, 98 ήταν σταδίου II, και 24 ήταν σταδίου III την στιγμή της διάγνωσης. Το μέγεθος των καρκινωμάτων και οι μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες καταχωρήθηκαν και αξιολογήθηκαν χωριστά. Αναλόγως μεγέθους τα καρκινώματα ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες :<2 cm ήταν 38 περιπτώσεις και >2 cm ήταν 113 περιπτώσεις. Αναλόγως λεμφαδενικών διηθήσεων τα καρκινώματα ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες: μη διηθημένοι λεμφαδένες (62 ασθενείς) και διηθημένοι λεμφαδένες (89 ασθενείς). Οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν κατά την χρονική περίοδο 1992-2002, σε εξαμηνιαία διαστήματα. Ο μέσος χρόνος ολικής επιβίωσης ήταν 97.2 μήνες (ελάχιστος χρόνος επιβίωσης: 5 μήνες , μέγιστος χρόνος επιβίωσης: 135 μήνες).

III. ΜΕΘΟΔΟΙ

III.A. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Για την εντόπιση της ERK κινάσης, της ETS-1 πρωτεΐνης και της p-STAT-1 χρησιμοποιήθηκε σε κύβους παραφίνης αρχειακού υλικού από διηθητικά καρκινώματα του μαστού η ανοσοϊστοχημική μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης-ανοσοϋπεροξειδάσης (Hsu και συν. 1981). Η μέθοδος βασίζεται στην ανοσοδραστικότητα των αντισωμάτων και στις χημικές ιδιότητες ενζύμων ή

ενζυμικών συμπλεγμάτων. Αυτά αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων προς σχηματισμό ενός χρωματισμένου προϊόντος. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η υπεροξειδάση του ραπανιού, ενώ η μέθοδος, αυτή του συμπλέγματος Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης (ABC/HPR). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τρία βήματα:

1^ο) Εφαρμογή του πρωτογενούς αντισώματος

2^ο) Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος και

3^ο) Επώαση με το σύμπλεγμα Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης

Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, λόγω της μεγάλης δεσμευτικής ικανότητας μεταξύ της αβιδίνης και της βιοτίνης. Η αβιδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με MB 70.000 Daltons, που προέρχεται από το λευκό του αυγού της κότας και έχει μεγάλη τάση σύνδεσης (τέσσερις συνδετικές θέσεις ανά μόριο) για τη βιοτίνη. Η βιοτίνη (βιταμίνη H) είναι προσθετική ομάδα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και χρησιμεύει ως μεταφορέας διοξειδίου του άνθρακα μέσα στα μιτοχόνδρια. Έχει την τάση να συνδέεται με IgG γι' αυτό και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αβιδίνη με την οποία κάνει ισχυρή σύνδεση. Το πρώτο αντίσωμα συνδέεται με το δεύτερο αντίσωμα που είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με βιοτίνη. Αυτή στη συνέχεια μπορεί να συνδεθεί με το σύμπλεγμα Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης, το οποίο και ανιχνεύεται ιστοχημικά.

Αναλυτική περιγραφή της μεθόδου

Τομές παραφίνης πάχους 4 μm προερχόμενες από αντιπροσωπευτικές θέσεις των καρκινωμάτων υποβλήθηκαν σε αποπαραφίνωση με παραμονή τους σε κλίβανο ολονύκτια στους 37⁰ C και ακολούθως με συνολικά ημίωρη παραμονή τους σε διαλύματα ξυλόλης. Ακολούθως, ενυδατώθηκαν σε διαλύματα αιθανόλης με φθίνουσα συγκέντρωση (100%, 100%, 90%, 90%, 70%, 70%) και εμβύθιση σε απεσταγμένο νερό. Στην συνέχεια οι τομές επώαστηκαν για 35' σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου προκειμένου να δεσμευτεί η ενδογενής δραστηριότητα υπεροξειδάσης. Για την καλύτερη αποκάλυψη των επιτόπων έγινε προεργασία των τομών σε φούρνο μικροκυμάτων (δύο κύκλοι των 5'), με την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος 0,01 M (ph 6,0), στα 750 W. Ακολούθησε έκπλυση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (50 mmol TRIS/HCL, 150 mmol NaCl, pH=7.6) και επώαση των τομών σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα όσον αφορά την **ERK2** με φυσιολογικό ίππειο ορό για την δέσμευση των μη ειδικών

συνδέσεων των αντισωμάτων. Εν συνεχεία οι τομές επώστηκαν ολονυκτίως στους 4⁰ C με το πρωτογενές αντίσωμα. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) σε αραιώση 1:300. Το αντίσωμα αυτό αντιδρά με την ERK2 του ποντικού και του ανθρώπου. Την επόμενη ημέρα οι τομές εκπλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS για 15' και εν συνεχεία επώστηκαν με το βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα (horse anti-mouse for anti-rabbit secondary antibody) (Vector Laboratories, Burlingame), για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώση με σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame) για 30'. Η αντίδραση υπεροξειδάσης αναπτύχθηκε σε διάλυμα 0,5mg τετραϋδροχλωρικής 3,3'- διαμινοβενζιδίνης (Sigma Chemical Co, St Lois, MO) που περιείχε 0,01% H₂O₂. Τελικά οι τομές χρώστηκαν με αιματοξυλίνη Harris και ακολούθησε η διαδικασία αφυδάτωσής τους με χρήση ανιόντων, όσον αφορά την συγκέντρωσή τους, διαλυμάτων αιθανόλης και διαλύματος ξυλόλης. Η ίδια διεργασία πραγματοποιήθηκε και για την χρώση με **ETS-1** όπου το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το αντίσωμα κονίκλου (C-2D) έναντι του καρβοξυτελικού άκρου του ETS-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) σε αραιώση 1:500.

Όσον αφορά τα στάδια που ακολουθήθηκαν σχετικά με την **pSTAT-1**, αυτά είναι αναλυτικά, τα εξής:

1^η ημέρα

- 1.** Λήψη 20 αντικειμενοφόρων πλακιδίων από το αρχείο, με τομές ιστών πάχους 4μm προερχόμενες από διηθητικά καρκινώματα μαστού από κύβους παραφίνης, τα οποία τοποθετούνται σε λευκά διαφανή καλάθια.
- 2.** Εισαγωγή σε κλίβανο στους 37°C για ολονύχτια παραμονή. Την επόμενη ημέρα οι τομές θερμαίνονται μέσα στον κλίβανο για 1-2 h στους 60°C.
- 3.** Η αποπαραφίνωση, η ενυδάτωση και η ανάκτηση της αντιγονικότητας των ιστικών τομών πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο, με θέρμανση των πλακιδίων σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 750 Watt συνολικής διάρκειας 15 λεπτών, με διάλυμα που προέκυψε από την αραιώση του εμπορικού αντιδραστήριου Trilogy (Cell Marque, USA) με απεσταγμένο νερό (1:20). Το αντιδραστήριο Trilogy έχει ως βασικό συστατικό EDTA και pH 8.0.

4. Οι τομές αφήνονται να επανέλθουν στη θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά και να ανακτήσουν οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες (εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας) την τρισδιάστατη δομή τους.
5. Ακολούθως γίνεται σταδιακή προσθήκη απεσταγμένου νερού και κατόπιν οι τομές εκπλένονται δυο φορές διάρκειας 5 λεπτών έκαστη (με απεσταγμένο νερό).
6. Ακολουθεί έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS (ρυθμιστικό διάλυμα NaCl και Tris 9:1).
7. Στάδιο εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης για την αποφυγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων λόγω της εφαρμογής υπεροξειδάσης στην τεχνική, ως μόριο σήμανσης. Για το σκοπό αυτό γίνεται επώαση των τομών με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (0,3%) σε TBS για 30 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον.
8. Ακολούθως εκπλένονται εκ νέου με διάλυμα TBS δυο φορές διάρκειας 5 λεπτών έκαστη.
9. Στάδιο εξουδετέρωσης των μη ειδικών αντιδράσεων που μπορεί να προέρχεται από ενδο-διασταυρούμενες αντιδράσεις, τόσο του πρωτογενούς αντισώματος με τα ενδογενή αντιγόνα, όσο και των αντι-ορών του συστήματος προσδιορισμού. Οι τομές επικαλύπτονται με φυσιολογικό ορό αλόγου (Normal Horse Serum) (S2000, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) σε αραιώση 1:5 σε TBS (Normal Horse Serum: TBS) και επωάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά.
10. Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου αντι-ορού οι τομές επικαλύπτονται με το πρωτογενές αντίσωμα (αραιώση 1:50, αντίσωμα: TBS) και επωάζονται ολονύκτια στους 4°C. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Phospho-STAT-1 (Tyr701) (9171) Rabbit mAb της εταιρίας Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA.

2^η Ημέρα

1. Οι τομές εκπλένονται με διάλυμα TBS 3 φορές (διάρκειας 5 λεπτών έκαστη).
2. Επώαση με 2^ο αντιορό για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι βιοτινυλιωμένο, προερχόμενο από άλογο και ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κουνελιού [biotinylated horse anti-rabbit IgG (PA-1400 της εταιρείας Vector Lab)]. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται ανοσολογικά με το πρωτογενές (rabbit). Η αραιώση που χρησιμοποιείται είναι 1:60 σε TBS/αλβουμίνη [η αλβουμίνη συμβάλλει στην εξουδετέρωση της μη ειδικής χρώσης και στην παρεμπόδιση της προσκόλλησης των αντισωμάτων στα τοιχώματα των πλαστικών φιαλιδίων (eppendorf) που χρησιμοποιούνται].

3. Ακολουθεί έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS 3 φορές (διάρκειας 5 λεπτών έκαστη).
4. Επώαση με το σύμπλεγμα Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης για 30 λεπτά. Το σύστημα προσδιορισμού που χρησιμοποιείται για την εντόπιση των συμπλόκων αντιγόνου – αντισώματος είναι το σύστημα Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης (ABC-Elite) της εταιρίας Vector (Vector Lab, Burlingame, CA, USA), οι αντι-οροί του οποίου είχαν παραχθεί σε άλογο (Horse). Η βιοτίνη του δευτερογενούς αντισώματος δεσμεύεται με την ελεύθερη αβιδίνη του συμπλέγματος.
5. Στη συνέχεια οι τομές εκπλένονται με διάλυμα TBS (3 φορές επί 5 λεπτά) και βυθίζονται σε διάλυμα Tris (pH 7.6) για 5 λεπτά.
6. Η χρωστική αντίδραση_πραγματοποιείται με επώαση των τομών με διάλυμα 0,5 mg/ml τετραϋδροχλωρικής 3,3 διαμινοβενζιδίνης (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) και 0,06% υπεροξειδίου σε Tris ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM, pH 7.6) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. Το χρωμογόνο αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί αναγνώριση των εναποθέσεων (αντιγόνων) με το κοινό μικροσκόπιο. Η DAB πολυμερίζεται με την παρουσία υπεροξειδάσης και H₂O₂ σχηματίζοντας αδιάλυτο προϊόν που εντοπίζεται στις θέσεις αντιγόνου – αντισώματος δίνοντας ένα καφέ χρώμα (σταθερό χρώμα που δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες) ορατό με το κοινό μικροσκόπιο.
7. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, οι τομές εκπλένονται πολλές φορές με νερό βρύσης.
8. Έπεται χρώση του υποστρώματος σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris) για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ιστών ή κυττάρων.
9. Στάδιο αφυδάτωσης με ανιόντα διαλύματα αιθανόλης:
 - Αιθανόλη 96% - 2 φορές επί 2 λεπτά
 - Αιθανόλη 100% - 2 φορές επί 2 λεπτά
10. Βύθιση των τομών σε ξυλόλη:
 - Ξυλόλη – 3 φορές επί 2 λεπτά
11. Στάδιο επίστρωσης των τομών και επικάλυψή τους με καλυπτρίδα.
12. Παρατήρηση των ιστικών τομών στο μικροσκόπιο.

Η ίδια τεχνική έχει εφαρμοστεί στο Εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών για την ανίχνευση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων (ER, PR). Τα αποτελέσματα της έκφρασης των

ανωτέρω δεικτών βρίσκονται σε βάση δεδομένων, στην οποία έχουν καταχωρηθεί οι πληροφορίες που αφορούν στις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους των καρκινωμάτων του μαστού, καθώς και τα στοιχεία επιβίωσης των ασθενών.

III.B. Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ERK2 κινάσης, της ETS-1 πρωτεΐνης και της pSTAT-1 πρωτεΐνης

Η ERK2 κινάση εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων (**Εικόνα 14, Εικόνα 15**). Επίσης κατά την μελέτη μας παρατηρήσαμε έκφραση και στις ινοβλάστες και το ενδοθήλιο (**Εικόνα 16, Εικόνα 17**). Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ERK2 κινάσης στο *κυτταρόπλασμα* έγινε με ημιποσοτικό προσδιορισμό σε κλίμακα 0 έως 3 ως εξής:

Αρνητική (0): <10%

Ασθενώς θετική (1): 11-20%

Μετρίως θετική (2): 21-50%

Έντονα θετική (3): >50%

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ERK2 κινάσης στον *πυρήνα* έγινε με ημιποσοτικό προσδιορισμό και χαρακτηρίστηκε είτε αρνητική (0%) είτε θετική ($\geq 1\%$). Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ERK2 κινάσης στο ενδοθήλιο έγινε με ημιποσοτικό προσδιορισμό και χαρακτηρίστηκε ως αρνητική (0), ασθενώς θετική (I), μετρίως θετική (II) και έντονα θετική (III). Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ERK2 κινάσης στις ινοβλάστες έγινε με ημιποσοτικό προσδιορισμό και χαρακτηρίστηκε ως αρνητική (0), ασθενώς θετική (I), μετρίως θετική (II) και έντονα θετική (III).

Το παρακείμενο των νεοπλασμάτων φυσιολογικό επιθήλιο αποτέλεσε εσωτερικό θετικό μάρτυρα για την αξιολόγηση της έντασης, της εντόπισης και της κυτταρικής κατανομής της χρώσης. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες τα πρωτογενή αντισώματα είχαν αντικατασταθεί από ρυθμιστικό διάλυμα TBS.

Η ETS-1 ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης και στις ινοβλάστες του στρώματος και το ενδοθήλιο των αγγείων. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση βαθμολογήθηκε όσον αφορά το κυτταρόπλασμα και τις ινοβλάστες του στρώματος σε κλίμακα από 0-3: (0)=καθόλου ή ασθενής χρώση σε λιγότερο από 10% των καρκινικών κυττάρων, (1)=ασθενής ως μέτρια χρώση σε 10-20% των κυττάρων, (2)=μέτρια χρώση σε 21-40% των

κυττάρων, και (3)=ισχυρή χρώση σε περισσότερα από 40% των καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική έκφραση του πυρήνα η χρώση αξιολογήθηκε ως αρνητική όταν ήταν <5% και ως θετική $\geq 5\%$. Θετικοί μάρτυρες (controls) για την μελέτη ήταν τομές από καρκίνωμα με γνωστή ανοσοθετικότητα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες τα πρωτογενή αντισώματα είχαν αντικατασταθεί από ρυθμιστικό διάλυμα TBS.

Τα χρωστικά αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση της φωσφορυλιωμένης STAT-1 πρωτεΐνης αξιολογήθηκαν με ημιποσοτική εκτίμηση της έντασης της χρώσης και της σχετικής αφθονίας των ανοσοαντιδρώντων κυττάρων. Μελετήθηκαν 10 οπτικά πεδία με μεγέθυνση 400x για κάθε περίπτωση. Σε κάθε ένα από αυτά μετρήθηκαν τα θετικά κύτταρα και το επί τοις εκατό ποσοστό της θετικής έκφρασης για τους μελετώμενους δείκτες ήταν ο μέσος όρος των θετικών κυττάρων και στα 10 πεδία. Ελήφθησαν μικροσκοπικές φωτογραφίες με τη χρήση Nikon ECLIPSE 80i φωτονικού μικροσκοπίου συνδεδεμένου σε 1.600 x 1.200 resolution digital camera. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pSTAT-1 (Tyr701) εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα και τους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων. Ως θετική έκφραση θεωρήθηκε η παρουσία της $\geq 1\%$ είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από καρκίνωμα, θυρεοειδούς και πνεύμονα σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Τους αρνητικούς μάρτυρες αποτέλεσαν τομές παραφίνης από το ίδιο καρκίνωμα, με τη διαφορά ότι σε αυτές, ενώ εφαρμόστηκαν όλα τα στάδια της μεθόδου, το πρωτογενές αντίσωμα αντικαταστάθηκε από TBS.

IV. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

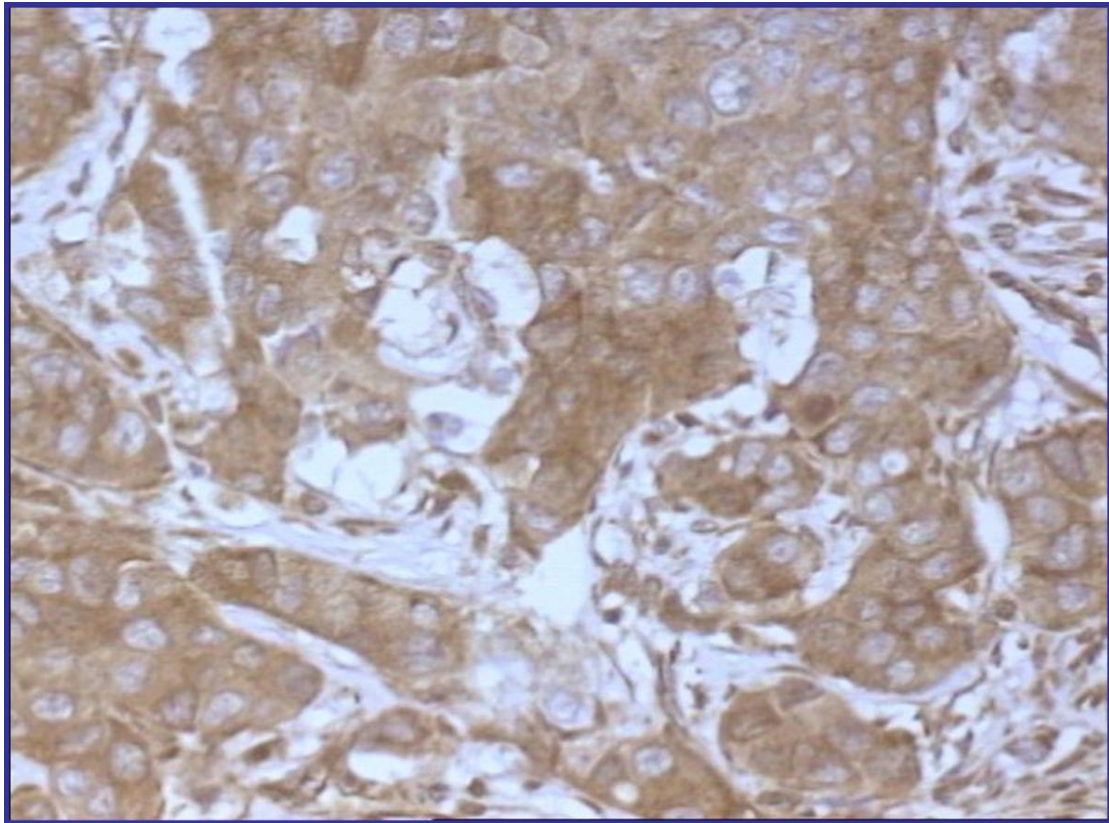
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση, στο σύνολο των περιπτώσεων όπου μελετήθηκε η έκφραση της ERK2 κινάσης, της ETS-1 πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης STAT-1. Προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση τους σε σχέση με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (εμμηνόπαυση, ιστολογικός τύπος, ιστολογικός και πυρηνικός βαθμός κακοήθειας, μέγεθος όγκου, λεμφαδενικές διηθήσεις, στάδιο νόσου, έκφραση ορμονικών υποδοχέων) εφαρμόστηκε μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση (Kruskal Wallis Test, Pearson's- X^2 , Fisher's Exact test) και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση [Logistic Regression Model (Μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης)].

Η στατιστική ανάλυση της επιβίωσης των ασθενών έγινε με μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση (Log Rank Test) βάσει της οποίας διαμορφώθηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες (Kaplan-Meier). Η διερεύνηση της ανεξάρτητης προγνωστικής σημασίας της έκφρασης της ERK2 κινάσης, της ETS-1 πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης STAT-1 και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων της μελέτης σε σχέση με την επιβίωση των ασθενών πραγματοποιήθηκε με πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση (Cox's proportional hazard regression model), βάσει της οποίας διαμορφώθηκαν και οι αντίστοιχες καμπύλες. Στις ως άνω δοκιμασίες στατιστική σημαντικότητα (p) της τάξης του $p \leq 0.05$ θεωρείται ως στατιστικά σημαντική.

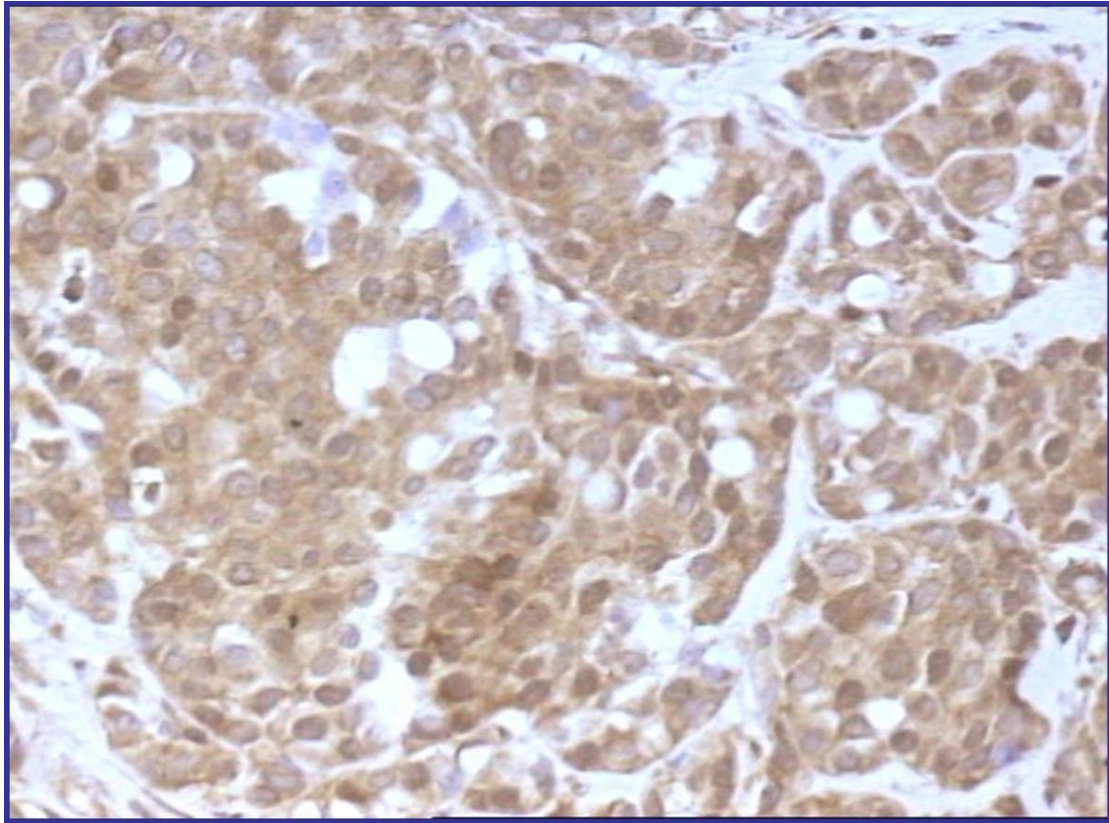
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ERK2 ΣΤΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ

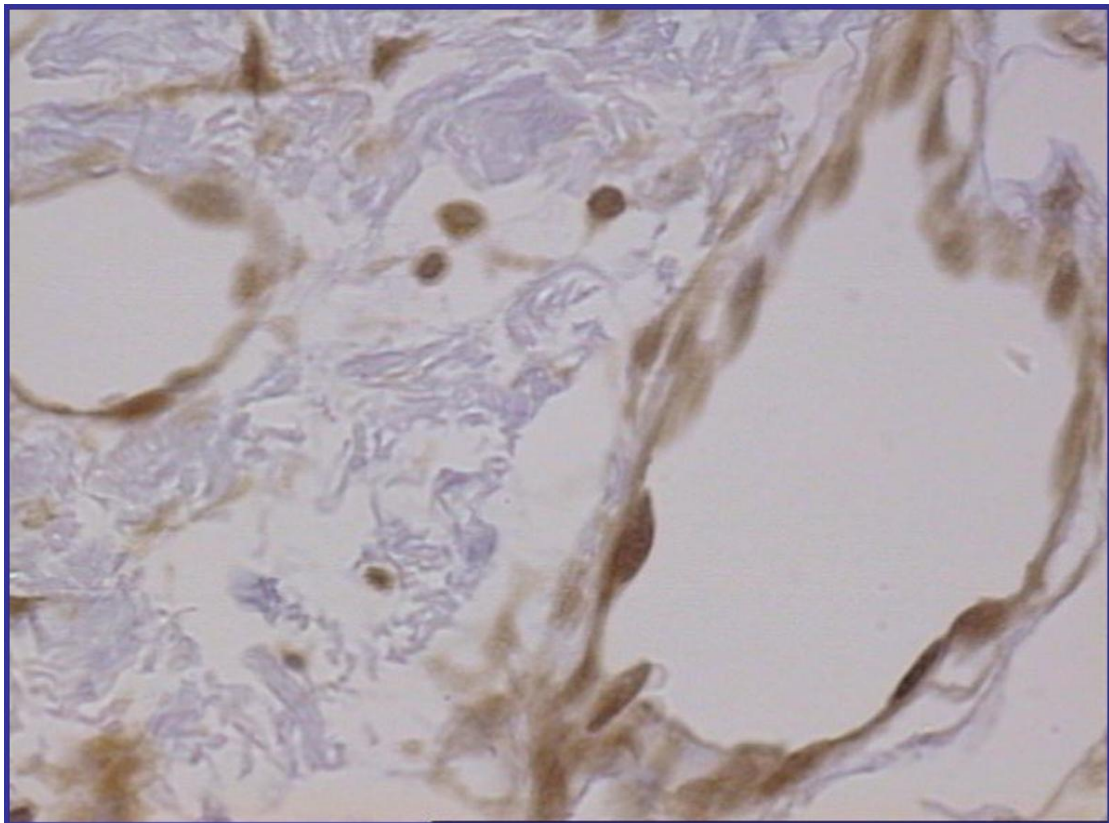
Η πρωτεΐνη **ERK2** παρουσίασε θετική κυτταροπλασματική έκφραση (**Εικόνα 14**) σε 57 από τις 151 περιπτώσεις (37.7%) που μελετήθηκαν, ενώ πυρηνική εντόπιση (**Εικόνα 15**) παρατηρήθηκε σε 29 από τις 151 περιπτώσεις (19.2%). Η ERK2 εμφάνισε στρωματική εντόπιση σε 89 από τις 151 περιπτώσεις (58.9%) και θετικότητα στο ενδοθήλιο (**Εικόνα 16**) σε 49 από τις 151 περιπτώσεις (32.5%). Παρατηρήθηκε χρώση και στο φυσιολογικό επιθήλιο (**Εικόνα 17**, θετικός εσωτερικός μάρτυρας).



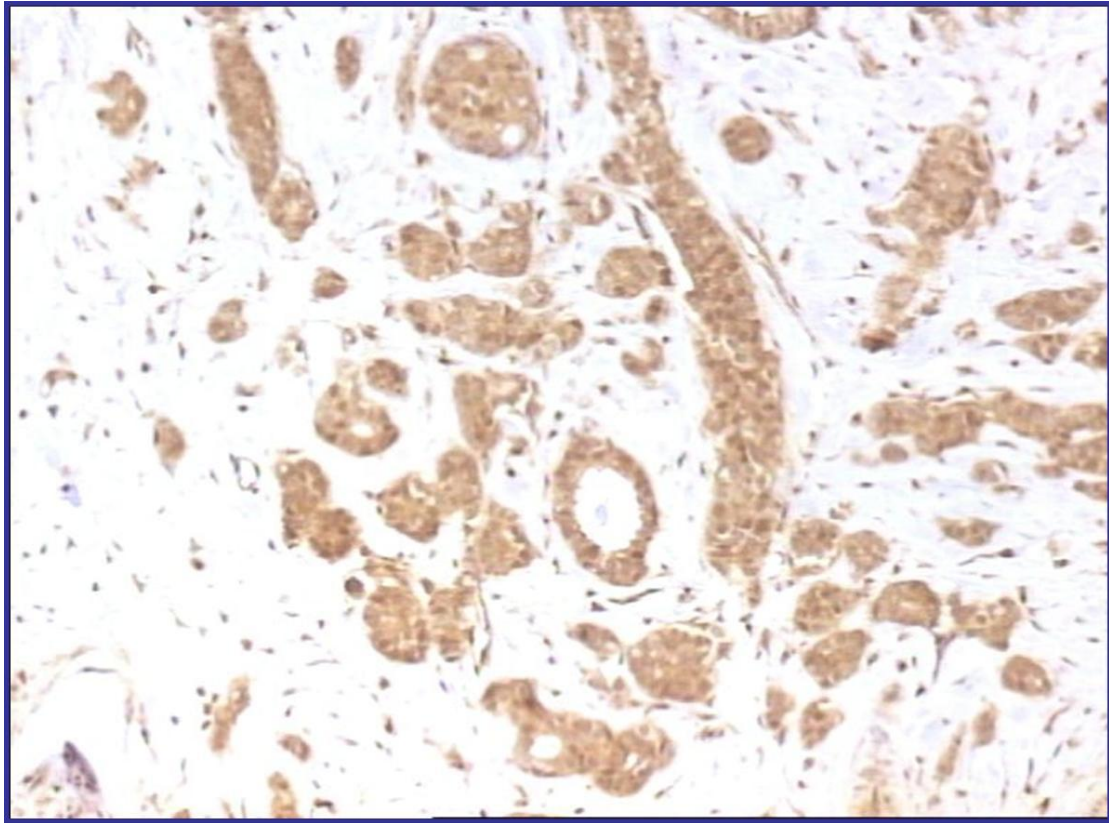
Εικόνα 14. Θετική κυτταροπλασματική χρώση (κυρίως) για ERK2 των καρκινικών κυττάρων του μαστού (ABC/HRP X400).



Εικόνα 15. Θετική χρώση για ERK2 στους πυρήνες (κυρίως) των καρκινικών κυττάρων του μαστού και σε ινοβλάστες του στρώματος (ABC/HRP X400).



Εικόνα 16. Θετική χρώση για ERK2 στο ενδοθήλιο (ABC/HRP X400).



Εικόνα 17. Χρώση για ERK2 του φυσιολογικού επιθηλίου του μαστού (ABC/HRP X250).

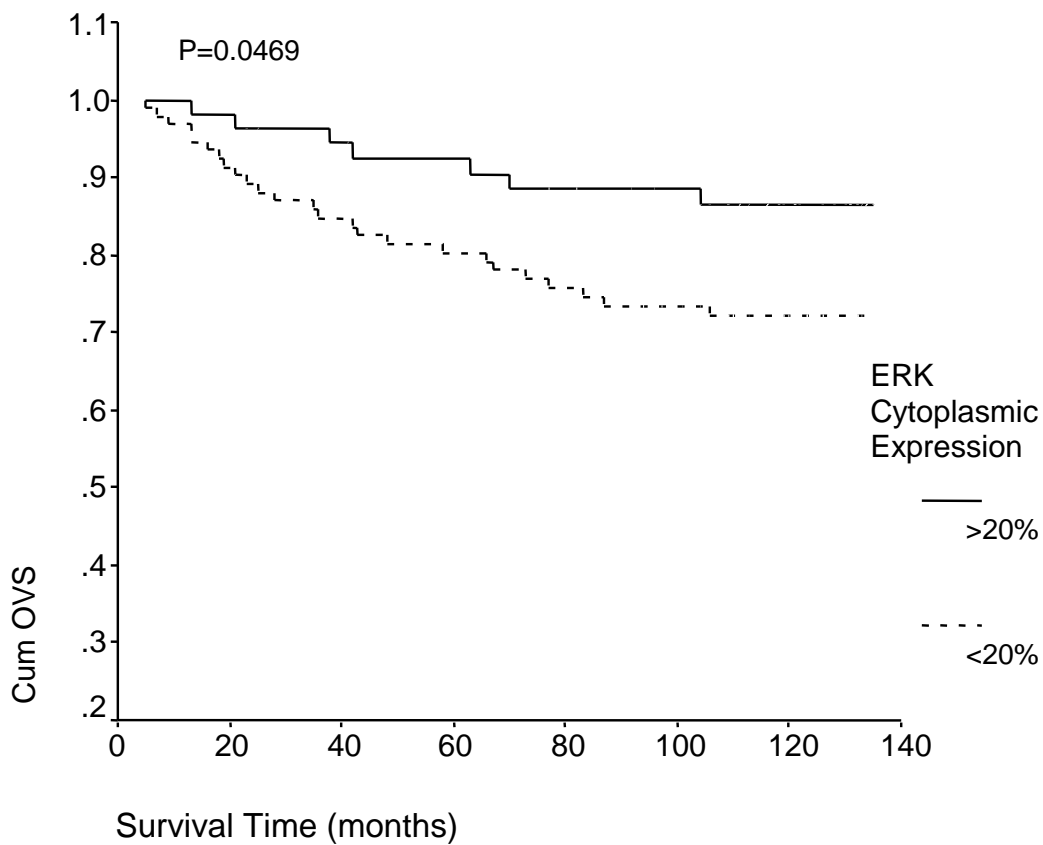
1. Έκφραση της ERK2 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων

α. Αυξημένη έκφραση ERK2 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων (>20%) παρουσιάζουν τα λοβιακά καρκινώματα του μαστού σε σχέση με τα πορογενή ($p=0.026$) στην πολυπαραγοντική ανάλυση [**Σχήμα 2**].

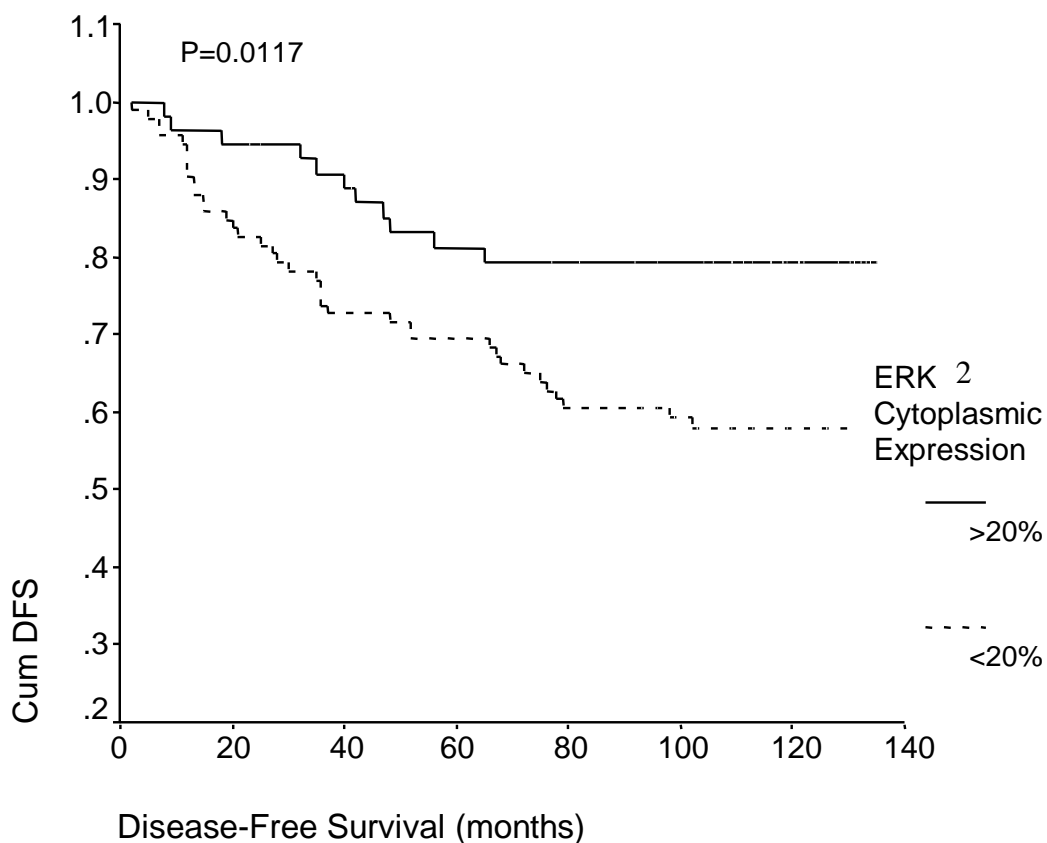
β. Η αυξημένη έκφραση της ERK2 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων στην μονοπαραγοντική ανάλυση σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης των ασθενών ($p=0.0469$) [**Σχήμα 3**] και μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερης νόσου επιβίωσης ($p=0.0117$) [**Σχήμα 4**]. Επίσης η αυξημένη έκφραση της ERK2 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων στην πολυπαραγοντική ανάλυση σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης των ασθενών ($p=0.002$ αντίστοιχα) [**Σχήμα 5**] και μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερης νόσου επιβίωσης ($p<0.0001$) [**Σχήμα 6**].

	B	SE	df	Sig	Exp(B)	95% C.I. for Exp(B) Lower Upper
Cytoplasmic ERK2						
Lobular carcinomas	1.142	0.512	1	0.026	3.132	1.148 8.541

Σχήμα 2 . Κυτταροπλασματική έκφραση ERK2 και ιστολογικός τύπος (πολυπαραγοντική ανάλυση).



Σχήμα 3 . Καμπύλη Kaplan-Meier ολικής επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της ERK2 στο κυτταρόπλασμα. Οι ασθενείς με ERK2>20% στο κυτταρόπλασμα έχουν καλύτερη ολική επιβίωση ($p=0.0469$).



Σχήμα 4. Καμπύλες Kaplan-Meier επιβίωσης ελεύθερη νόσου των ασθενών σε συνάρτηση με την ERK2 στο κυτταρόπλασμα. Οι ασθενείς με ERK2>20% στο κυτταρόπλασμα έχουν καλύτερη επιβίωση ελεύθερη νόσου ($p=0.0117$).

	B	SE	df	Sig	Exp(B)	95% C.I. for Exp(B) Lower Upper	
Overall survival							
Cytoplasmic ERK2	-2.143	0.685	1	0.002	0.117	0.031	0.449
Nuclear ERK2	1.032	0.503	1	0.040	2.808	1.047	7.528

Σχήμα 5. Πολυπαραγοντική ανάλυση: ERK2 και ολική επιβίωση.

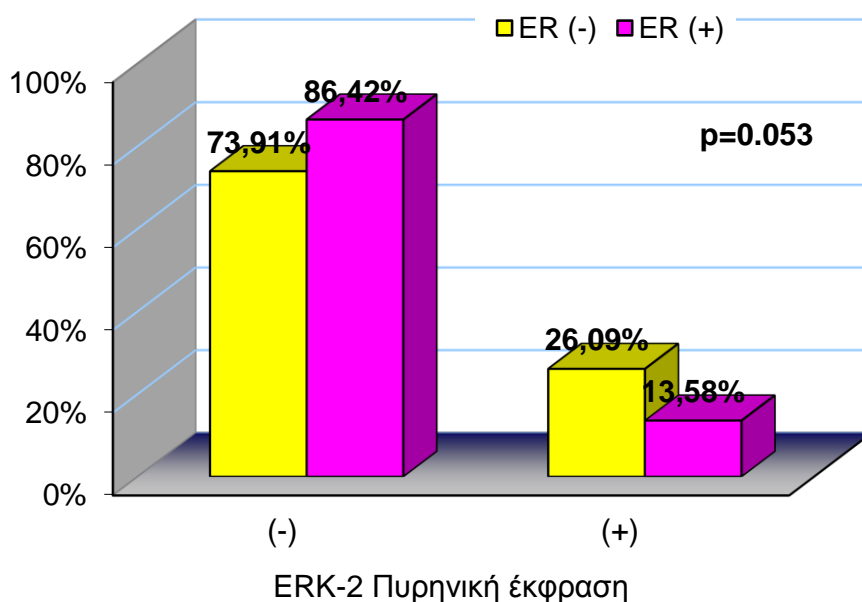
	B	SE	df	Sig	Exp(B)	95% C.I. for Exp(B) Lower Upper	
Disease-free survival							
Cytoplasmic ERK2	-1.627	0.449	1	0.000	0.197	0.081	0.474

Σχήμα 6. Πολυπαραγοντική ανάλυση: ERK2 και ελεύθερη νόσου επιβίωση.

2. Έκφραση της ERK2 στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων

α. Παρατηρήθηκε ανάστροφη συσχέτιση της πυρηνικής εντόπισης της ERK2 με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων τόσο στην μονοπαραγοντική ανάλυση ($p=0.053$) [Σχήμα 7^α και Πίνακας 9] όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση ($p=0.039$) [Σχήμα 7β].

β. Η εντόπιση της ERK2 στον πυρήνα σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης ($p=0.040$) στην πολυπαραγοντική ανάλυση [Σχήμα 5].



Σχήμα 7α. Πυρηνική έκφραση ERK2 και οιστρογονικοί υποδοχείς (μονοπαραγοντική ανάλυση).

	B	SE	df	Sig	Exp(B)	95% C.I. for Exp(B) Lower Upper
Nuclear ERK2						
ER	-0.971	0.471	1	0.039	0.379	0.151 0.953

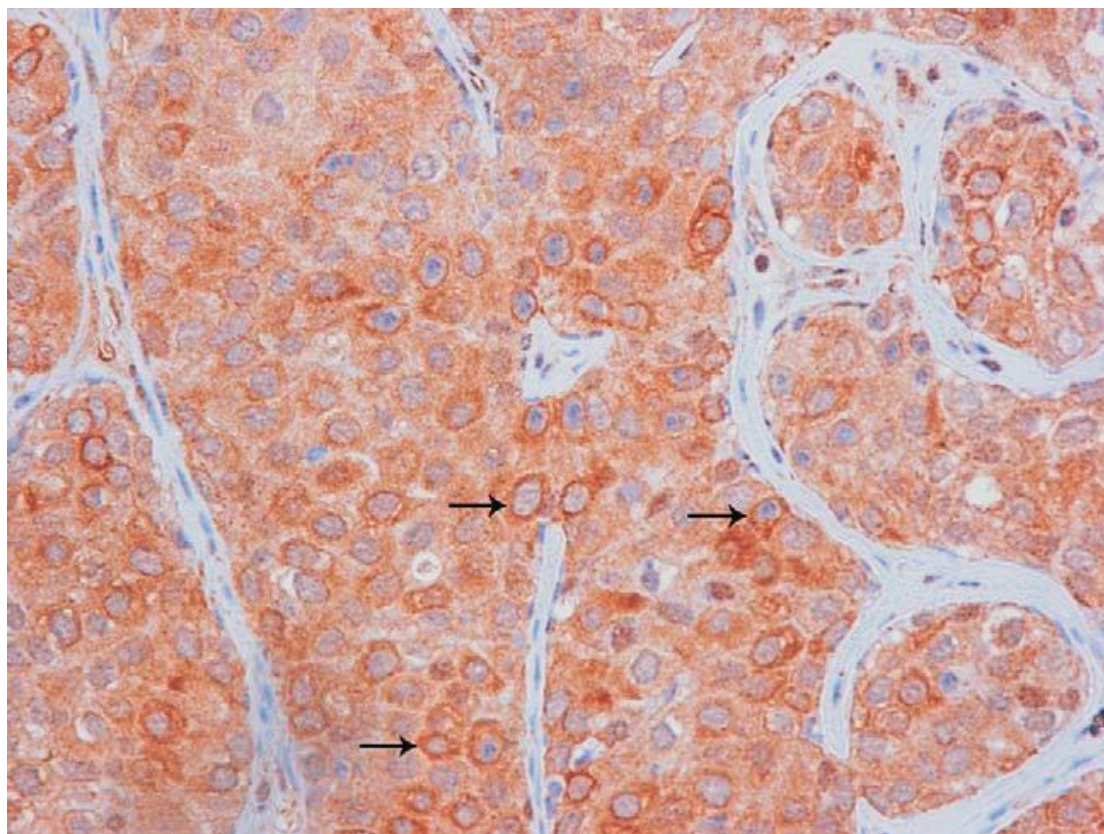
Σχήμα 7β. Πυρηνική έκφραση ERK2 και οιστρογονικοί υποδοχείς (πολυπαραγοντική ανάλυση).

		ERK2 πυρηνική εντόπιση (θετικές περιπτώσεις)				ERK2 κυτταροπλασματική εντόπιση (θετικές περιπτώσεις)			
		TOTAL	N	%	P	N	%	P	
Εμμηνόπαυση	Προ εμμηνόπαυσης	53	11	20.8%	NS	21	39.6%	NS	
	Μετά εμμηνόπαυση	98	18	18.4%		36	36.7%		
Στάδιο	1	27	5	18.5%	NS	10	37.0%	NS	
	2	98	17	17.3%		37	37.8%		
	3	24	7	29.2%		9	37.5%		
Πυρηνικό Grade	1	57	8	14.0%	NS	24	42.1%	NS	
	2	51	12	23.5%		22	43.1%		
	3	42	9	21.4%		11	26.2%		
Ιστολογικό Grade	1	21	5	23.8%	NS	6	28.6%	NS	
	2	68	9	13.2%		26	38.2%		
	3	32	9	28.1%		12	37.5%		
Ιστολογικός Τύπος	Πορογενής	121	23	19.0%	NS	44	36.4%	NS	
	Λοβιακός	29	6	20.7%		13	44.8%		
Μέγεθος όγκου	< 2 cm	37	9	24.3%	NS	14	37.8%	NS	
	2-5 cm	89	12	13.5%		32	36.0%		
	> 5 cm	22	7	31.8%		9	40.9%		
Λεμφαδένες	Μη διηθημένοι	61	10	16.4%	NS	26	42.6%	NS	
	Διηθημένοι	88	19	21.6%		30	34.1%		
ER	Αρνητικοί	69	18	26.1%	0.053	23	33.3%	NS	
	Θετικοί	81	11	13.6%		33	40.7%		
PR	Αρνητικοί	75	18	24.0%	NS	25	33.3%	NS	
	Θετικοί	75	11	14.7%		31	41.3%		

Πίνακας 9. Ανάστροφη σχέση ανάμεσα στην πυρηνική εντόπιση της ERK2 και στην παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (p=0.053).

B. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ETS-1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ

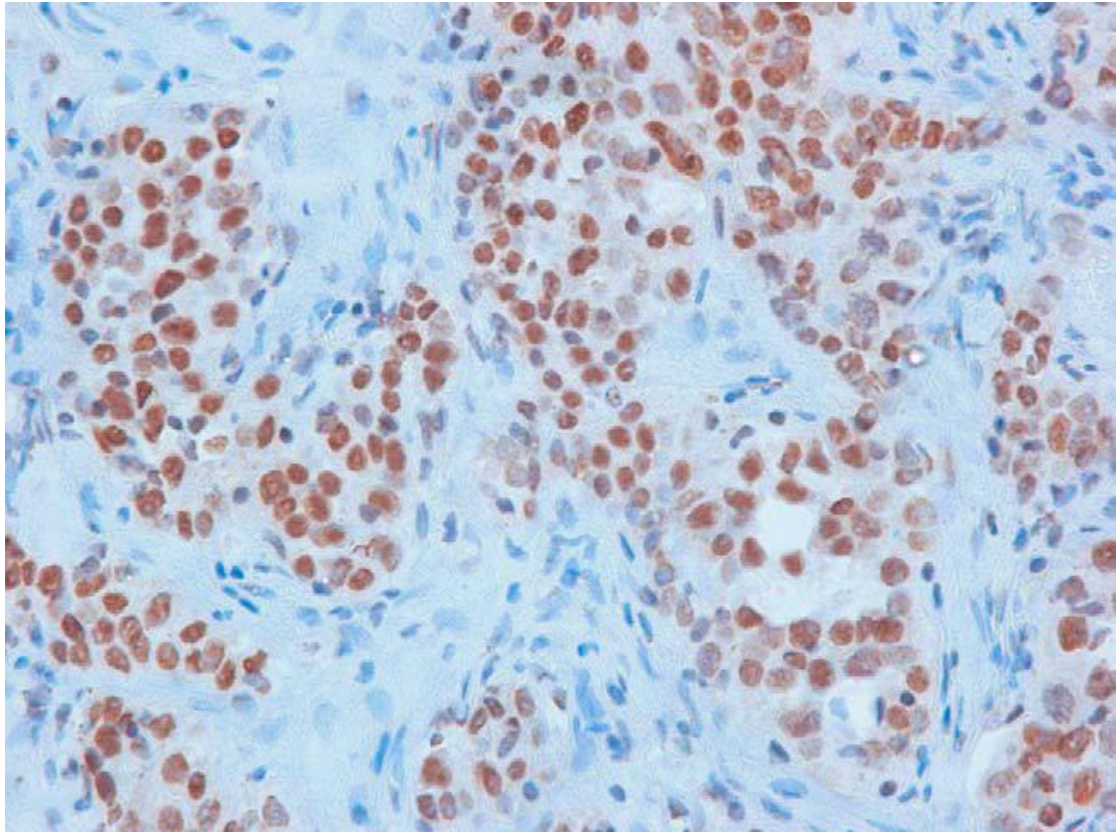
Η ETS-1 πρωτεΐνη προσδιορίστηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 18) σε ποσοστό 77.9%. Επίσης εκφράστηκε σε πυρήνες καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 19) σε ποσοστό 46.3%, στις ινοβλάστες του στρώματος (Εικόνα 20) και το ενδοθήλιο του όγκου σε ποσοστό 41.6% και 62.4% αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις το φυσιολογικό επιθήλιο του μαστού ήταν αρνητικό στην έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης.



Εικόνα 18. Κυτταροπλασματική κυρίως εντόπιση της ETS-1 πρωτεΐνης σε καρκινικά κύτταρα, με αυξημένη περιπυρηνική εντόπιση (βέλη) σε διηθητικό καρκίνο μαστού (ABC/HRP X400).

1. Έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων

α. Η έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα βρέθηκε να συσχετίζεται ανάστροφα με τον πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό κακοήθειας ($p=0.004$ και $p=0.033$ αντίστοιχα) [Πίνακας 10 και Σχήμα 8 και Σχήμα 9].



Εικόνα 19. Έντονη χρώση ETS-1 κυρίως σε πυρήνες καρκινικών κυττάρων διηθητικού καρκίνου μαστού (ABC/HRP X 400).

2. Έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων

α. Η πυρηνική έκφραση της ETS-1 συσχετίστηκε παράλληλα με μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης στις **μετα-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς** ($p=0.032$) [Σχήμα 10].

3. Έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στις στρωματικές ινοβλάστες

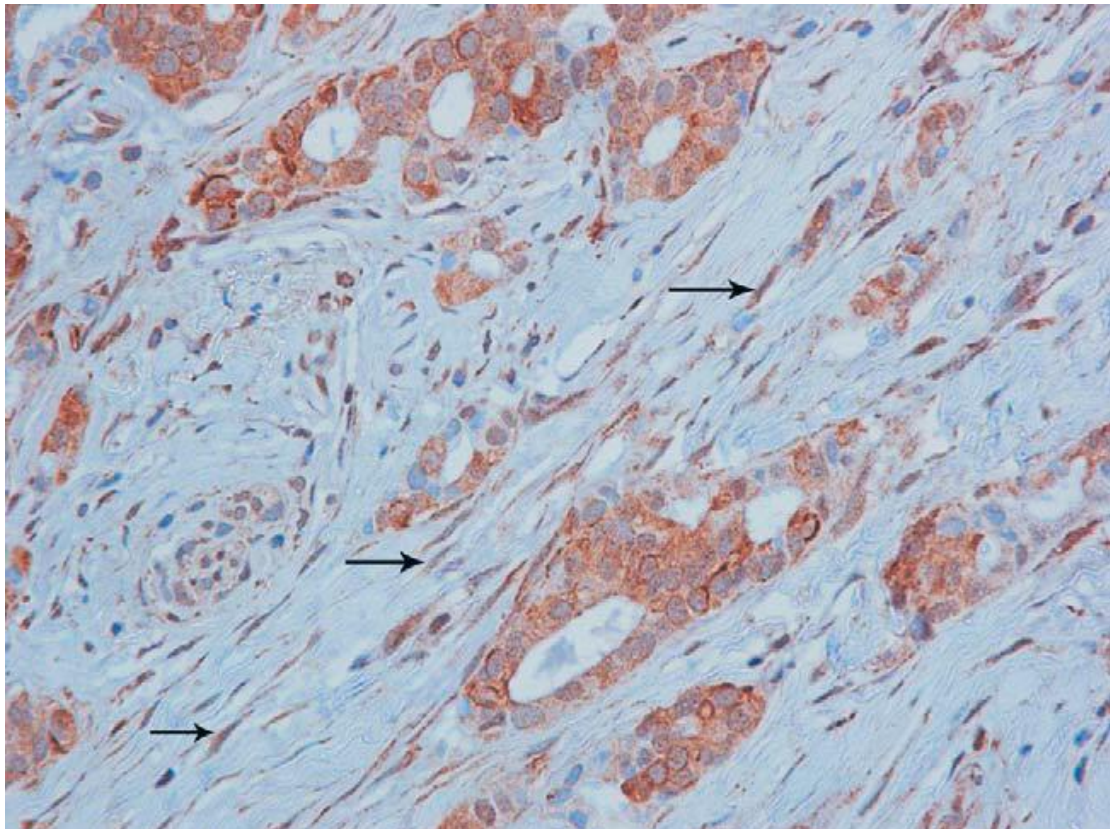
α. Η έκφραση της ETS-1 στις ινοβλάστες βρέθηκε να συσχετίζεται ανάστροφα με τους οιστρογονικούς υποδοχείς ($p=0.003$) [Πίνακας 11].

	Σύνολο	ETS-1 έκφραση στον πυρήνα			ETS-1 έκφραση στο κυτταρόπλασμα				
		≥5%	%	p	20-40%	%	≥40%	%	p
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση									
Προεμμηνοπαυσιακές	51	22	43.1	NS	17	33.3	22	43.1	NS
Μετα-εμμηνοπαυσιακές	98	51	52		38	38.8	34	34.7	
Στάδιο									
1	26	8	30.8	NS	7	26.9	10	38.5	NS
2	98	54	55.1		37	37.8	41	41.8	
3	22	9	40.9		11	50.0	5	22.7	
Ιστολογικός τύπος									
Πορογενές	115	59	51.3	NS	43	37.4	43	37.4	NS
Λοβιακό	31	12	38.7		11	35.5	13	41.9	
Πυρηνικό grade									
1	55	21	38.2	NS	21	38.2	28	50.9	0.004
2	51	26	51.0		23	45.1	16	31.4	
3	40	25	62.5		11	27.5	12	30.0	
Ιστολογικό grade									
1	17	8	47.1	NS	9	52.9	7	41.2	0.033
2	67	35	52.2		19	28.4	30	44.8	
3	31	16	51.6		15	48.4	6	19.4	
Μέγεθος όγκου									
≤2 cm	33	12	36.4	NS	11	33.3	13	39.4	NS
2-5 cm	93	51	54.8		37	39.8	35	37.6	
≥5 cm	19	8	42.1		6	31.6	8	42.1	
Λεμφαδένες									
Μη διηθημένοι	58	28	48.3	NS	22	37.9	21	36.2	NS
Διηθημένοι	88	43	48.9		33	37.5	35	39.8	
ER									
Αρνητικοί	66	39	59.1	NS	22	33.3	25	37.9	NS
Θετικοί	80	33	41.3		31	38.8	31	38.8	
PR									
Αρνητικοί	68	37	54.4	NS	20	29.4	28	41.2	NS
Θετικοί	78	35	44.9		33	42.3	28	35.9	

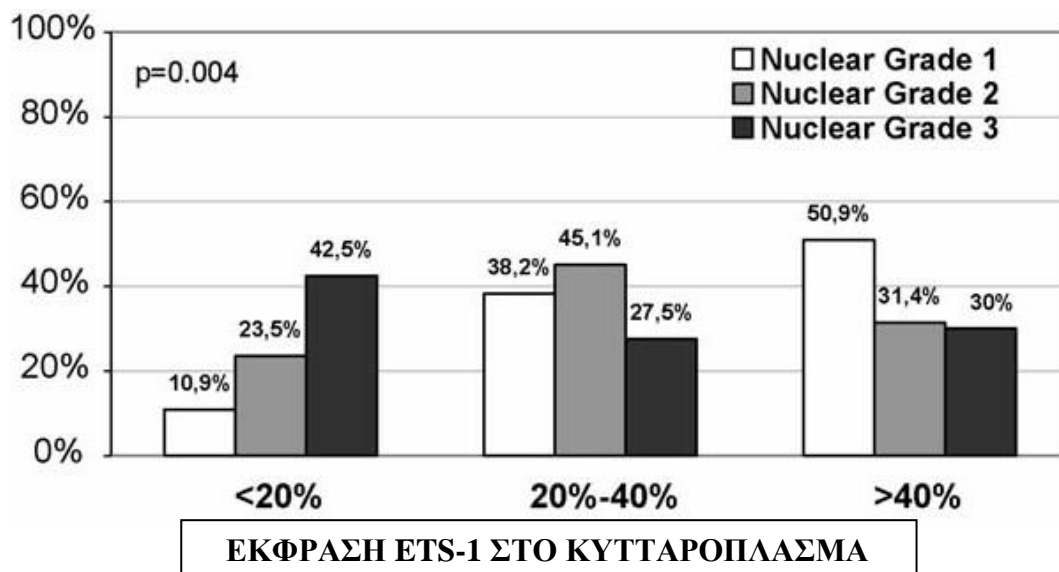
Πίνακας 10. Συσχέτιση πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης ETS-1 πρωτεΐνης με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, ER (οιστρογονικούς υποδοχείς), PR (προγεστερονικούς υποδοχείς).

ETS-1 έκφραση στο στρώμα			
	2-3	%	p
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση			
Προεμμηνοπαυσιακές	27	52.9	NS
Μετα-εμμηνοπαυσιακές	35	35.7	
Στάδιο			
1	13	50.0	NS
2	38	38.8	
3	11	50.0	
Ιστολογικός τύπος			
Πορογενές	49	42.6	NS
Λοβιακό	12	38.7	
Πυρηνικό grade			
1	10	58.8	NS
2	25	37.3	
3	14	45.2	
Ιστολογικό grade			
1	19	34.5	NS
2	22	43.1	
3	21	52.5	
Μέγεθος όγκου			
≤2 cm	14	42.4	NS
2-5 cm	41	44.1	
≥5 cm	6	31.6	
Λεμφαδένες			
Μη διηθημένοι	20	34.5	NS
Διηθημένοι	42	47.7	
ER			
Αρνητικοί	37	56.1	0.003
Θετικοί	24	30.0	
PR			
Αρνητικοί	34	50.0	NS
Θετικοί	27	34.6	

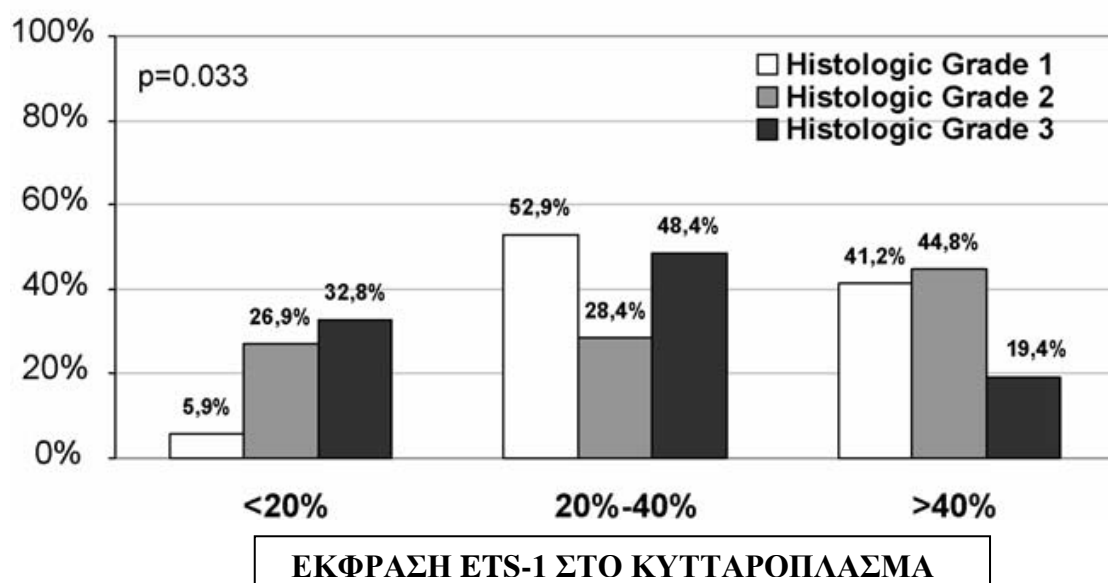
Πίνακας 11. Συσχέτιση έκφρασης ETS-1 πρωτεΐνης στρώματος με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, ER (οιστρογονικούς υποδοχείς), PR (προγεστερονικούς υποδοχείς).



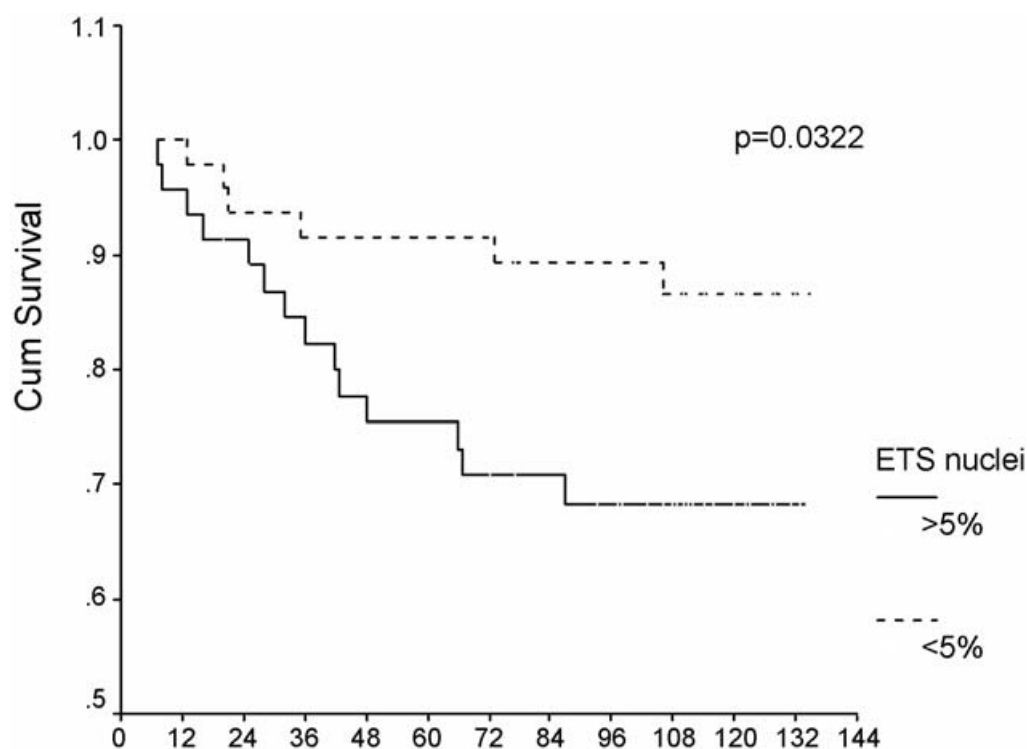
Εικόνα 20. Εντόπιση της ETS-1 σε κακοήθη κύτταρα και στρωματικούς ινοβλάστες (βέλη) διηθητικού καρκίνου μαστού (ABC/HRP X400).



Σχήμα 8. Έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων σε συνάρτηση με την έκφραση του πυρηνικού βαθμού κακοήθειας. (αντίστροφη συσχέτιση).



Σχήμα 9. Έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων σε συνάρτηση με την έκφραση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας. (αντίστροφη συσχέτιση).



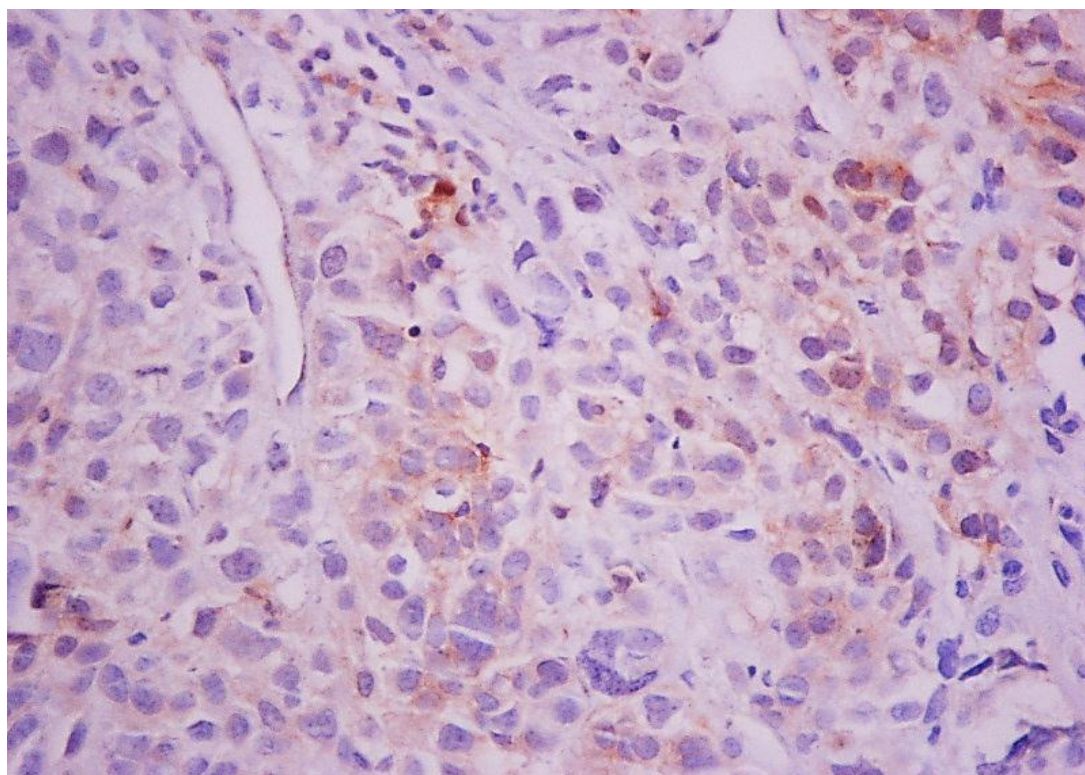
Σχήμα 10. Συσχέτιση της πυρηνικής έκφρασης ETS-1 στην συνολική επιβίωση μετα-εμμηνοπαυσιακών ασθενών (καμπύλη επιβίωσης KAPLAN-MEIER).

Γ. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ pSTAT-1 ΣΤΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ

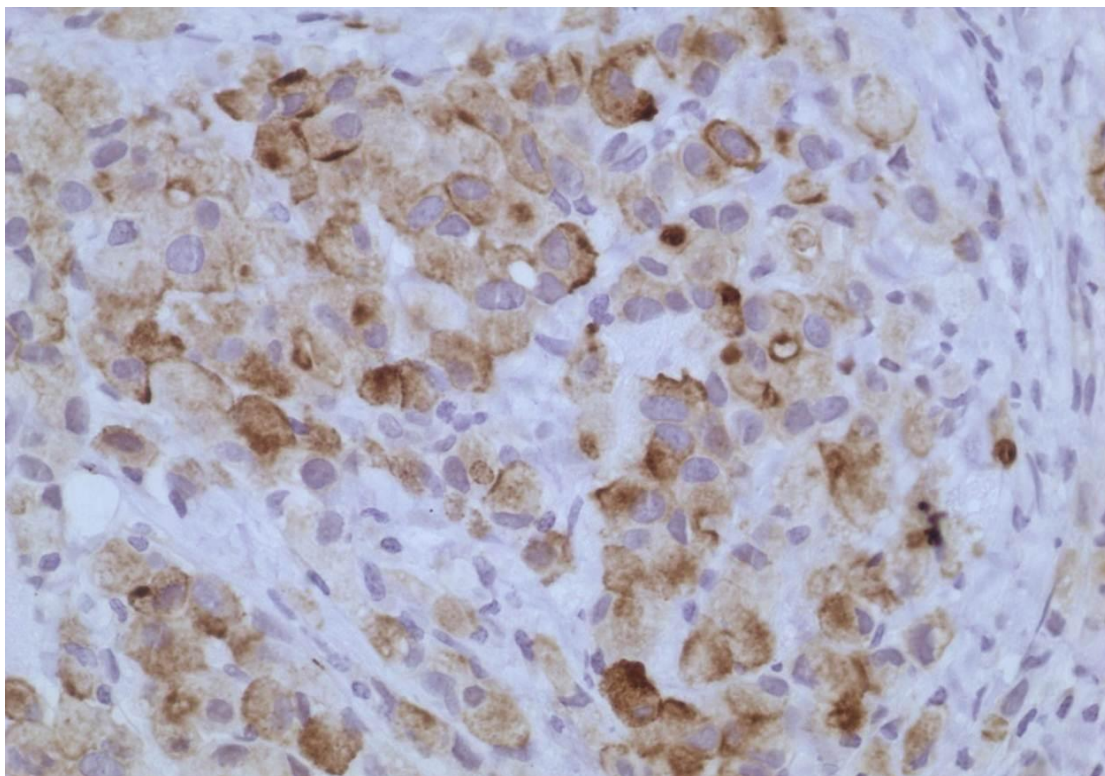
Η pSTAT-1 πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε στο κυτταρόπλασμα (Εικόνες 21,22) και στον πυρήνα (Εικόνες 23,24) των καρκινικών κυττάρων σε 20 (11,6%) και 15 (8,6%) περιπτώσεις αντίστοιχα. Δύο περιπτώσεις (1,2%) εμφάνισαν τόσο κυτταροπλασματική όσο και πυρηνική έκφραση της pSTAT-1.

1. Στις προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς παρατηρήθηκε παράλληλη συσχέτιση της κυτταροπλασματικής εντόπισης της pSTAT-1 πρωτεΐνης με: την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων ($p=0,008$) [Σχήμα 11] και το στάδιο της νόσου ($p=0,014$), [Σχήμα 12].

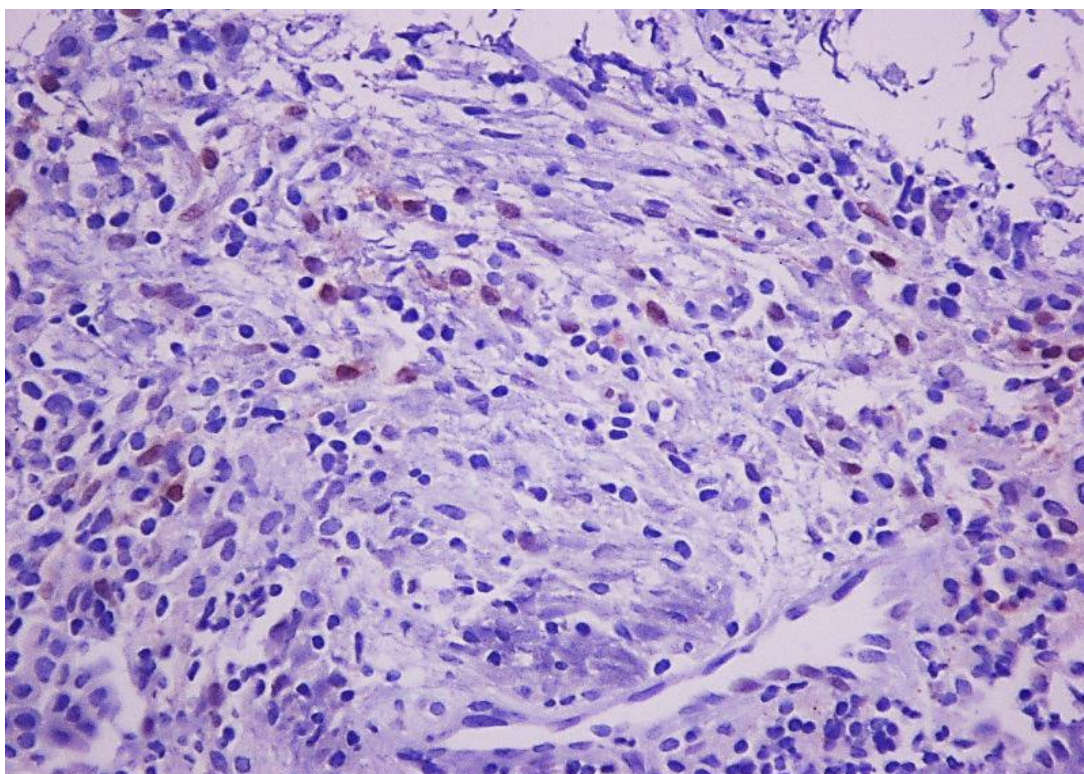
2. Σε μετα-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς, δεν αποκαλύφθηκε καμία συσχέτιση με τις προαναφερθείσες παραμέτρους τόσο για την κυτταροπλασματική όσο και για την πυρηνική εντόπιση της pSTAT-1 πρωτεΐνης.



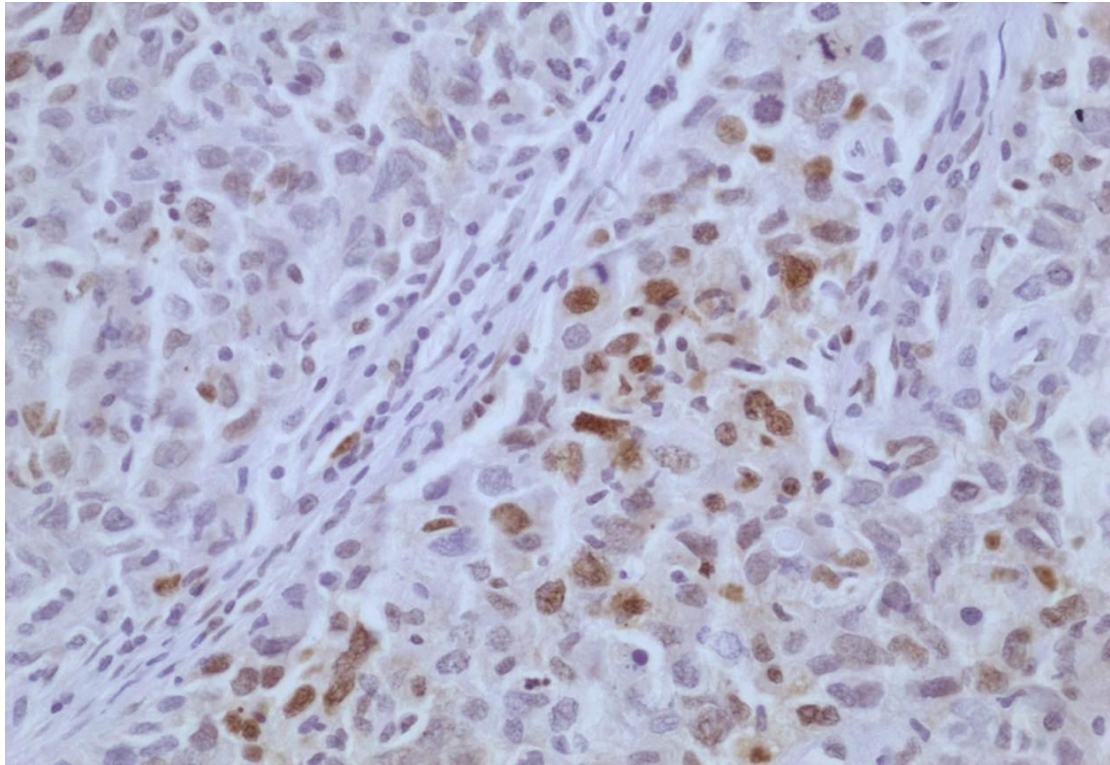
Εικόνα 21. Μέτρια κυτταροπλασματική εντόπιση της pSTAT-1 πρωτεΐνης σε διηθητικό καρκινώμα μαστού (ABC/HRP x 250).



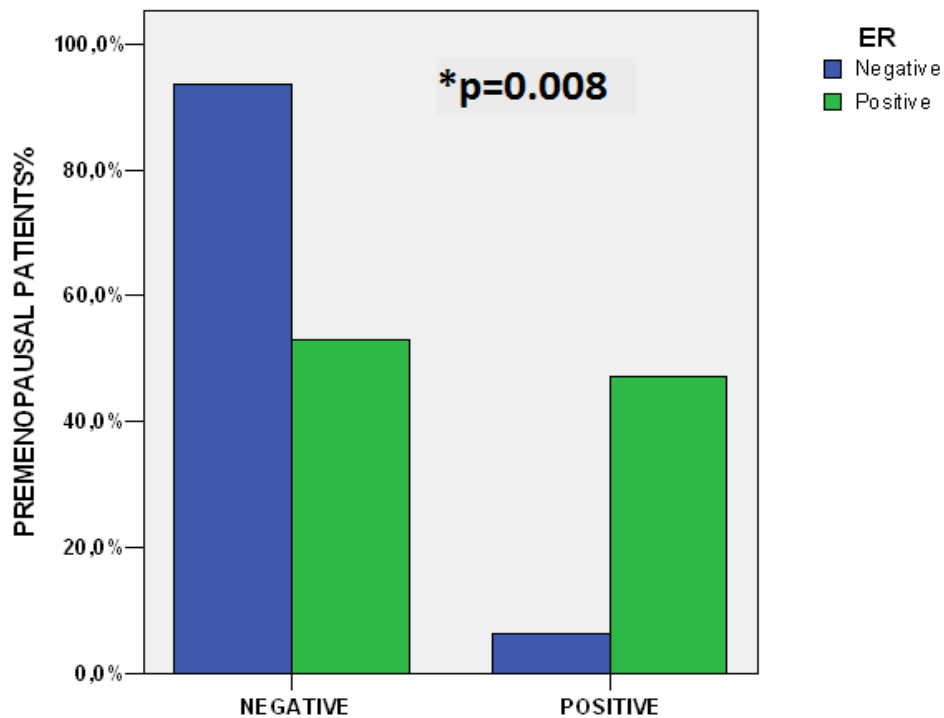
Εικόνα 22. Έντονη κυτταροπλασματική εντόπιση της pSTAT-1 πρωτεΐνης σε διηθητικό καρκίνωμα μαστού (ABC/HRPx 400).



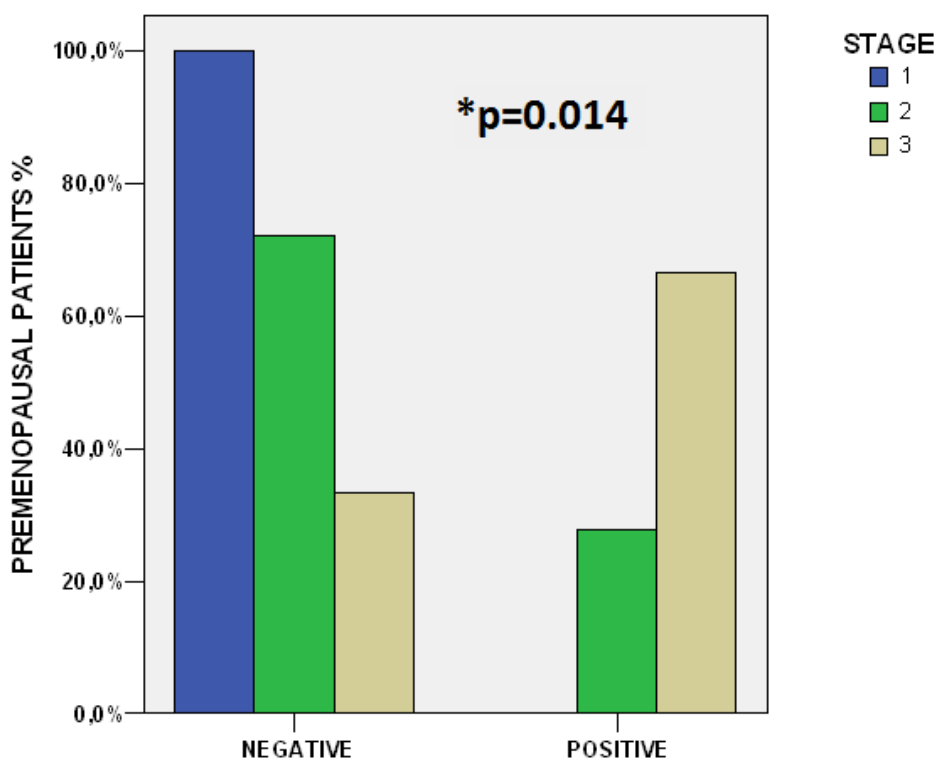
Εικόνα 23. Έκφραση της pSTAT-1 πρωτεΐνης σε πυρήνες διηθητικού καρκινώματος μαστού (ABC/HRPx 100).



Εικόνα 24. Έκφραση της pSTAT-1 πρωτεΐνης σε αρκετούς πυρήνες διηθητικού καρκινώματος μαστού (ABC/HRPx 250).



Σχήμα 11. Σχηματική απεικόνιση της παράλληλης συσχέτισης της pSTAT-1 πρωτεΐνης με τους οιστρογονικούς υποδοχείς.



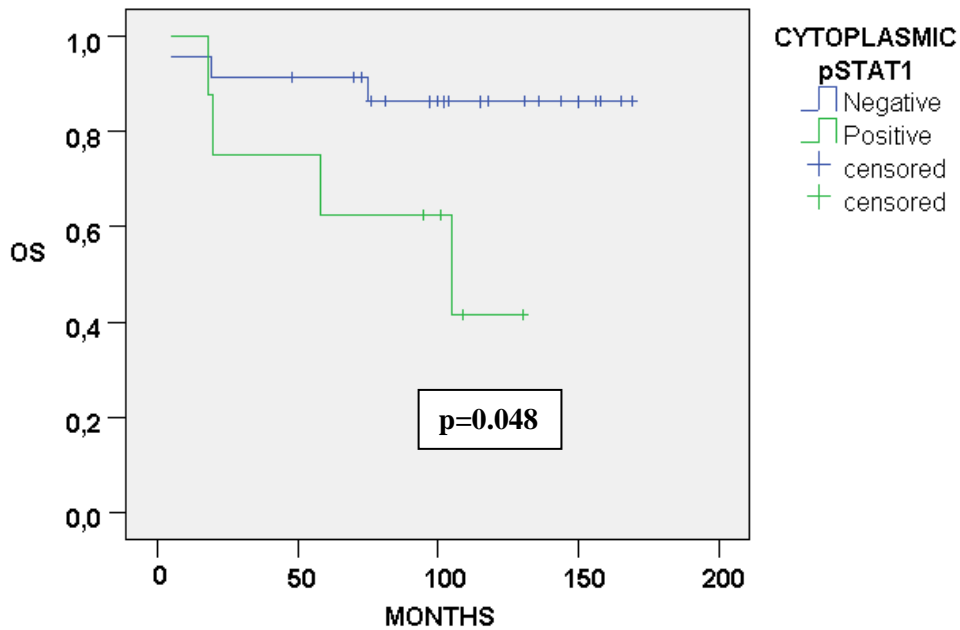
Σχήμα 12. Σχηματική απεικόνιση της παράλληλης συσχέτισης της pSTAT-1 πρωτεΐνης με το στάδιο της νόσου.

3. Έκφραση pSTAT-1 πρωτεΐνης και συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών

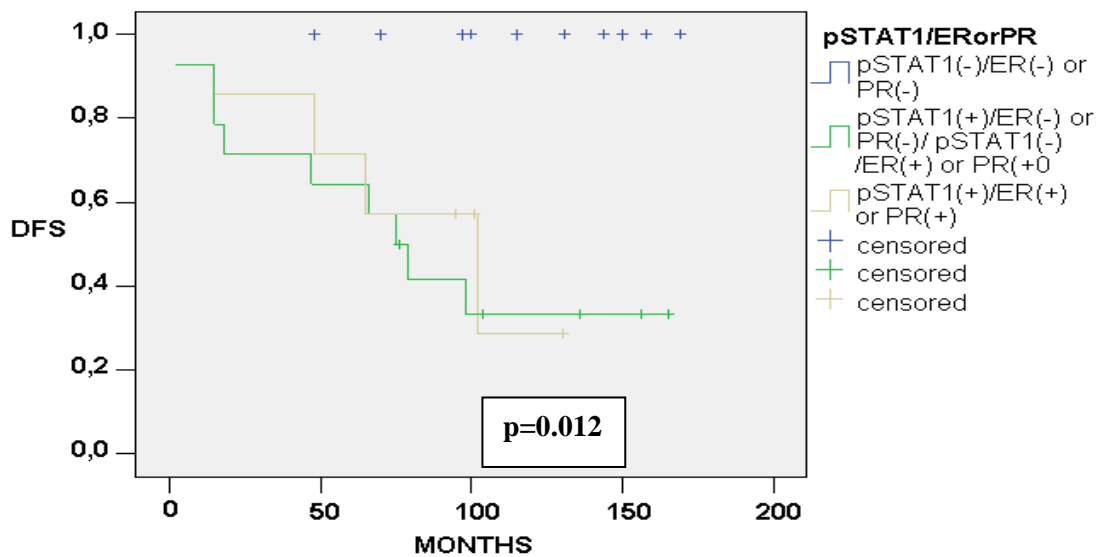
Στο **σύνολο του δείγματος** δεν παρατηρήθηκε επίδραση της έκφρασης της pSTAT-1 πρωτεΐνης στο διάστημα ολικής και ελευθέρως νόσου επιβίωσης (μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση).

Στις **προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς**, η κυτταροπλασματική εντόπιση της pSTAT-1 συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης ($p=0,048$) (**Σχήμα 13**). Προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς με φαινότυπο ταυτόχρονης έκφρασης pSTAT-1/ER ή pSTAT-1/PR εμφάνισαν μικρότερο διάστημα ελευθέρως νόσου επιβίωση ($p=0,012$) (**Σχήμα 14**).

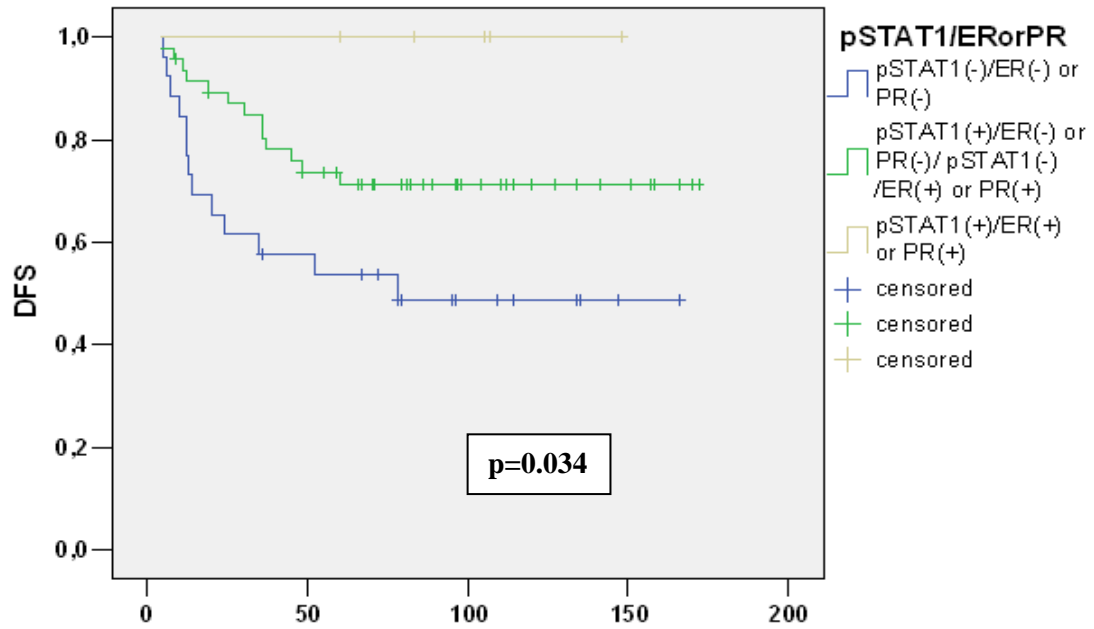
Στις **μετα-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς**, αναδείχθηκε ότι όσες είχαν φαινότυπο ταυτόχρονης έκφρασης pSTAT-1/ER ή pSTAT-1/PR εμφάνισαν μεγαλύτερο διάστημα ελευθέρως νόσου επιβίωση ($p=0,034$) (**Σχήμα 15**).



Σχήμα 13. Επίδραση της κυτταροπλασματικής εντόπισης της pSTAT-1 πρωτεΐνης στην ολική επιβίωση προ-εμμηνοπαυσιακών ασθενών με καρκίνο του μαστού.



Σχήμα 14. Επίδραση του φαινοτύπου pSTAT-1/ER ή pSTAT-1/PR στο διάστημα ελευθέρως νόσου επιβίωση στις προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς με καρκίνο του μαστού.



Σχήμα 15. Επίδραση του φαινοτύπου pSTAT-1/ER ή pSTAT-1/PR στο διάστημα ελευθέρως νόσου επιβίωση στις μετα-εμμηνόπαυσιακές ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση της ERK2 κινάσης, της ETS-1 πρωτεΐνης και της pSTAT-1 σε μια σειρά 151 διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Η **ERK2 κινάση** ανιχνεύθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα (37.7%) και σε ένα μικρότερο αλλά σημαντικό βαθμό στον πυρήνα (19.2%). Έκφραση της ERK2 βρέθηκε επίσης στις ινοβλάστες του στρώματος και στο ενδοθήλιο. Πριν τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων θα πρέπει να αναφερθεί ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύει όλη την ERK2 κινάση και όχι μόνο την φωσφορυλιωμένη μορφή, που σημαίνει ότι ανιχνεύει και την ενεργό και την ανενεργό μορφή της κινάσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι μετά την ενεργοποίηση της η κινάση ERK2, και αφού διμερισθεί, μετατοπίζεται στον πυρήνα (Lenormand και συν. 1993, Gonzalez και συν. 1993, Khokhlatchev και συν. 1998, Brunet και συν. 1999), μπορεί να υποθέσει κανείς ότι η πυρηνική εντόπιση της ERK2 κινάσης αντιπροσωπεύει την ενεργό μορφή του ενζύμου, ενώ η κυτταροπλασματική εντόπιση αντιπροσωπεύει την αδρανή μορφή. Πάντως η προσέγγιση αυτή αποτελεί απλούστευση εφόσον: α) Υπάρχουν δεδομένα ότι η πυρηνική εντόπιση της ERK2 δεν απαιτεί ούτε φωσφορυλίωση της ούτε να έχει δραστηριότητα κινάσης (Matsubayashi και συν. 2001), όπως και ότι η ERK2 μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα με παθητική διάχυση (Shibayama και συν. 2002, Adachi και συν. 1999) β) Υπάρχουν ενδείξεις ότι όταν ενεργοποιηθεί η ERK2 κατευθύνει ένα σημαντικό τμήμα της δράσης της εκτός του πυρήνα, ρυθμίζοντας είτε την δυναμική του κυτταροσκελετού είτε την έκκριση των λυσοσωματίων (Wunderlich και συν. 2001) και γ) αν και όλη η ρύθμιση της μεταγραφής που εξαρτάται από την φωσφορυλίωση αναμένεται να απαιτεί πυρηνική εντόπιση των σχετικών κινασών, σε ορισμένες περιπτώσεις, κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα έως ότου ενεργοποιηθούν, και σαν αποτέλεσμα μπορεί να τροποποιούνται με δεσμό σθένους όσο βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Mcfarlane και συν. 1999). Με άλλα λόγια, μπορούμε να δεχθούμε με ορισμένες προϋποθέσεις ότι η πυρηνική εντόπιση της ERK2 κινάσης αντιπροσωπεύει το ενεργό ένζυμο, ενώ η κυτταροπλασματική εντόπιση αντιπροσωπεύει και την ενεργό και την ανενεργό μορφή της πρωτεΐνης στην παρούσα μελέτη. Το αποτέλεσμα μας που αναφέρεται στην έκφραση της ERK2 στο κυτταρόπλασμα είναι σε συμφωνία με αυτό των Sivaraman και συν. (1997), οι οποίοι χρησιμοποιώντας RT-PCR και ανοσοϊστοχημεία βρήκαν υπερέκφραση του mRNA

της MAP κινάσης και έντονη ανοσοϊστοχημική χρώση αντίστοιχα, στο κυτταρόπλασμα καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων και σε πρωτοπαθή και σε μεταστατικά καρκινώματα του μαστού, προτείνοντας για πρώτη φορά τον ρόλο των MAP κινασών σε καρκίνο μαστού του ανθρώπου.

Στην παρούσα μελέτη η πολυπαραγοντική ανάλυση με μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης, έδειξε ότι η κυτταροπλασματική έκφραση της ERK2 είναι συχνότερη σε λοβιακά παρά σε πορογενή καρκινώματα ($p=0.026$). Το δεδομένο αυτό υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή της ενεργοποίησης της ERK2 στην παθογένεση ιδίως των λοβιακών καρκινωμάτων και επιβεβαιώνει τον διαφορετικό φαινότυπο των δύο αυτών τύπων καρκίνου.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ανάστροφη συσχέτιση μεταξύ της πυρηνικής εντόπισης της ERK2 και των οιστρογονικών υποδοχέων, στην μονοπαραγοντική και στην πολυπαραγοντική ανάλυση ($p=0.053$ και $p=0.032$ αντίστοιχα). Το ερώτημα κατά πόσον και πώς σχετίζονται λειτουργικά η ERK2 και οιστρογονικοί υποδοχείς δεν έχει διασαφηνισθεί ακόμη. Αν και έχει δειχθεί μια έμμεση διέγερση των MAP κινασών από πυρηνικούς υποδοχείς στεροειδών (Kim-Schulze και συν. 1998, Kaulsay και συν. 1999), άλλες μελέτες υποδηλώνουν ότι η οιστραδιόλη μπορεί να προωθήσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των MAP κινασών (Bonarace και συν. 1996, Jeng και συν. 2000). Τα ευρήματά μας ενισχύονται από αυτά των Gee και συν. (2001) που αναφέρουν μια ανάστροφη τάση μεταξύ της φωσφορυλιωμένης μορφής της MAPK και της κατάστασης των οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκινώματα μαστού.

Όσον αφορά την επιβίωση, η πυρηνική εντόπιση της ERK2 βρέθηκε να συσχετίζεται με μη ευνοϊκή ολική επιβίωση ($p=0.040$) στην πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται από αυτά των Gee και συν. (2001) που χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της ERK2 παρατήρησαν ότι η μειωμένη ολική επιβίωση σχετίζεται με την θετική έκφραση της φωσφορυλιωμένης ERK2 κινάσης στον πυρήνα. Η ομοιότητα των αποτελεσμάτων αυτών με των δικών μας, ενισχύει κατά την γνώμη μας, την επισήμανση ότι η πυρηνική εντόπιση της ERK2 αντιπροσωπεύει την φωσφορυλιωμένη και ενεργό μορφή του ενζύμου. Παρόμοιες μελέτες δεν αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

Σε αντίθεση με την πυρηνική εντόπιση, η κυτταροπλασματική έκφραση της ERK2 συσχετιζόταν με καλύτερη ελεύθερη νόσου και ολική επιβίωση των ασθενών τόσο στην μονοπαραγοντική ($p=0.0117$ και $p=0.0469$ αντίστοιχα) όσο και στην

πολυπαραγοντική ανάλυση ($p=0.002$ και $p<0.0001$ αντίστοιχα). Οι συσχετίσεις αυτές είναι σε συμφωνία με μελέτες που έχουν δείξει ότι: α) Τεχνητή κατακράτηση της ERK στο κυτταρόπλασμα είναι ικανή να αναστείλλει τον πολλαπλασιασμό και τον μετασχηματισμό των κυττάρων που προκαλείται από αυξητικούς παράγοντες (Robinson και συν. 1998, Formstecher και συν. 2001). β) Η ρύθμιση της σηματοδότησης των ERK μπορεί να είναι ένα συχνό φαινόμενο αφού δείχθηκε πρόσφατα ότι η β -arrestin, μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την κλαθρίνη, συνδέεται με την ERK και αυξάνει την κυτταροπλασματική δραστηριότητα της ERK, ενώ αναστέλλει την προκαλούμενη από την ERK μεταγραφή (Tohgo και συν. 2002). Επιπλέον η εξαρτώμενη από β -arrestin ενεργοποίηση μιας κυρίως κυτταροπλασματικής δεξαμενής ERK δεν οδηγεί σε σήματα πολλαπλασιασμού (DeFea και συν. 2000). Αυτό σημαίνει ότι η κυτταροπλασματική δραστηριότητα της ERK2 αν και δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, φαίνεται να είναι διαφορετική από την πυρηνική και δεν συσχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αποτελέσματα μας ενισχύονται από αυτά των Blackhall και συν. (2003) που παρατήρησαν συσχέτιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης της p-MAPK σε μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα με καλύτερη επιβίωση των ασθενών αυτών. Τα ως άνω ευρήματα ενισχύουν την άποψη ότι η δραστηριότητα της κινάσης ERK2 στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων είναι διαφορετική και πιθανώς αντίθετη με αυτή του πυρήνα.

Συμπερασματικά η μελέτη αυτή, για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία, δείχνει ότι η διαμερισματοποίηση της ERK2 κινάσης, όπως αυτή αποκαλύπτεται από την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του μαστού, αντικατοπτρίζει μια διαφορετική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών, με την πυρηνική εντόπιση της ERK2 να είναι προγνωστικός παράγοντας μικρότερης ολικής επιβίωσης και την κυτταροπλασματική έκφραση της ERK2 να είναι ανεξάρτητος ευνοϊκός παράγοντας της ολικής και ελεύθερης νόσου επιβίωσης.

Στην παρούσα διατριβή η ETS-1 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων, στις στρωματικές ινοβλάστες και στο ενδοθήλιο διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Η εντόπιση αυτή επιβεβαιώνεται και από άλλους ερευνητές όπου προσδιορίστηκε η ETS-1 τόσο με *in situ* υβριδισμό όσο και ανοσοϊστοχημικά στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων (Nakayama και συν. 1996, Ito και συν. 1998, Behrens και συν.

2001, Span και συν. 2002) και στις στρωματικές ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαφόρων καρκίνων επίσης (Bolon και συν. 1995, Wernert και συν. 1994, Behrens και συν. 2001). Η κυτταροπλασματική εντόπιση της ETS-1 πρωτεΐνης πιθανόν αντιπροσωπεύει την περιοχή της σύνθεσης και ενεργοποίησης ενώ ακολούθως μετατίθεται στον πυρήνα όπου και εξασκεί την δράση της μετά από την πρόσδεση της στο DNA (Prognonec και συν. 1989). Αν και η ETS-1 πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί και στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων σε διάφορες μελέτες, η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη που συσχετίζει την έκφραση της πρωτεΐνης αυτής με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Η κυτταροπλασματική έκφραση της ETS-1 βρέθηκε να σχετίζεται αντίστροφα με τον πυρηνικό και με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας ($p=0.004$ και $p=0.033$ αντίστοιχα), δείχνοντας για πρώτη φορά ότι η κυτταροπλασματική και πιθανώς μη ενεργή μορφή της ETS-1 πρωτεΐνη σχετίζεται με καρκινώματα καλής διαφοροποίησης και χαμηλού βαθμού κακοηθείας. Λαμβάνοντας υπόψη αναφορές που υποστηρίζουν την συσχέτιση μεταξύ έκφρασης της ETS-1 πρωτεΐνης και της κυτταρικής διαφοροποίησης του ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Kanda και συν. 2002), η αντίστροφη συσχέτιση της κυτταροπλασματικής εντόπισης της ETS-1 πρωτεΐνης με το πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, ενισχύει ακόμη περισσότερο την θεώρηση ότι η κυτταροπλασματική ETS-1 αντιπροσωπεύει την αδρανή μορφή του μεταγραφικού παράγοντα.

Όσον αφορά την επιβίωση, η έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στους πυρήνες σχετίζεται με μειωμένη συνολική επιβίωση μόνο στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ($p=0.0032$), ένα εύρημα το οποίο είναι σε συμφωνία με άλλες αναφορές που επιβεβαιώνουν τον ρόλο της ETS-1 πρωτεΐνης ως δυσοίωνου προγνωστικού παράγοντα (Span και συν. 2002, Davidson και συν. 2001).

Η ανάστροφη συσχέτιση του οιστρογονικού υποδοχέα με την αυξημένη έκφραση της ETS-1 στο στρώμα του καρκίνου είναι ενδιαφέρουσα. Είναι μια συσχέτιση μεταξύ δύο δεικτών που εκφράζονται σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, και οι δύο ανεξάρτητα, δείχνοντας μια δυνητικά χειρότερη πρόγνωση και θα μπορούσε να υποδηλώνει μια αλληλεπίδραση μεταξύ καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του στρώματος στην οποία η δραστικότητα της ETS-1 στο στρώμα μπορεί να επάγει την μειωμένη έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά, έδειξε ότι η ETS-1 φαίνεται να σχετίζεται με διαφορετικό καρκινικό φαινότυπο αναλόγως της τοπογραφικής της εντόπισης. Η κυτταροπλασματική (ανενεργής μορφή) εντόπιση της ETS-1 να σχετίζεται με έναν ευνοϊκό καρκινικό φαινότυπο μέσω της ανάστροφης συσχέτισης με τον πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης. Η πυρηνική (ενεργός μορφή) εντόπιση της ETS-1 φαίνεται να ασκεί αρνητική επίδραση στην ολική επιβίωση μόνο στην ομάδα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

Μελετήθηκε επίσης η έκφραση της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη 701 STAT-1 πρωτεΐνης (pSTAT-1). Η έκφραση της pSTAT-1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων μαστού σε 11.6 % και 8.6% αντίστοιχα. Δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης της pSTAT-1 στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (ιστολογικός τύπος, μέγεθος όγκου, ιστολογικός βαθμός κακοήθειας, πυρηνικός βαθμός κακοήθειας, στάδιο της νόσου, ύπαρξη ή μη διήθησης λεμφαδένων, έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, έκφραση προγεστερονικών υποδοχέων) **στο σύνολο των ασθενών**. Τα ως άνω ευρήματα συμφωνούν με αυτά των Sheen-Chen και συν. (2007), που μελέτησαν την έκφραση της STAT-1 με την μέθοδο των ιστικών μικροσυστοιχιών σε καρκίνο μαστού. Σε προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς όμως, η παράλληλη συσχέτιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης της pSTAT-1 με το στάδιο συνδέει αυτή την πρωτεΐνη με έναν επιθετικό φαινότυπο συντελούντος στην εξέλιξη του κακοήθους όγκου.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας είναι το γεγονός ότι η **κυτταροπλασματική pSTAT-1** ασκεί δυσμενή επίδραση στην ολική επιβίωση των προ-εμμηνοπαυσιακών ασθενών ($p=0,048$). Επιπλέον, ασθενείς της ίδιας ομάδας (προ-εμμηνοπαυσιακές) που συνεκφράζουν pSTAT-1 και ER ή PR εμφανίζουν μικρότερο διάστημα ελευθέρως νόσου επιβίωση ($p=0,012$), υποδηλώνοντας ενεργοποίηση και μηνυματοδότηση της STAT-1 από τα οιστρογόνα. Εν αντιθέσει, μετα-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς με φαινότυπο pSTAT-1/ER ή PR εμφάνισαν μεγαλύτερο διάστημα ελευθέρως νόσου επιβίωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ER / PR αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν την pSTAT-1, πιθανόν εξαιτίας των χαμηλότερων επιπέδων των στεροειδών ορμονών στην ηλικιακή αυτή ομάδα. Υπάρχει στην διεθνή βιβλιογραφία μόνο μία μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν ιστικές

μικροσυστοιχίες σχετικά με την συσχέτιση της έκφρασης της pSTAT-1 και της ολικής και ελεύθερης νόσου επιβίωσης των ασθενών (Widschwendter και συν. 2002), αλλά χωρίς να διερευνά τον προγνωστικό ρόλο σε διάφορες υποομάδες ασθενών, αναλόγως της εμμηνοπαυσιακής τους κατάστασης. Το εύρημα αυτό είναι σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της δικής μας μελέτης όπου δεν ανεδείχθη συσχέτιση όσον αφορά την συνολική ομάδα των ασθενών. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στην μεθοδολογία έρευνας καθώς όσο και λόγω του μικρού δείγματος των ασθενών της μελέτης των Widschwendter και συν. (2002).

Περαιτέρω, στη μελέτη μας βρέθηκε παράλληλη έκφραση της κυτταροπλασματικής pSTAT-1 και των οιστρογονικών ορμονικών υποδοχέων στις προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς που όπως προαναφέρθηκε μπορεί να δηλώνει ενεργοποίηση της STAT-1 λόγω επίδρασης των οιστρογόνων. Πράγματι, τα οιστρογόνα ενεργοποιούν τα καρκινικά κύτταρα του μαστού μέσω φωσφορυλίωσης τυροσίνης και προάγουν τον σχηματισμό συμπλεγμάτων STAT-1-DNA (Kennedy και συν. 2005). Επίσης τα στεροειδή όπως η 17-β οιστραδιόλη, μέσω πρόσδεσης σε κυτταροπλασματικούς ή συνδεδεμένους με την μεμβράνη υποδοχείς, δείχθηκε ταχέως να ενεργοποιούν μηνυματοδοτικά μονοπάτια των STAT. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι οιστρογονικοί υποδοχείς ενεργοποιούν την STAT-1 δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Πάντως επειδή οι οιστρογονικοί υποδοχείς δεν έχουν δραστηριότητα κινάσης, η φωσφορυλίωση και έτσι η ενεργοποίηση των STAT πρέπει να συμβαίνει μέσω ενός άλλου μορίου που συνδέεται με τον οιστρογονικό υποδοχέα ή ενεργοποιείται από τον υποδοχέα (Silva και συν. 2007). Αυτό το μονοπάτι που μέσω των οιστρογόνων προκαλεί πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μπορεί να απαιτεί καθοδικά μηνυματοδοτικά μονοπάτια όπως των MAPK. Το μονοπάτι αυτό οδηγεί σε φωσφορυλίωση των υποδοχέων στεροειδών όπως επίσης και συνεργοποιητών/συνκατασταλτών που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς στεροειδών και το μεταγραφικό σύμπλεγμα (Silva και συν. 2007).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποδηλώνουν ένα διακριτό ρόλο της pSTAT-1 στον καρκίνο του μαστού στις προ-εμμηνοπαυσιακές και μετα-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς. Φαίνεται ότι η pSTAT-1 σχετίζεται με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού στις προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς σύμφωνα με την παράλληλη συσχέτιση με το στάδιο της νόσου και την πτωχή επιβίωση.

Συμπερασματικά, συνολικά η διδακτορική αυτή διατριβή αναδεικνύει ότι το μονοπάτι της κινάσης ERK2 και των πρωτεϊνών ETS-1 και pSTAT-1 έχει έναν διακριτό ρόλο όσον αφορά την πρόγνωση σε γυναίκες με διηθητικό καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, τα ευρήματα της διατριβής υποστηρίζουν τη σημασία της διαμερισματοποίησης της ERK2, όπως αυτή αποκαλύπτεται από την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η πυρηνική εντόπιση της ERK2 σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση και η κυτταροπλασματική έκφραση της ERK2 με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών ως ανεξάρτητος ευνοϊκός παράγοντας της ολικής και ελεύθερης νόσου επιβίωσης. Η πυρηνική έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης σχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Όσον αφορά την έκφραση της pSTAT-1 η κυτταροπλασματική εντόπιση της σχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η πυρηνική έκφραση των πρωτεϊνών ERK2 και ETS-1 η δε κυτταροπλασματική της pSTAT-1 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών και ως εκ τούτου μπορούν να θεωρηθούν ως προγνωστικοί παράγοντες. Το γεγονός της έκφρασης της ERK2 και της ETS-1 στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων της δε pSTAT-1 στο κυτταρόπλασμα υποδηλώνουν σε συνδυασμό με το ανωτέρω εύρημα ότι η ενεργοποίηση γίνεται στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα ανωτέρω ευρήματα σχολιάζονται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες προς τον περαιτέρω καθορισμό της σημασίας του μονοπατιού της ERK2 και των πρωτεϊνών ETS-1 και pSTAT-1 στον διηθητικό καρκίνο του μαστού και την αναζήτηση πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων σε αυτό.

VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ERK2 κινάση (Extracellular signal-regulated kinase 2) ανήκει στο σύστημα των κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases). Οι MAPK βρίσκονται ενδοκυττάρια στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούνται μετά από διέγερση υποδοχέων (υποδοχέων τύπου τυροσινικής κινάσης, υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνη, ιντεγκρινών και διαύλων ασβεστίου) από εξωγενή ερεθίσματα. Μετά την ενεργοποίησή τους προκαλούν φωσφορυλίωση διαφόρων ουσιών, είτε στον πυρήνα είτε στο κυτταρόπλασμα, και ρυθμίζουν έτσι κυτταρικές δραστηριότητες όπως γονιδιακή έκφραση, μίτωση, κίνηση, μεταβολισμό και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και έχουν εμπλακεί στην παθογένεση του καρκίνου. Στους στόχους της κινάσης ERK2 μέσω της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων ανήκει η ETS-1 πρωτεΐνη και η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη STAT-1 (pSTAT-1). Η ETS-1 πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων η οποία παίζει κύριο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και ογκογένεση. Οι ETS πρωτεΐνες προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους και ενεργοποιούν την μεταγραφή τους. Η pSTAT-1 είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας των STAT μεταγραφικών παραγόντων. Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει ότι επάγει την απόπτωση και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου του μαστού. Η προγνωστική σημασία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ERK2 κινάσης και των ETS-1 και pSTAT-1 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού παραμένει αδιευκρίνιστη. Σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν η διερεύνηση της έκφρασης της ERK2 κινάσης και της έκφρασης των πρωτεϊνών ETS-1 και pSTAT-1 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανοσοϊστοχημική μέθοδος τριών βημάτων εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης από 151 ασθενείς με διηθητικό καρκίνο μαστού με στόχο την εντόπιση της ERK2 κινάσης, της ETS-1 πρωτεΐνης και της pSTAT-1 και τη συσχέτιση τους με τις προγνωστικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους την επιβίωση των ασθενών. Δεν υπήρχε επαρκές υλικό για αξιολόγηση της έκφρασης της ETS-1 πρωτεΐνης σε 2 ασθενείς. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μονοπαραγοντική (Pearson's-chi-square test) και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση (μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης ή Cox proportional hazard regression model). Οι καμπύλες επιβίωσης προέκυψαν με δοκιμασία Kaplan-Meier και log rank στατιστική ανάλυση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ERK2 ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων σε 37.7% και 19.2% των ασθενών αντιστοίχως. Η πυρηνική εντόπιση της ERK2 συσχετίσθηκε αντιστρόφως με τους ER ($p=0.053$) στην μονοπαραγοντική ανάλυση και στην πολυπαραγοντική ανάλυση ($p=0.039$), ενώ η κυτταροπλασματική ERK2 εκφραζόταν συχνότερα σε λοβιακά παρά πορογενή καρκινώματα ($p=0.026$) στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Η πυρηνική έκφραση της ERK2 βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μικρότερης ολικής επιβίωσης των ασθενών ($p=0.04$), ενώ η κυτταροπλασματική έκφραση της ERK2 είχε ανεξάρτητη ευνοϊκή επίδραση στην ελεύθερη νόσου επιβίωση και στην ολική επιβίωση ($p<0.0001$ και $p=0.002$, αντίστοιχα).

Η ETS-1 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε 77.9% στο κυτταρόπλασμα και στο 46.3% στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Η κυτταροπλασματική έκφραση της ETS-1 συσχετιζόταν αντίστροφα με τον πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό κακοηθείας ($p=0.004$ και $p=0.033$, αντίστοιχα) στην μονοπαραγοντική ανάλυση. Η έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης στο στρώμα παρουσίαζε αρνητική συσχέτιση με τους οιστρογονικούς υποδοχείς ($p=0.003$) στην μονοπαραγοντική ανάλυση. Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η πυρηνική εντόπιση της ETS-1 σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση των μετα-εμμηνοπαυσιακών ασθενών ($p=0.032$).

Η pSTAT-1 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων σε ποσοστό 11,6% και 8,6%, αντίστοιχα. Στην ομάδα των προ-εμμηνοπαυσιακών ασθενών η κυτταροπλασματική pSTAT-1 συσχετίσθηκε παράλληλα με το στάδιο της νόσου ($p=0.014$) και την έκφραση των ER ($p=0.008$). Η κυτταροπλασματική pSTAT-1 είχε δυσμενή επίδραση στο διάστημα της ολικής επιβίωσης ($p=0.048$) στην ομάδα των προ-εμμηνοπαυσιακών ασθενών, ενώ προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς με φαινότυπο ταυτόχρονης θετικής έκφρασης pSTAT-1/ER ή PR παρουσίασαν μικρότερο διάστημα ελεύθερης νόσου επιβίωσης ($p=0.012$). Στην ομάδα των μετα-εμμηνοπαυσιακών ασθενών δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους αλλά υπήρχε ευνοϊκή επίδραση στην ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών με το φαινότυπο ταυτόχρονης θετικής έκφρασης pSTAT-1/ER ή PR ($p=0.034$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συπερασματικά η διατριβή αυτή συνολικά αναδεικνύει ότι το μονοπάτι της κινάσης ERK2 και των πρωτεϊνών ETS-1 και pSTAT-1 έχει έναν διακριτό ρόλο όσον

αφορά την πρόγνωση σε γυναίκες με διηθητικό καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, τα ευρήματα της διατριβής υποστηρίζουν τη σημασία της διαμερισματοποίησης της ERK2, όπως αυτή αποκαλύπτεται από την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Η πυρηνική εντόπιση της ERK2 σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση και η κυτταροπλασματική έκφραση της ERK2 με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών. Η πυρηνική έκφραση της ETS-1 πρωτεΐνης σχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση των μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Όσον αφορά την έκφραση της pSTAT-1 η κυτταροπλασματική εντόπιση της σχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η πυρηνική έκφραση των πρωτεϊνών ERK2 και ETS-1 η δε κυτταροπλασματική της pSTAT-1 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών και ως εκ τούτου μπορούν να θεωρηθούν ως προγνωστικοί παράγοντες. Το γεγονός της έκφρασης της ERK2 και της ETS-1 στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων της δε pSTAT-1 στο κυτταρόπλασμα υποδηλώνουν σε συνδυασμό με το ανωτέρω εύρημα ότι η ενεργοποίηση γίνεται στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα ανωτέρω ευρήματα σχολιάζονται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες προς την πλήρη διαλεύκανση της σημασίας του μονοπατιού της ERK2 και των πρωτεϊνών ETS-1 και pSTAT-1 στον διηθητικό καρκίνο του μαστού και την αναζήτηση πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων σε αυτό.

VIII. ABSTRACT

Introduction: Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathways represent a cascade of phosphorylation events, including three pivotal kinases, Raf, MEK and ERK2, which have been implicated in the pathogenesis of cancer. The aim of the present study was to investigate the expression of ERK2 kinase and its target proteins ETS-1 and phosphorylated STAT-1 in invasive breast carcinomas and their correlation with classic clinicopathological parameters and patients' survival. ETS-1 is a transcription factor, implicated in the regulation of expression of various genes. STAT-1 is the first member of signal transducers and activators of transcription (STATs). Recent studies have demonstrated its apoptotic and anti-proliferative effect in breast cancer experimental models, therefore suggesting a tumor suppressor role.

Methods: Immunohistochemistry was performed in paraffin-embedded tissue specimens from 151 invasive breast carcinomas to detect the expression of ERK2, ETS-1 and pSTAT-1 with clinicopathological parameters and patients' survival. There was insufficient material for the detection of expression of ETS-1 protein for 2 patients. The results were statistically processed using univariate analysis (Pearson's chi-square test) and multivariate analysis (logistic regression or Cox proportional hazard regression model). Overall and disease-free survival distribution curves were assessed by Kaplan-Meier test and log rank statistics.

Results: ERK2 immunoexpression was detected in the cytoplasm and nucleus of cancer cells in 37.7% and 19.2% of cases, respectively. Nuclear ERK2 was inversely correlated with ER ($p=0.039$), whereas cytoplasmic ERK2 was more often expressed in lobular than ductal carcinomas ($p=0.026$). Nuclear ERK2 expression was found to be an independent prognostic factor of shortened overall survival of patients ($p=0.040$), while cytoplasmic ERK2 had an independent, favorable effect on both disease-free and overall survival ($p<0.0001$ and $p=0.002$, respectively). ETS-1 protein was detected in 77.9% of the cases in the cytoplasm, in 46.3% in the nucleus of the malignant cells, and in stromal fibroblasts as well. Cytoplasmic ETS-1 was inversely correlated with nuclear and histologic grade of the tumor ($p=0.004$ and 0.033 , respectively). Stromal ETS-1 revealed a negative correlation with estrogen receptors (ER) ($p=0.003$). The univariate statistic analysis showed nuclear ETS-1 to be related to a shortened overall survival of the postmenopausal patients ($p=0.032$). pSTAT-1 protein was immunodetected in the cytoplasm and nuclei of the malignant cells (11.6% and 8.6% respectively). In premenopausal patients, cytoplasmic pSTAT-1

expression was positively correlated with stage ($p=0.014$) and ER ($p=0.008$). Univariate analysis showed that cytoplasmic pSTAT-1, in premenopausal patients, was associated with poor overall survival ($p=0.048$) and the phenotype of STAT-1/ER or STAT-1/PR co-expression was associated with shorter disease-free survival ($p=0.012$). On the contrary, in postmenopausal patients no association with clinicopathologic parameters and survival was observed, except for the relation of pSTAT-1/ER or STAT-1/PR co-expression with longer disease-free survival ($p=0.034$).

Conclusion: The present study for the first time indicates that the ERK2 kinase, ETS-1 protein and pSTAT-1 protein signaling pathway has a distinctive role in women with breast cancer. Specifically, compartmentalization of ERK2, as revealed by its immunodetection in the cytoplasm and nuclei of breast cancer cells, reflects a different effect on patient survival, with nuclear ERK2 being prognostic of a shortened overall survival and cytoplasmic localization being an independent favorable prognosticator of both disease-free and overall survival. In addition, ETS-1 seems to be related to a different tumor phenotype according to its topographic distribution, with nuclear localization being associated with decreased cumulative survival in postmenopausal women. Furthermore, our results suggest that pSTAT-1 is related to tumor progression in premenopausal patients through the advanced stage and decreased cumulative survival. Hence, further investigation of the ERK2 kinase, ETS-1 protein and pSTAT-1 protein signaling pathway might be crucial for exploring new therapy targets.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aamdal S, Børner O, Jørgensen O, Høst H, Eliassen G, Kaalhus O, Pihl A. Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer*. 1984;53:2525-9.
- Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol*, 1999;19:1301-1312.
- Ackerman LV. *Ackerman's Surgical Pathology*, Elsevier Health Science, 1998.
- Adachi M, Fukuda M, Nishida E. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO Journal*, 1999; 18:5347-5358.
- Adachi M, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biology* 2000;148:849-856.
- Adair F, Berg J, Joubert L, Robbins GF. Long term follow-up of breast cancer patients. The 30 year report. *Cancer* 1974;33:1145-1150.
- Adamkova L, Soucsova K, Kovarik J: Transcription protein STAT-1: biology and relation to cancer. *Folia Biol* 2007;53:1-6.
- Agrez MV, Gu X, Turton J, Meldrum C, Niu J, Antalis T, Howard EW. The alpha v beta 6 integrin induces gelatinase B secretion in colon cancer cells. *Int J Cancer* 1999;81:90-97.
- Aguire Ghiso JA, Alonso DF, Farias EF, Gomez DE, de Kier Joff EB. Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. *Eur J Biochem* 1999;263:295-304.
- Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulsom R, Smith P, Barnes D, Rubens R, Anglard P, Hart I. Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am J Pathol* 1998; 152:721-8.
- Ahmed N, Niu J, Dorahy DJ, Gu X, Andrews S, Meldrum CJ, Scott RJ, Baker MS, Macreadie IG, Agrez MV. Direct integrin $\alpha\beta 6$ -ERK binding: implications for tumour growth. *Oncogene* 2002;21:1370-1380.
- Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, McCarty MF, Takeda A, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Jung YD, Bucana CD, Mansfield PF, Hicklin DJ, Ellis LM. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer* 2003;88:796-802.
- Akaishi H, Takeda K, Kaisho T, Shineha R, Satomi S, Takeda J, Akira S. Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes. *Int Immunol* 1998;10:1747-51.
- Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SAW, Brown R, Chamnes GC, Osborne CK, McCouire WL. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *JNCI* 1993;85:200-206.

Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F, Weisz A. 17- β estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 1996;12:2315-2324.

Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvado MT, Sanchez L, Garcia JF, Lopez C, Jaen J, Bosch R, Pons LE, Bellas C, Piris MA. The presence of STAT-1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica* 2006;91:1605-1612.

Amadori D, Silvestrini R. Prognostic and predictive value of thymidine labelling index in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:267-81.

American Joint Committee on Cancer: Cancer Staging Manual, 6th edition. New York: Springer, 2003.

Andrulis K, Bull SB, Blackstein ME et al. Neu/erbB-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1340-1349.

Aplin AE, Hogan BP, Tomeu J, Juliano RL. Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. *J Cell Science* 2002;15:2781-2790.

Aplin AE, Stewart SA, Assoian RK, Juliano RL. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 2001;153:271-281.

Arbiser JL, Larsson H, Claesson-Welsh L, Bai X, LaMontagne K, Weiss SW, Soker S, Flynn E, Brown LF. Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo. *Am J Pathol* 2000;156:1469-76.

Atkin NB, Kay R. Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. *Br J Cancer* 1979;40:210-21.

Azam M, Lee C, Strehlow I, Schindler C. Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing. *Immunity* 1997;6:691-701.

Azambuja E, Durbecq V, Rosa DD, Colorra M, Larsimont D, Piccart-Gebhart M, Gardoso F. HER-2 overexpression/amplification and its interaction with taxane-based therapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19:223-232.

Bancerek J, Poss ZC, Steinparzer I, Sedlyarov V, Pfaffenwimmer T, Mikulic I, Dölken L, Strobl B, Müller M, Taatjes DJ, Kovarik P. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity* 2013;38:250-62.

Baran-Marszak F, Fagard R, Girard B, Camilleri-Broët S, Zeng F, Lenoir GM, Raphaël M, Feuillard J. Gene array identification of Epstein Barr virus-regulated cellular genes in EBV-converted Burkitt lymphoma cell lines. *Lab Invest* 2002;82:1463-79.

Barbareschi M, Pelosio P, Caffo O, Buttitta F, Pellegrini S, Barbarra R, Dalla PP, Bevilacqua G, Marchetti A. Cyclin D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21waf immunohistochemical expression. *Int J Cancer* 1997;74:171-174.

Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319:226-230.

Barnes DM. Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 1997;181:267-9.

Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993;24:469-476.

Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast. *Cancer Breast Cancer Res Treat* 1998;52:1-15.

Barrett IM, Pugila MA, Singh G, Tozer R. Expression of ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002;72:227-32.

Bartel FO, Higuchi T, Spyropoulos DD. Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene*. 2000;19:6443-54.

Bartkova J, Lukas J, Muller H, Luthof D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57:353-361.

Basset P, Belocq JP, Wolf C, Stall I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1994;230:61-65.

Bassuk AG, Barton KP, Anandappa RT, Lu MM, Leiden JM. Expression pattern of the Ets-related transcription factor Elf-1. *Mol Med*. 1998;4(6):392-401.

Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002;2:381-92.

Battle TE, Lynch RA, Frank DA. Signal transducer and activator of transcription 1 activation in endothelial cells is a negative regulator of angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66:3649-57.

Becker S, Groner B, Müller CW. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 1998;394:145-51.

Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, Wernert N. The ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP-1 and MMP-9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* 2001;194:43-50.

Behrens P, Rothe M, Florin A, Wellmann A, Wernert N. Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-9 expression. *Int J Mol Med* 2001;8:149-54.

Benekli M, Baumann H, Wetzler M. Targeting Signal Transducer and Activator of Transcription signaling pathway in leukemias. *J Clin Oncol* 2009;27:4422-4432.

Bentzon N, Durning M, Rasmussen BB, Mouridsen H, Kroman N. Prognostic effect of estrogen receptor status across age in primary breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:1089-1094.

Berg J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Halmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Med* 1995;1:1029-1034.

Bergeron J, Benlimame N, Zeng-Rong N, Xiao D, Scrivens PJ, Koromilas AE, Alaoui-Jamali MA. Identification of the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase as a regulator of cellular response to bulky adducts. *Cancer Res* 2000;60:6800-4.

Blackhall FH, Pintilie M, Michael M, Leighl N, Feld R, Tsao M, Shepherd FA. Expression and prognostic significance of Kit, Protein kinase B and Mitogen –activated Protein kinase in patients with small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2003;9:2241-2247.

Black MM, Speer FD. Nuclear structure in cancer tissues. *Surg Gynecol Obstet* 1957;105:97-105.

Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;9:359-377.

Boehm U, Guethlein L, Klamp T, Ozbek K, Schaub A, Fütterer A, Pfeffer K, Howard JC. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 1998;161:6715-23.

Bolon I, Gouyer V, Deroassoux V, Vandebunder B, Wernert N, Moro D, et al. Expression of c-ets-1, collagenase-1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 1995;147:1298.

Bonapace IM, Addeo R, Altucci L, Cicatiello L, Bifulco M, Laezza C, Salzano S, Sica V, Bresciani F, Weisz A. 17- β estradiol overcomes a G1 block induced by HMG-CoA reductase inhibitors and fosters cell cycle progression without inducing ERK-1 and –2 MAP kinases activation. *Oncogene* 1996;12:753-763.

Bonni A, Brunet A, West AE, Batta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription dependent and –independent mechanisms. *Science* 1999;286:1358-1362.

Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:4332-4337.

Borresen AL, Andersen TI, Eytjord JE, Corneli SRS, Thorlacius S, Borg A, Johansson U, Theillet C, Scherneck S, Hartman S. Tp53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:71-75.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs : A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991;65:663-675.

Brandstetter T, Ninci E, Falken U, Wagner E, Hess R, Bauknecht T. rhG-CSF affects genes involved in mitogen signalling and early gene expression in the ovarian cancer cell line HEY. *Int J Cancer* 1998;75:847-854.

Breuss JM, Gallo J, De Lisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carreter W, Gillet N, Sheppard D, Matthay M, Albeda SM, Kramer RH, Pytela R. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodelling. *J Cell Sci* 1995;108:2241-2251.

Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. Transcriptionally active STAT-1 is required for the antiproliferative effects of both interferon α and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7673-7678.

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303.

Bromberg J. Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Res* 2000; 2:86-90.

Bromberg JF. Activation of STAT proteins and growth control. *BioEssays* 2001;23:161-169.

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO Journal* 1999;18:664-674.

Bouck N. p53 and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:63-66.

Buchwalter G, Gross C, Wasyluk B. Ets ternary complex transcription factors *Gene*. 2004;324:1-14.

Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945-54.

Burk O, Klempnauer KH. Myb and Ets transcription factors cooperate at the myb-inducible promoter of the tom-1 gene. *Biochim Biophys Acta* 1999;1446:243-52.

Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 as an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:153-162.

Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; 197:157-168.

Camplejohn RS, Ash CM, Gillett CE, Raikundalia B, Barnes DM, Gregory WM, Richards MA, Millis RR. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer* 1995;71:140-5.

Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Aurichio F. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J* 1999;18:2500-2510.

Chang TL, Peng X, Fu XY. Interleukin-4 mediates cell growth inhibition through activation of STAT-1. *J Biol Chem* 2000;275:10212-10217.

Chakraborty A, White SM, Schaefer TS, Ball ED, Dyer KF, Tweardy DJ. Granulocyte colony-stimulating factor activation of Stat3 alpha and Stat3 beta in immature normal and leukemic human myeloid cells. *Blood* 1996;88:2442-9.

Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 1999;13:2604-16.

Chegini N, Kornberg L. Gonadotropin releasing hormone analogue therapy alters signal transduction pathways involving mitogen-activated protein and focal adhesion kinases in leiomyoma. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:21-6.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992;12:915-927.

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998;93:827-39.

Chen H, Ye D, Xie X, Chen B, Lu W. VEGF, VEGFRs expressions and activated STATs in ovarian epithelial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;94:630-635.

Chen Y, Hollemann T, Grunz H, Pieler T. Characterization of the Ets-type protein ER81 in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 1999;80(1):67-76.

Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R, Sotomayor EM. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003;19:425-36.

Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, de Launoit Y, Desbiens X. Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev* 2001;108(1-2):191-5.

Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* 1984;2:1102-9.

Clausen PA, Athanasiou M, Chen Z, Dunn KJ, Zhang Q, Lautenberger JA, Mavrothalassitis G, Blair DG. ETS-1 induces increased expression of erythroid markers in the pluripotent erythroleukemic cell lines K562 and HEL. *Leukemia* 1997;11:1224-33.

Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:479-500.

Cook DL, Weaver DL. Comparison of DNA content, S-phase fraction, and survival between medullary and ductal carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 1995;104:17-22.

Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:4071-4074.

Crossen PE, Morrison MJ. Elevated frequency of an ETS-1 restriction fragment polymorphism in chronic B-cell leukaemia. *Hum Genet* 1993;91:380-2.

Crossen PE, Morrison MJ, Colls BM. Elevated frequency of a SstI polymorphism of the Ets-1 oncogene in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;79:70-3.

Crum CP, Lester SC, Cotran RS. The female genital system and breast. p679-717 in Robbins Basic Pathology, 7th edition, Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, 2003, Saunders.

Cutler SJ, Black MM, Mork T, Harvei S, Freeman C. Further observations on prognostic factors in cancer of the female breast. *Cancer* 1969;24:653-667.

Cyert MS. Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem* 2001;276:20805-20808.

- Dabbs DJ. Ductal carcinoma of breast: nuclear grade as a predictor of S-phase fraction. *Hum Pathol* 1993;24:652-656.
- Dahl R, Simon MC. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31(2):229-33.
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421.
- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-5.
- Davidson B, Reich R, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Berner A, Ben-Baruch G, Bryne M, Nesland JM. Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:551-7.
- Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Risberg B, Ben-Baruch G, Reich R. Coordinated expression of integrin subunits, matrix metalloproteinases (MMP), angiogenic genes and Ets transcription factors in advanced-stage ovarian carcinoma: a possible activation pathway? *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:103-15.
- Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartman WH, Locher GW, Reed R, Golouh R. Prognostic significance of tumour grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986;58:2662-2670.
- Decker T, Kovarik P, Meinke A. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:121-34.
- Decker T, Meinke A. Jaks, Stats and the immune system. *Immunobiology* 1997;198:99-111.
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnet NW. β -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000;148:1267-1281.
- de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Koenders, M. I., Bennink, M. B., Arntz, O. J., Kolbe, T., van den Berg, W. B. Local activation of STAT-1 and STAT-3 in the inflamed synovium during zymosan-induced arthritis: exacerbation of joint inflammation in STAT-1 gene-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2004;50:2014-2023.
- De Mascarel I, Bonichon F, Coindre M, Trojani M. Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques; reevaluation with longer follow-up. *Br J Cancer* 1992;66:523-527.
- Dhanasekaran N, Tsim ST, Dermott JM, Onesime D. Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* 1998;17:1383-1394.
- Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 1996;56:4516-21.
- Dinh P, Sotiriou C, Piccart MJ. The evaluation of treatment strategies: Aiming at the target. *The Breast* 2007;16: S10-S16.
- Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2003;2:29.

- Dobbe E, Gurney K, Kiekow S, Lafferty JS, Kolesar JM. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2008;65:23-28.
- Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, McIntosh LP. Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry* 1994;33(46):13509-16.
- Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993;73:499-511.
- Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Hills M, Walsh G, IMPACT Trialists Group. Prognostic value of Ki-67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:167-170.
- Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988;61:420-7.
- Dube A, Akbarali Y, Sato TN, Libermann TA, Oettgen P. Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res* 1999;84:1177-85.
- Dudás J, Ramadori G, Knittel T, Neubauer K, Raddatz D, Egedy K, Kovalszky I. Effect of heparin and liver heparan sulphate on interaction of HepG2-derived transcription factors and their cis-acting elements: altered potential of hepatocellular carcinoma heparan sulphate. *Biochem J* 2000;350:245-51.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., Levy, D. E. Targeted disruption of the mouse STAT-1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 1996;84:443-450.
- Durbin JE, Fernandez-Sesma A, Lee, CK, Rao TD, Frey AB, Moran TM, Vukmanovic S, Garcia-Sastre A, Levy DE. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J Immunol* 2000;164:4220-4228.
- Dikic I, Blaukat A. Protein tyrosine kinase-mediated pathways in G-protein-coupled receptor signaling. *Cell Biochem Biophys* 1999;30:369-387.
- Eckel KL, Tentler JJ, Cappetta GJ, Diamond SE, Gutierrez-Hartmann A. The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA Cell Biol* 2003;22:79-94.
- Eisenhauer EA. From the molecule to the clinic--inhibiting HER2 to treat breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:841-2.
- Elledge R. Assessing p53 status in breast cancer prognosis: where should you put the thermometer if you think your p53 is sick? *J Natl Cancer Inst* 1996;88:141-143.
- Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:79-98.
- Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gree TM. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 2001;61:4222-8.

Elston CW, Ellis JO. Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a long study with long-term follow up. *Histopathology* 1991;19:403-410.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structures chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-4265.

Ewers, S.-B., Baldetorp, E. L. and Killander, D. Flow-Cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984;5:408-419.

Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, Lander ES. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 1999;97:727-41.

Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 1992;358:83-86.

Farrar JD, Smith JD, Murphy TL, Murphy KM. Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2. *J Biol Chem* 2000;275:2693-7.

Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, Albini A. Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clinical & Experimental Metastasis* 2000;18:11-120.

Fernando RI, Wimalasena J. Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. *Mol Biol Cell* 2004;15:3266-84.

Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06: 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993;71:2507-2514.

Fitzgerald K, Harrington A, Leder P. Ras pathway signals are required for notch-mediated oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:4191-4198.

Fitzgibbons PL, Page DI, Weaver D, Thor AD, Allred C, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schmitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-978.

Fleischman LF, Holtzclaw L, Russell JT, Mavrothalassitis G, Fisher RJ. ets-1 in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1995;15:925-31.

Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* 2001;1:239-250.

Frank DA, Mahajan S, Ritz J. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med* 1999;5:444-7.

Frierson HF Jr. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991;15:358-67.

- Fujimoto J, Aoki I, Toyoki H, Khatun S, Tamaya T. Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 2002;13:1605-11.
- Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal* 1997;16:1901-1908.
- Furuchi T, Anderson RGW. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem* 1998;273:21099-21104.
- Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, Matsuno S, Horii A. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1807-1815.
- Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22:207-219.
- Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4:70-6.
- Gee JMW, Robertson JFR, Ellis IO, Nicholson RI. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int J Cancer* 2001; 95:247-254.
- Gelebart P, Zak Z, Anand M, Dien-Bard J, Amin HM, Lai R. Interleukin-21 effectively induces apoptosis in mantle cell lymphoma through a STAT1-dependent mechanism. *Leukemia*. 2009;23(10):1836-46.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signalling. *Science* 1999; 285:1028-1032.
- Gietema JA, de Vries EGE. Clinical cancer research 2002: new agents and therapies. *Drug resistance updates* 2002;5:192-203.
- Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994;54:1812-1817.
- Gillett C, Lee A, Millis R, Barnes D. Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia. *J Pathol* 1998;184:396-400.
- Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, Barnes D. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1996;69:92-99.
- Gnant MF, Blijham G, Reiner A, Reiner G, Reynders M, Schutte B, van Asche C, Steger G, Jakesz R. DNA ploidy and other results of DNA flow cytometry as prognostic factors in operable breast cancer: 10 year results of a randomised study. *Eur J Cancer* 1992;28:711-6.
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members. Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2005;16:1569-1583.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994;77:307-16.

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Letters* 1992;304:170-178.

Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol* 1993;122:1089-1101.

Graeber T, Osmanian C, Jacks T, Housman D, Koch C, Lowe S, Giaccia A. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91.

Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 1998;75:1-55.

Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennesy BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* 2012;23:2997-3006.

Gullick Wj, Srinivasan R. The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:43-53.

Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Szyf M, Rabbani SA. Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem* 2002;277:41571-9.

Gutkind JS. Cell growth control by G-protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 1998;17:1331-1342.

Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, Fouret P. Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 2003;163:957-967.

Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of Her 2/neu (c-erbB-2) status in breast cancer be based on erb-2 status? *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1320-1321.

Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R, Bernstein A. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*. 2000;13:167-77.

Hähnel R, Woodings T, Vivian AB. Prognostic value of estrogen receptors in primary breast cancer. *Cancer* 1979;44:671-5.

Hedge SP, Kumar A, Kurschner C, Shapiro LH. c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol Cell Biol* 1998;18:2729-37.

Hill JM, Vaidyanathan H, Ramos JW, Ginsberg MH, Werner MH. Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. *EMBO Journal* 2002;21:6494-6504.

Hiroumi H, Dosaka-Akita H, Yoshida K, Shindoh M, Ohbuchi T, Fujinaga K, Nishimura M. Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion. *Int J Cancer* 2001;93:786-91.

Hori M, Inagawa S, Shimazaki J, Itabashi M, Hori M. Overexpression of mitogen-activated protein kinase superfamily proteins unrelated to ras and AF-1 of estrogen receptor alpha mutation in advanced stage human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000;196:817-826.

Horvath CM, Wen Z, Darnell JE Jr. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 1995;9:984-94.

Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-I S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18:813-22.

Huang S, Bucana CD, Van Arsdall M, Fidler IJ. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene* 2002;21:2504-12.

Huang X, Brown C, Ni W, Maynard E, Rigby AC, Oettgen P. Critical role for the Ets transcription factor ELF-1 in the development of tumor angiogenesis. *Blood* 2006;107:3153-60.

Jacobs T, Prioleau J, Stillman I, Schnitt S. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1054-1059.

Jeng MH, Yue W, Eischeid A, Wang JP, Santen RJ. Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long-term estrogen deprived human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treatment* 2000; 62:167-175.

Jiang Y, Xu W, Lu J, He F, Yang X. Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of hepatocyte growth factor, c-met, and transcription factor Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:1123-30.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;698:1911-1912.

Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995;11:69-74.

Imada K, Bloom ET, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono JA, Udy GB, Davey HW, Leonard WJ. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med* 1998;188:2067-74.

Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000;37:1-11.

International Union Against Cancer. TNM Atlas Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification on Malignant Tumors. Wittekind C, Greene FL, Huter RVP, Klimefingler M, Sobin LH (eds). 5th edition, 2005, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.

Ito Y, Miyoshi E, Takeda T, Sakon M, Noda K, Tsujimoto M, Monden M, Taniguchi N, Matsuura N. Expression and possible role of ets-1 in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;114:719-25.

Ito T, Nakayama T, Ito M, Naito S, Kanematsu T, Sekine I. Expression of ets-1 proto-oncogene in human pancreatic carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:209-15.

Ito Y, Miyoshi E, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Yokosaki Y, Monden M, Matsuura N. ets-1 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and cholangiocellular carcinoma. *Oncology* 2000;58:248-52.

- Ito Y, Takeda T, Okada M, Matsuura N. Expression of ets-1 and ets-2 in colonic neoplasms. *Anticancer Res* 2002;22:1581-4.
- Ivashkiv LB, Hu X. Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* 2004;6:159-68.
- Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996;169:522-31.
- Kanda K, Nakayama T, Onizuka S, Tomioka T, Kanematsu T. Expression of the Ets-1 proto-oncogene is linked to cell differentiation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002;49:747-51.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996;382:174-7.
- Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J Biol Chem* 2004;279:41882-41891.
- Kaulsay KK, Mertani HC, Tornell J, Morel G, Lee KO, Lobie PE. Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Exp Cell Res* 1999;250:35-50.
- Kennedy AM, Shogren KL, Zhang M, Turner RT, Spelsberg TC, Maran A. 17-estradiol-dependent activation of signal transducer and activator of transcription-1 in human fetal osteoblasts is dependent on Src kinase activity. *Endocrinol* 2005;146:201-207.
- Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1112-1116.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 1998;93:605-615.
- Kile BT, Alexander WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell MolLife Sci* 2001;58:1627-35.
- Kim HS, Lee MS. STAT-1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* 2007;19:454-65.
- Kim-Schulze S, Lowe WL, Schnapper HW. Estrogen stimulates delayed mitogen-activated protein kinase activity in human endothelial cells via an autocrine loop that involves basic fibroblast growth factor. *Circulation* 1998;98:413-421.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285:1-24.
- Kishimoto T. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* 1994;12:37-44.
- Kita D, Takino T, Nakada M, Takahashi T, Yamashita J, Sato H. Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through

down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res* 2001;61:7985-91.

Kitange G, Shibata S, Tokunaga Y, Yagi N, Yasunaga A, Kishikawa M, Naito S. Ets-1 transcription factor-mediated urokinase type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells stimulated by serum and basic fibroblast growth factors. *Lab Invest* 1999;79:407-16.

Kitange G, Tsunoda K, Anda T, Nakamura S, Yasunaga A, Naito S, Shibata S. Immunohistochemical expression of Ets-1 transcription factor and the urokinase-type plasminogen activator is correlated with the malignant and invasive potential in meningiomas. *Cancer* 2000;89:2292-300.

Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol* 2002;515:33-48.

Klijn JGM, Berns DMJJ, Schmitz PIM, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5,232 patients. *Endocrine Rev* 1992;13:3-17.

Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977;37:4669-71.

Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111:1297-308.

Kola I, Brookes S, Green AR, Garber R, Tymms M, Papas TS, Seth A. The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7588-92.

Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 1997;75:1318-23.

Korzus E, Nagase H, Rydell R, Travis J. The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem* 1997;272:1188-96.

Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 1998;279:703-7.

Koscienly S. Critical review of microarray-based prognostic tests and trials in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:47-50.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003;4:69-77.

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, Di Gregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Robertson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Non-genotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719-730.

Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, Schaid D, Sommer SS. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1093-1096.

Kovacic B, Stoiber D, Moriggl R, Weisz E, Ott RG, Kreibich R, Levy DE, Beug H, Freissmuth M, Sexl V. STAT1 acts as a tumor promoter for leukemia development. *Cancer Cell* 2006;10:77-87.

Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, Heidari H, Steinborn R, Zotter A, Levy DE, Müller M, Decker T. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J* 2001;20:91-100.

Krag W, Weaver D, Ashikaga T. The sentinel node in breast cancer: a multicenter validation study. *N Engl J Med* 1998;339:941-946.

Kronqvist P, Kuopio T, Nykanen M, Helenius H, Anttinen J, Klemi P. Predicting aggressive outcome in T1N0M0 breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91:277-281.

Krupp MN, Connolly DT, Lane MD. Synthesis, turn-over and down-regulation of epidermal growth factor receptors in human A431 epidermoid carcinoma cells and skin fibroblasts. *J Biochem* 1982;257: 11489-11496.

Kruse EA, Loughran SJ, Baldwin TM, Josefsson EC, Ellis S, Watson DK, Nurden P, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS, Kile BT. Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:13814-9.

Kumar A, Commane M, Flickinger, TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT-1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 1997;278:1630-1632.

Kuniyasu H, Chihara Y, Kondo H. Differential effects between amphotericin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Int J Cancer* 2003;104:722-727.

Kurpios NA, Sabolic NA, Shepherd TG, Fidalgo GM, Hassell JA. Function of PEA3 ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mam Gland Biol Neoplasia* 2003;8:177-90.

Leacock SW, Basse AN, Chandler GL, Kirk AM, Rakheja D, Amatruda JF. A zebrafish transgenic model of Ewing's sarcoma reveals conserved mediators of EWS-FLI1 tumorigenesis. *Dis Model Mech* 2012;5:95-106.

Leaman DW, Leung S, Li X, Stark GR. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J* 1996;10:1578-88.

Leaman DW, Pisharody S, Flickinger TW, Commane MA, Schlessinger J, Kerr IM, Levy DE, Stark GR. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:369-75.

Lee CK, Smith E, Gimeno R, Gertner R, Levy DE. (2000b) STAT-1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN- γ . *J. Immunol.* 164, 1286-1292.

- Lee CK, Raz R, Gimeno R, Gertner R, Wistinghausen B, Takeshita K, DePinho RA, Levy DE. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 2002;17:63-72.
- Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK-1: a new mammalian MAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:715-724.
- Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J Immunol.* 2000;164:1277-85.
- Lelièvre E, Lionneton F, Soncin F, Vandebunder B. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(4):391-407.
- Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:1079-1088
- Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* 1998;142:625-633.
- Leprince D, Gegonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Stehelin D. A putative second cell-derived oncogene on avian leukemia retrovirus E26. *Nature* 1983;306:345-7.
- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651-62.
- Lewis TS. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74:49-139.
- Li L, Wysk M, Gonzalez FA, Davis RJ. Genomic loci of human mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 1994:647-649.
- Li R, Pei H, Papas T. The p42 variant of ETS1 protein rescues defective Fas-induced apoptosis in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3876-81.
- Li R, Pei H, Watson DK, Papas TS. EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* 2000;19:745-53.
- Lin D, Shields M, Ullrich S, Appella E, Mercer W. Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cell prior to or near the restriction point in late G1 phase. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:9210-9214.
- Livingstone L, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty T. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70:923-935, 1992.
- Lobenhofer EK, Huper G, Iglehart JD, Marks JR. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. *Cell Growth Differ* 2000;11:99-110.
- Lonning PE. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Annals of Oncology* 2007;18:VIII3-VIII7.

- Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 1999;274:30132-8.
- Luttrell LM Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1999; 1:177-183.
- Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G- protein coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:375-382.
- Madej T, Address KJ, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Lanczycki CJ, Liu C, Lu S, Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Chen J, Thiessen PA, Wang Y, Zhang D, Bryant SH. "MMDB: 3D structures and macromolecular interactions." *Nucleic Acids Res* 2012;40:D461-4.
- Magkou C, Mylona E, Theohari I, Giannopoulou I, Papanikolaou E, Markaki S, Nakopoulou L. An immunohistochemical evaluation of phosphorylated Akt at threonine 308 [pAkt(Thr308)] in invasive breast cancer. *In Vivo* 2007, 21:967-972.
- Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signaling. Immunohistochemical localization of activated ERK/MAPK kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* 1998;153:1411-1423.
- Matrisian LM. Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann NY Acad Sci* 1994;91:10129-33.
- Masson R, Lefebvre O, Noël A, Fahime ME, Chenard MP, Wendling C, Kebers F, LeMeur M, Dierich A, Foidart JM, Basset P. In vivo evidence that the stromelysin -3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol* 1998; 140:1535-1541.
- Matikainen S, Sareneva T, Ronni T, Lehtonen A, Koskinen PJ, Julkunen I. Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* 1999;93:1980-91.
- Matsubayashi Y, Fukuda M, Nishida E. Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated cytosol independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem*, 2001;45:41755-41760.
- McBride KM, McDonald C, Reich NC. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT-1 transcription factor. *EMBO J* 2000;19:6196-206.
- McClelland RA, Gee JM, O'Sullivan L, Barnes DM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI. p21(WAF1) expression and endocrine response in breast cancer. *J Pathol* 1999;188:126-32.
- McCleskey EW, Barrow D, Madden T, Dutkowski J, Pamment J, Gee JMW, Nicholson RI. Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF-7 breast cancer cells after long treatment culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182780 (Faslodex). *Endocrinology* 2001;142:2776-2788.
- McCracken S, Kim CS, Xu Y, Minden M, Miyamoto NG. An alternative pathway for expression of p56lck from type I promoter transcripts in colon carcinoma. *Oncogene* 1997;15:2929-37.

- McFarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 1999;274:1011-1016.
- McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, Steward M, Parr AH, Thomas MD, Henry JA, Angus B, Lennard TW, Horne CH. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene* 1995;11:885-891.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R. N., Clark, R., Aguet, M., Schreiber, R. D. Targeted disruption of the STAT-1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAKSTAT signaling pathway. *Cell* 1996;84:431-442.
- Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1653:25-40.
- Meyer JS. Cell kinetics in selection and stratification of patients for adjuvant therapy of breast carcinoma. *NCI Monogr* 1986;:25-8.
- Michalides R, Hageman P, vanTinteren H, Houben L, Wientjens E, Klomp maker R, Peterse J. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 1996;73:728-734.
- Milkiewicz M, Uchida C, Gee E, Fudalewski T, Haas TL. Shear stress-induced Ets-1 modulates protease inhibitor expression in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2008;217(2):502-10.
- Min W, Pober JS, Johnson DR. Interferon induction of TAP1: the phosphatase SHP-1 regulates crossover between the IFN-alpha/beta and the IFN-gamma signal-transduction pathways. *Circ Res* 1998;83:815-23.
- Mineo C, Anderson RGW, White MA. Physical association with Ras enhances activation of membrane-bound Raf (RafCAAX). *J Biol Chem* 1997;272:10345-10348.
- Mishima K, Yamada E, Masui K, Shimokawara T, Takayama K, Sugimura M, Ichijima K. Overexpression of the ERK/MAPK kinases in oral squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:886-891.
- Mitsuno Y, Yoshida H, Maeda S, Ogura K, Hirata Y, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Helicobacter pylori induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signaling pathway in gastric cancer cells. *Gut* 2001;49:18-22.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene* 2004;23:4232-7.
- Moran RE, Black MM, Alpert L, Straus MJ. Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology, and nodal status in human breast cancer. *Cancer* 1984;54:1586-90.
- Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2002;72:163-172.
- Mukohara T, Kudoh S, Yamauchi S, Kimura T, Yoshimura N, Kanazawa H, Hirata K, Wanibuchi H, Fukushima S, Inoue K, Yoshikawa J. Expression of epidermal growth factor

receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer. *Lung cancer* 2003;41:123-130.

Naito S, Shimizu K, Nakashima M, Nakayama T, Ito T, Ito M, Yamashita S, Sekine I. Overexpression of Ets-1 transcription factor in angiosarcoma of the skin. *Pathol Res Pract*. 2000;196:103-9.

Najjar I, Fagard R. STAT-1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimien* 2010; 92:425-444.

Nakajima H, Liu XW, Wynshaw-Boris A, Rosenthal LA, Imada K, Finbloom DS, Hennighausen L, Leonard WJ. An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction. *Immunity* 1997;7(5):691-701.

Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Nakashima M, Sekine I. Expression of ets-1 proto-oncogene in human gastric carcinoma: correlation with tumor invasion. *Am J Pathol* 1996;149:1931-9.

Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Nakashima M, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human thyroid tumor. *Mod Pathol* 1999;12:61-8.

Nakayama T, Ito M, Otsuru A, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:415-22.

Nakopoulou L, Alexiadou A, Theodoropoulos GE, Lazaris A, Tzonou A, Keramopoulos A. Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 proteins in breast cancer. *J Pathol* 1996;179:31-8.

Nakopoulou L, Alexandrou P, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Lazaris AC, Davaris PS. Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. *Pathobiology* 2001;69:266-273.

Nakopoulou L, Lazaris AC, Kavantzias N, Alexandrou P, Athanassiadou P, Keramopoulos A, Davaris P: DNA topoisomerase II-alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness in invasive breast cancer. *Pathobiology* 2000;68:137-143.

Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, Alexandrou P, Katsarou S, Athanassiadou P, Keramopoulos A. Stromelysin-3 protein expression in invasive breast cancer: relation to proliferation, cell survival and patients' outcome. *Mod Pathol* 2002; 15:154-61.

Nathan B, Gusterson B, Jadayel D, O'Hare M, Anbazhagan R, Jayatilake H, Ebbs S, Micklem K, Price K, Gelber R, et al. Expression of BCL-2 in primary breast cancer and its correlation with tumour phenotype. For the International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *Ann Oncol* 1994;5:409-14.

National Institute for Health and Clinical Excellence. Trastuzumab for the adjuvant treatment of early stage HER2-positive breast cancer. 2006
<http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/11586/33458/33458.pdf>

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Säve-Söderbergh J, Davis BW, Reed R, Torhorst J, Golouh R, Peterson HF, Price KN, et al. International Breast Cancer Study Group, Bern, Switzerland. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative

- breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;10:696-705.
- Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Yamada T, Matsuno Y, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2002; 160:1129-1141.
- Nishibori, T., Tanabe, Y., Su, L., David, M. Impaired development of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the absence of STAT-1: increased susceptibility to autoimmune disease. *J Exp. Med* 2004;199:25-34.
- Niu J, Gu X, Ahmed N, Andrews S, Turton J, Bates R, Agrez M. The alphaVbeta6 integrin regulates its own expression with cell crowding: implications for tumor progression. *Int J Cancer* 2001;92:40-48.
- Nozell S, Ma Z, Wilson C, Shah R, Benveniste EN. Class II major histocompatibility complex transactivator (CIITA) inhibits matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2004;279:38577-89.
- Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004;95:626-33.
- Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003;303:11-34.
- Omatu T. Overexpression of human homeobox gene in lung cancer A549 cells results in enhanced motile and invasive properties. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1999;74:367-76.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
- Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA 3rd, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980;46:2884-8.
- Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:227-38.
- O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med* 2013;368:161-70.
- Ouchi T, Lee SW, Ouchi M, Aaronson SA, Horvath CM. Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5208-13.
- Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Yotsumoto H, Hara T, Kajihara S, et al. Involvement of the ets-1 gene in overexpression of Matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:6519-25.
- Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:195-208.

- Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. *erbB-2* and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1361-70.
- Pande P, Soni S, Chakravarti N, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognostic impact of *Ets-1* overexpression in betel and tobacco related oral cancer. *Cancer Detect Prev* 2001;25:496-501.
- Papas TS, Watson DK, Sacchi N, O'Brien SJ, Ascione R. Molecular evolution of *ets* genes from avians to mammals and their cytogenetic localization to regions involved in leukemia. *Gene Amplif Anal* 1986;4:207-38.
- Paterson MC, Dietrich KD, Danylik J, Paterson AH, Lees AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA. Correlation between *c-erbB-2* amplification and risk of recurrent disease in lymph node negative breast cancer. *Cancer Res* 1991;54:556-567.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 2001;22:153-183.
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185 *HER-2/neu* monoclonal antibody plus cisplatin in patients with *HER-2/neu*-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;16:2659-2671.
- Pelosio P, Barbareschi M, Bonaldi E, Marchetti A, Verderio P, Caffo O, Bevilacqua P, oracchi P, Buttitta F, Gasparini G. Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy. *Ann Oncol* 1996;7:695-703.
- Pereira H, Pinder SE, Sibbering Dm, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson J, Ellis JO. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV. Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 1995;27:219-226.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000;406: 747-752.
- Pharocho PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the *p53* gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999;80:1968-73.
- Poat B, Hazari S, Chandra PK, Gunduz F, Balart LA, Alvarez X, Dash S. SH2 modified *STAT1* induces *HLA-I* expression and improves *IFN- γ* signaling in *IFN- α* resistant HCV replicon cells. *PLoS One* 2010;5. pii: e13117.
- Poller D, Hutchings C, Galea M, Bell J, Nicholson R, Elston C, Blamey R, Ellis I. *P53* protein expression in human breast carcinoma: relationship to expression of epidermal growth factor receptor, *c-erbB-2* protein overexpression and oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1992;66: 583-588.
- Porter P, Malone K, Heagerty P, Alexander G, Gatti L, Firpo E, Daling J, Roberts J. Expression of cell cycle regulators *p27Kip1* and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Med* 1997;3:222-225.

Porter AC, Vaillancourt RR. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 1998;17:1343-1352.

Pourtier-Manzanedo A, Vercamer C, Van Belle E, Mattot V, Mouquet F, Vandebunder B. Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene* 2003;22:1795-806.

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical Pharmacology* 2002;64:755-763

Pouyssegur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur. J. Biochem* 2003;270:3291-3299.

Prognonec P, Boulukos KE, Ghysdall J. The c-ets-1 protein in chromatin associated and binds to DNA in vitro. *Oncogene* 1989;4:691-697.

Qing Y, Stark GR. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* 2004;279:41679-85.

Raj GV, Barki-Harrington L, Kue PF, Daaka Y. Guanosine phosphate binding protein coupled receptors in prostate cancer: a review. *The Journal of Urology* 2002; 167:1458-1463.

Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of STAT-1 in regulating gene expression. *Oncogene* 2000;19:2619-2627.

Ramos JW, Hughes PE, Renshaw MW, Schwartz MA, Formstecher E, Chneiweiss H, Ginsberg MH. Death effector domain protein PEA-15 potentiates Ras activation of Extracellular signal receptor-activated kinase by an adhesion-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 2000;1:2863-2872.

Rane SG. Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1999;33:107-127.

Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000;19:5662-79.

Ravdin P, Green S, Door T, McGuire W, Fabian C, Pugh R, Carter R, Rivkin S, Borst J, Belt R, Metch B, Osborne CK. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1284-1291.

Regis G, Pensa S, Boseli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: The STAT-1:STAT3 seesaw of interferon and gp130 receptor signaling. *Sem Cell Develop Biol* 2008;19:351-359.

Reich NC. STATs get their move on. *JAKSTAT* 2013;2:e27080.

Remy P, Baltzinger M. The Ets-transcription factor family in embryonic development: lessons from the amphibian and bird. *Oncogene* 2000;19(55):6417-31.

Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG, Fischer EH. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:8881-8885

Reszka AA, Bulinski JC, Krebs EG, Fischer EH. Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 2 regulates cytoskeletal organization and

chemotaxis via catalytic and microtubule-specific interactions. *Mol Biol Cell* 1997;8:1219-1232.

Rew DA, Campbell ID, Taylor I, Wilson GD. Proliferation indices of invasive breast carcinomas after in vivo 5-bromo-2'-deoxyuridine labelling: a flow cytometric study of 75 tumours. *Br J Surg* 1992;79:335-9.

Rice PL, Washington M, Schleman S, Beard KS, Driggers LJ, Ahnen DJ. Sulindac sulfide inhibits epidermal growth factor-induced phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2 and Bad in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:616-620.

Robinson L, Panayiotakis A, Papas TS, Kola I, Seth A. ETS target genes: identification of *egr1* as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7170-5.

Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA, Cobb MH. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* 1998;22:141-50.

Robinson MJ, Xu B-e, Stippec SA, Cobb MH. Different domains of the mitogen-activated protein kinases ERK3 and ERK2 direct subcellular localization and upstream specificity in vivo. *J Biol Chem* 2002;277:5094-5100.

Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem* 1995;270:18966-74.

Roger V, Beito G, Jolly PC. Factors affecting the incidence of lymph node metastases in small cancers of the breast. *Am J Surg* 1989;157: 501-502.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T₁N₀M₀/ T₂N₀M₀ patients with long-term follow up. *J Clin Oncol* 1993;11:2090-2100.

Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of Her-2/neu in patients with axillary lymph node-negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *Cancer* 1995;75:1320-1326.

Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

Royuela M, Arenas MI, Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R. Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by Mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Hum Pathol* 2002;33:299-306.

Rozengurt E. Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol* 1998;177:507-517.

Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R. Identification of a cytoplasmic retention sequence in ERK2. *J Biol Chem* 1999;274:30349-30352.

Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998;58:5321-5.

Sacchi N, de Klein A, Showalter SD, Bigi G, Papas TS. High expression of ets-1 gene in human thymocytes and immature T leukemic cells. *Leukemia* 1988;2:12-8.

Sacchi N, Wendtner CM, Thiele CJ. Single-cell detection of ets-1 transcripts in human neuroectodermal cells. *Oncogene* 1991;6:2149-54.

Saeki H, Kuwano H, Kawaguchi H, Ohno S, Sugimachi K. Expression of ets-1 transcription factor is correlated with penetrating tumor progression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 2000;89:1670-6.

Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987;1:1398-402.

Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D, Pelech S. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Research* 1999; 19:731-740.

Sainburg JRC, Needham GK, Malcolm A, Farndon JR, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987;1:1398-1402.

Sandhu C, Slingerland J. Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detect Rev* 2000;24:107-118.

Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* 1999;18:4657-68.

Santen RJ, Song XR, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W: The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2002;80:239-256.

Santen RJ, Song RX, Zhang Z, Kumar R, Jeng MH, Masamura S, Yue W, Berstein L. Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for superiority of aromatase inhibitors over selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment and prevention. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:111-30.

Sanz-Moreno V, Casar B, Crespo P. p38 α isoform Mxi2 binds to extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 Mitogen-activated protein kinase and regulates its nuclear activity by sustaining its phosphorylation levels. *Mol Cell Biology* 2003; 23:3079-3990.

Sasaki H, Kobayashi Y, Tanahashi M, Yukiue H, Yano M, Kaji M, Kiriya M, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y. Ets-1 gene expression in patients with thymoma. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;50:503-7.

Sasaki H, Yukiue H, Moiriyama S, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res* 2001; 101:242-7.

Sato T, Miwa A. Ets-1 and integrin beta3 for lung metastasis from colorectal cancer. *APMIS* 2002;110:347-53.

Say CC, Donegan WL. Invasive carcinoma of the breast: prognostic significance of tumor size and involved axillary lymph nodes. *Cancer* 1974;34:468-471.

- Schindler C. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002;109:1133-1137.
- Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007;282:20059-63.
- Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ;94(7):3058-63.
- Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:54-58.
- Schumacher M, Schmoor C, Sauerbrei W, Schauer A, Ummenhofer L, Gatzemeier W, Rauschecker H. The prognostic effect of histological tumor grade in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;25:235-45.
- Schuster B, Hendry L, Byers H, Lynham SF, Ward MA, John S. Purification and identification of the STAT5 protease in myeloid cells. *Biochem J* 2007;404:81-7.
- Scott KA, Walker RA. Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br J Cancer* 1997;76:1288-92.
- Sepold-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Med* 1999; 5:810-816.
- Seth A, Giunta S, Franceschi C, Kola I, Venanzoni MC. Regulation of the human stress response gene GADD153 expression: role of ETS1 and FLI-1 gene products. *Cell Death Differ*. 1999;6(9):902-7.
- Seth A, Robinson L, Thompson DM, Watson DK, Papas TS. Transactivation of GATA-1 promoter with ETS1, ETS2 and ERG/Hu-FLI-1 proteins: stabilization of the ETS1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene* 1993;8:1783-90.
- Sethi T, Rozengurt E. Galanin stimulates Ca²⁺ mobilization, inositol phosphate accumulation, and clonal growth in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1991;51:1674-1679.
- Seufferlein T, Rozengurt E. Galanin, neurotensin, and phorbol esters rapidly stimulate activation of mitogen-activated protein kinase in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1996;56:5758-5764.
- Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Biol* 2001;2:827-37.
- Sheen-Chen SM, Huang CC, Tang RP, Yang CH, Chou FF, Eng HL. Signal transducer and activator of transcription 1 in breast cancer: analysis with tissue microarray. *Anticancer Res* 2007;27:2481-2486.
- Shen Q, Brown PH. Novel agents for the prevention of Breast Cancer: Targeting transcription factors and signal transduction pathways *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2003:45-71.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003;4:63-8.

Shibayama S, Shibata-Seita R, Miura K, Kirino Y, Takishima K. Identification of a C-terminal region that is required for the nuclear translocation of ERK by passive diffusion. *J Biol Chem*, 2002;277:37777-37782.

Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB. A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell* 1999;4:365-76.

Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;380:630-3.

Silva CM, Shupnik MA: Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance. *Mol Endocrinol* 2007;21:1499-1512.

Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 1993;366:583-5.

Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:499-504.

Simpson J, Quan D, O'Malley F, Odom-Maryon T, Clarke P. Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 1997;151:161-168.

Singletary SE, Connolly JL. Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006;56: 37-47.

Sivaraman VS, Wang HY, Nuevo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of Mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997;97:1478-1483.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuize WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.

Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik MA, Kumar R, Santen RJ: Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α - Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 2002;16:116-127.

Soni S, Pande P, Shukla NK, Ralhan R. Coexpression of Ets-1 and p53 in oral carcinomas is associated with P-glycoprotein expression and poor prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:336-42.

Soond SM, Carroll C, Townsend PA, Sayan E, Melino G, Behrmann I, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT1 regulates p73-mediated Bax gene expression. *FEBS Lett* 2007;581:1217-26.

Span PN, Manders P, Heuvel JJ, Thomas CM, Bosch RR, Beex LV, et al. Expression of the transcription factor ets-1 is an independent prognostic marker for relapse free survival in breast cancer. *Oncogene* 2002;21:8506-9.

Stål O, Dufmats M, Hatschek T, Carstensen J, Klintonberg C, Rutqvist LE, Skoog L, Sullivan S, Wingren S, Nordenskjöld B. S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *Clin Oncol* 1993;11:1717-22.

Stanta G, Bonin S, Losa L, Eusebi V. Molecular characterization at intraductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 432:107-111, 1998.

Stanton PD, Cooke TG, Oakes SJ, Winstanley J, Holt S, George WD, Murray GD. Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S phase fraction in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;66:925-9.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67: 227-264.

Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52: 17-28, 1998.

Stephanou A, Scarabelli TM, Brar BK, Nakanishi Y, Matsumura M, Knight RA, Latchman DS. Induction of apoptosis and Fas receptor/Fas ligand expression by ischemia/reperfusion in cardiac myocytes requires serine 727 of the STAT-1 transcription factor but not tyrosine 701. *J Biol Chem* 2001;276:28340-7.

Stephanou A, Latchman DS. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 2005;23:177-182.

Sulak LE, Clare CN, Morale BA, Hansen KL, Montiel MM. Biphenotypic acute leukemia in adults. *Am J Clin Pathol* 1990;94:54-8.

Tajima A, Miyamoto Y, Kadowaki H, Hayashi M. Mouse integrin α 5 promoter is regulated by transcriptional factors Ets and Sp1 in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:377-84.

Takanami I, Takeuchi K, Karuke M. Expression of ETS-1 is correlated with urokinase-type plasminogen activator and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2001;22:205-10.

Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H., Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- β . *Nature* 2002;416:744-749.

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3801-4.

Takeda T, Kurachi H, Yamamoto T, Nishio Y, Nakatsuji Y, Morishige Ki, Miyake A, Murata Y. Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear

receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid. *J Endocrinol* 1998;159:323-30.

Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999;10:39-49.

Taniguchi N, Miyoshi E, Ko JH, Ikeda Y, Ihara Y. Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455:287-300.

Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52:706-712.

Tanner M, Jarvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II alpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2001;5345-5348.

Tanue T, Yamamoto T, Nishida E. Modular structure of a docking surface on MAPK Phosphatases. *J Biol Chem* 2002;277:22942-22949.

Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and Genetics. Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARC WHO Classification of Tumors, No 4, 2003.

Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;93:841-50.

ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 2002;22:5662-8.

Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer: The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994;73:2359-2365.

Thapa RJ, Nogusa S, Chen P, Maki JL, Lerro A, Andrade M, Rall GF, Degterev A, Balachandran S. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ;110:E3109-18.

Theillet C, Adnane J, Szeptowski P, Simon MP, Jeanteur P, Birnbaum D, Gaudray P. BCL-1 participates in the 11q13 amplification found in breast cancer. *Oncogene* 1990;5(1):147-9.

Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MC, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. The stability of the G protein-coupled receptor- β -Arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 2003;278: 6258-6267.

Timofeeva OA, Plisov S, Evseev AA, Peng S, Jose-Kampfner M, Lovvorn HN, Dome JS, Perantoni AO. Serine-phosphorylated STAT1 is a prosurvival factor in Wilms' tumor pathogenesis. *Oncogene* 2006;25:7555-64.

Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. β -Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1A receptor stimulation. *J Biol Chem* 2002;277:9429-9436.

- Tokuhara K, Ogata Y, Nakagawa M, Shirouzu K. Ets-1 expression in vascular endothelial cells as an angiogenic and prognostic factor in colorectal carcinoma. *Int Surg* 2003;88:25-33.
- Toikkanen S, Helin H, Isola J et al. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein in breast cancer: A 20-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992;10:1044-1048.
- Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, McCormick J, Barry S, Lawrence KM, Knight RA, Hubank M, Chen PL, Latchman DS, Stephanou A. STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* 2005;118:1629-39.
- Trojanowska M. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* 2000;19:6464-71.
- Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G. Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001;92:2965-2974.
- Tsutsumi S, Kuwano H, Asao T, Nagashima K, Shimura T, Mochiki E. Expression of ets-1 angiogenesis-related protein in gastric cancer. *Cancer Lett* 2000;160:45-50.
- Tubiana M, Pejovic MH, Koscielny S, Chavaudra N, Malaise E. Growth rate, kinetics of tumor cell proliferation and long-term outcome in human breast cancer. *Int J Cancer* 1989;44:17-22.
- Turner DP, Findlay VJ, Moussa O, Watson DK. Defining ETS transcription regulatory networks and their contribution to breast cancer progression. *J Cell Biochem*. 2007;102:549-59.
- Tymms MJ, Kola I. Regulation of gene expression by transcription factors Ets-1 and Ets-2. *Mol Reprod Dev* 1994;39:208-14.
- Yamamoto H, Swoger J, Greene S, Saito T, Hurh J, Sweeley C, Leestma J, Mkrdichian E, Cerullo L, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi N, Moskal JR. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res* 2000;60:134-42.
- Yang C, Shapiro LH, Rivera M, Kumar A and Brindle PK: A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions. *Mol Cell Biol* 1998, 18:2218-2229.
- Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, Kuroiwa Y. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci*. 1999;64:249-58.
- Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN, Reddy ES. Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* 1997;14:1259-68.
- Youlyouz-Marfak I, Gachard N, Le Cloennec C, Najjar I, Baran-Marszak F, Reminieras L, May E, Bornkamm GW, Fagard R, Feuillard J. Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents. *Cell Death Differ* 2008;15:376-85.

Uzgare AR, Kaplan PJ, Greenberg NM. Differential expression and/or activation of p38 MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate* 2003; 55:128-139.

Valter MM, Hügel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T, Wernert N. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:5608-14.

Van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L, van der Valk P, Peterse HL, de Jong JS, Meijer CJ, Baak JP. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 1997;150:705-711.

Van Slooten H-J, van De Vijver M, Borresen A-L, Eyfjord JE, Valgardsdottir R, Scherneck S, Nesland JM, Devilee P, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. Mutations in the p53 gene, independent of type and location are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 189:504-513, 1999.

Varinou L, Ramsauer K, Karaghiosoff M, Kolbe T, Pfeffer K, Müller M, Decker T. Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* 2003;19:793-802.

Venanzoni MC, Robinson LR, Hodge DR, Kola I, Seth A. Ets-1 and ets-2 in p53 regulation: spatial separation of ets binding site (EBS) modulate protein-DNA interaction. *Oncogene* 1996;12:1199-204.

Veronesi U, Marubini E, Del Vecchio M, Manzari A, Andreola S, Greco M, Luini A, Merson M, Saccozzi R, Rilke F, Salvadori B. Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments: Partly independent events. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:19-27.

Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph nodes. *Lancet* 1997;349:1864-1867.

Vignais ML, Gilman M. Distinct mechanisms of activation of STAT-1 and Stat3 by platelet-derived growth factor receptor in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 1999;19:3727-35.

Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE Jr. DNA binding of in vitro activated STAT-1 alpha, STAT-1 beta and truncated STAT-1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 1996;15:5616-26.

Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 1998;279:1048-52.

Vlaeminck-Guillem V, Carrere S, Dewitte F, Stehelin D, Desbiens X, Duterque-Coquillaud M. The Ets family member Erg gene is expressed in mesodermal tissues and neural crests at fundamental steps during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000;91(1-2):331-5.

Volmat V, Camps M, Arkinstall S, Pouyssegur J, Lenormand P. The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Science* 2001; 14:3433-3443.

- von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatment* 2000;62:51-62.
- Walker RA. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *J Clin Pathol* 2008;61:689-696.
- Walt AJ, Singhakowinta A, Brooks SC, Cortez A. The surgical implications of estrophile protein estimations in carcinoma of the breast. *Surgery* 1976;80:506-12.
- Wang GS, Huang YG, Li H, Bi SJ, Zhao JL. ERK/CANP rapid signaling mediates 17 β -estradiol-induced proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 cells. *Int J Clin Exp Med* 2014;7:156-62.
- Wang LH, Yang XY, Kirken RA, Resau JH, Farrar WL. Targeted disruption of stat6 DNA binding activity by an oligonucleotide decoy blocks IL-4-driven T(H)2 cell response. *Blood* 2000;95:1249-57.
- Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 1994;669-671.
- Wang WL, Patel NR, Caragea M, Hogendoorn PC, López-Terrada D, Hornick JL, Lazar AJ. Expression of ERG, an Ets family transcription factor, identifies ERG-rearranged Ewing sarcoma. *Mod Pathol* 2012;25:1378-83.
- Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2000;20:4505-12.
- Wasylyk C, Schlumberger SE, Criqui-Filipe P, Wasylyk B. Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 2002;22:2687-702.
- Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, Kaya M, Fujikawa K, Sato H, Seiki M, Ishii S, Fujinaga K. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer* 1998;77:128-37.
- Watson DK, McWilliams-Smith MJ, Nunn MF, Duesberg PH, O'Brien SJ, Papas TS. The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7294-8.
- Watson DK, Smyth FE, Thompson DM, Cheng JQ, Testa JR, Papas TS, Seth A. The ERGB/Fli-1 gene: isolation and characterization of a new member of the family of human ETS transcription factors. *Cell Growth Differ* 1992;3:705-13.
- Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP, O'Connell M. Pathologic analysis of sentinel and non-sentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. *Cancer* 2000;88:1099-1107.
- Wei G, Srinivasan R, Cantemir-Stone CZ, Sharma SM, Santhanam R, Weinstein M, Muthusamy N, Man AK, Oshima RG, Leone G, Ostrowski MC. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. *Blood* 2009;114:1123-30.

Weidner N, Moore DH 2nd, Ljung BM, Waldman FM, Goodson WH 3rd, Mayall B, Chew K, Smith HS. Correlation of bromodeoxyuridine (BRDU) labeling of breast carcinoma cells with mitotic figure content and tumor grade. *Am J Surg Pathol* 1993;17:987-94.

Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1879-84.

Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, Clark GM, McGuire WL. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;28:9-20.

Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer--a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:255-65.

Wernert N, Gilles F, Fateur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, et al. Stromal expression of c-ets-1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 1994;54: 5683-8.

Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, Stehelin D. c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* 1992;140:119-27.

Whitehurst AW, Wilsbacher JL, You Y, Luby-Phelps K, Moore MS, Cobb MH. ERK2 enters the nucleus by a carrier independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:7496-7501

Whitehurst AW, Robinson FL, Moore SM, Cobb MH. The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem* 2004;279:12840-12847.

Widschwendter A, Tonko-Gaymayer S, Welte T, Daxenbichler G, Marth C, Doppler W: Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3065-3074.

Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schütz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R65.

Wittau N, Grosse R, Kalkbrenner F, Gohla A, Schultz G, Gudermann T. The galanin receptor type 2 initiates multiple signaling pathways in small cell lung cancer cells by coupling to G_q, G_i, and G12 proteins. *Oncogene* 2000;19:4199-4209.

WHO (The World Health Organization). The World Health Organization histological typing of breast tumors, 2nd edition. *Am J Clin Pathol* 1982;78:806-16.

Wolf I, Rubinfeld H, Yoon S, Marmor G, Hanoch T, Seger R. Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J Biol Chem* 2001;276:24490-24497.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American

Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-45.

Wu TR, Hong YK, Wang XD, Ling MY, Dragoi AM, Chung AS, Campbell AG, Han ZY, Feng GS, Chin YE. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem* 2002;277:47572-80.

Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F, Huber LA. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal-lysosomal compartment. *J Cell Biol* 2001;152:765-76.

Xia Z, Salzler RR, Kunz DP, Baer MR, Kazim L, Baumann H, Wetzler M. A novel serine-dependent proteolytic activity is responsible for truncated signal transducer and activator of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res* 2001;61:1747-53.

Xing C, Imagawa W. Altered MAP kinase (ERK-1,-2) regulation in primary cultures of mammary tumor cells: elevated basal activity and sustained response to EGF. *Carcinogenesis* 1999;20:1201-1208.

Xu B-e, Stippec S, Robinson FL, Cobb MH. Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J Biol Chem* 2001;276:26509-26615.

Yarbro JW, Page DL, Fielding LP, Partridge EE, Murphy GP: American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* 1999;86:2436-2446.

Yoshizaki T. Promotion of metastasis in nasopharyngeal carcinoma by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1. *Histol Histopathol* 2002;17:845-50.

Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T, Variani J. Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 1999;180:271-284.

Zhang Z, Yang XY, Cohen DM. Hypotonicity activates transcription through ERK-dependent and -independent pathways in renal cells. *Am J Physiol*. 1998;275:C1104-12.

Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1995;270:12665-12669.

Zúñiga Á, Torres J, Úbeda J, Pulido R. Interaction of Mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem* 1999;274:21900-21907.