

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

**ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑ - ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ
ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ»**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ
για την απόκτηση
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ**

**Μελέτη της επίδρασης της LHRH ορμόνης και του
συνθετικού αναλόγου αυτής λεουπρολιδίου, στον
πολλαπλασιασμό καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων
μαστού και στην έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών και των
ενδογενών αναστολέων τους.**

Ευαγγελία Ε. Πατεράκη

Χημικός

Πάτρα 2007

Η εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής ήταν:

1. Καθηγητής Π. Κορδοπάτης (Επιβλέπων)

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

2. Καθηγητής Ν. Κ. Καραμάνος

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

3. Λέκτορας Φ.Ν. Λάμαρη

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ευχαριστίες

Μέσα από τις σειρές αυτές θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής Παύλο Κορδοπάτη, για την υποστήριξη, καθοδήγηση και κατανόηση που έδειξε καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου καθώς και στον Καθηγητή του τμήματος Χημείας Νίκο Καραμάνο, με την παρότρυνση του οποίου πήρα την απόφαση να προχωρήσω την εργασία αυτή, παράλληλα με μία πλήρως ενεργή επαγγελματική ζωή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα του τμήματος Φαρμακευτικής, Φωτεινή Λάμαρη και το Διδάκτορα του τμήματος Χημείας Ανδρέα Ρουσσίδα για την αμέριστη ανταπόκρισή τους σε οτιδήποτε χρειάστηκα.

Τέλος ιδιαίτερα ευχαριστώ το σύζυγο και το γιό μου για την κατανόηση και τη στήριξη τους στην απόφαση μου αυτή...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<i>Λίγα λόγια για την LHRH</i>	6
1. Δομή και δράση της LHRH	7
2. Βιολογία του καρκίνου	10
2.1 Διήθηση και μετάσταση	12
2.2 Καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι	13
2.3 Καρκίνος του μαστού	14
2.4 Ταξινόμηση του Καρκίνου του μαστού	15
2.5 Μετάσταση	18
2.6 Εξωκυττάριος χώρος (ECM)	19
3. Δομή και ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) στον καρκίνο	21
3.1 Κατηγορίες των MMPs	22
3.2 Δομή των MMPs	23
3.3 Ενεργοποίηση των pro-MMPs	25
3.4 Ομάδες MMPs	26
3.4.1 Κολλαγονάσες	26
3.4.2 Στρωμαλυσίνες	29
3.4.3 Ζελατινάσες	31
3.4.4 Μεμβρανικού τύπου	32
3.4.5 Άλλες MMPs	33
3.5 Μεταλλοπρωτεϊνάσες και καρκίνος	34
4. Ενδογενείς αναστολείς των MMPs (TIMPs)	35
5. MMPs, TIMPs και καρκίνος μαστού	39

ΣΚΟΠΟΣ	42
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
1.Κυτταρικές καλλιέργειες	46
2.Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	47
3.Απομόνωση RNA	47
3.1 Επίτευξη περιβάλλοντος ελευθέρου από ριβονουκλεάσες	48
3.2 Πορεία απομόνωσης	49
3.3 Υπολογισμός της απόδοσης απομόνωσης και της καθαρότητας του RNA	50
3.4 Καθαρισμός του RNA από DNA	50
4.Ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	51
4.1 Βασική αρχή	51
4.2 Συστατικά της PCR αντίδρασης	53
4.3 RT-PCR	54
4.4 Πορεία RT-PCR	56
4.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης	58
5. Προσδιορισμός της MMP-9 σε επίπεδο πρωτεΐνης	59
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
1. Μελέτη της επίδρασης της φυσικής ορμόνης και του αγωνιστή της [D-Leu6, Pro9-NHEt]LHRH στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων	62
2. Επίδραση λεουπρολιδίου στην έκφραση των MMPs από τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα	64

3. Επίδραση λεουπρολιδίου στην έκφραση των ενδογενών αναστολέων των MMPs (TIMPs) από τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα	69
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	73
ABSTRACT	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77

Σ
Κ
Ο
Π
Ο
Σ

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία νεοπλασία του επιθηλίου του μαστού (Gallager et al) και αποτελεί την πιο κοινή κακοήθεια που εμφανίζεται στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών.

Προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει το σημαντικό ρόλο των οιστρογόνων στη δημιουργία και ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Στον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο, δηλαδή με όγκους θετικούς σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER+), η ορμονική θεραπεία έχει ως σκοπό τη μείωση των επιπέδων οιστρογόνων.

Ο αγωνιστής της Εκλυτικής Ωχρινोटρόπου Ορμόνης (LHRH) αποτελεί μία τέτοια προσέγγιση ορμονικής θεραπείας σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η LHRH συμμετέχει σ'ένα αυτοκρινή / παρακρινή τρόπο ρύθμισης της λειτουργίας φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων και τόσο αυτή όσο και οι υποδοχείς της έχουν ανιχνευτεί σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ορμονοεξαρτώμενο αλλά και ορμονικά ανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα διαφόρων οργάνων.

Σε περίπου 50% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού υπάρχουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας για τη LHRH και έχει δειχτεί από το 1985 (Miller et al) ότι οι αγωνιστές LHRH μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον περιγράφεται η έκφραση τόσο της LHRH-I αλλά και της LHRH-II από φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του μαστού σε βιοψίες και σε κυτταρικές σειρές που επιβάλλουν την αναθεώρηση της βιολογίας της LHRH και της θεραπευτικής χρήσης των αναλόγων της. Από την άλλη μεριά η διήθηση και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων απαιτούν την πρωτεολυτική αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου (ECM). Η διαδικασία αυτή υποβοηθείται από μία οικογένεια ενδοπεπτιδασών, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), που είναι δομικά και λειτουργικά παρόμοιες και εμπλέκονται στην αποικοδόμηση μακρομορίων που συνθέτουν τον εξωκυττάριο χώρο.

Η δραστηριότητα των MMPs μπορεί να ανασταλεί από τους ενδογενείς αναστολείς TIMPs (Duffy et al, 1998).

Το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, έχει εκτεταμένη εμπειρία στη σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων της LHRH (Zompra et al. 2006, Zompra et al. 2007) Η μελέτη των σχέσεων δομής-διαμόρφωσής και δομής-βιοδραστικότητας αποσκοπεί στη

σύνθεση νέων αναλόγων με υψηλότερη βιοδραστικότητα και καλύτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Το λεουπρολίδιο έχει αποτελέσει ένωση-οδηγό για το σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων πεπτιδικών αναλόγων του. Ειδικότερα, στο εργαστήριο, έχει αναπτυχθεί μια μεθοδολογία σύνθεσης του λεουπρολιδίου σε ινδολ-αιθυλάμιδο ρητίνη {[3-(αιθυλ-N-Fmoc-αμινομέθυλ)ινδολ-1-υλ]ακετυλ AM ρητίνη} με Fmoc/tBu χημεία, η οποία χαρακτηρίζεται από απόδοση 55%, μεγαλύτερη από αυτές που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

Το εργαστήριο έχει επίσης εμπειρία στη δημιουργία ουσιών που ονομάστηκαν LILs (liposomes in liposomes), των οποίων η παρασκευή βασίστηκε στη διαδικασία παρασκευής των SUV λιποσωμάτων (Saroglou V et al, 2006). Τα λιποσώματα έχει βρεθεί ότι μπορούν να τροποποιήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και να βελτιώσουν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φαρμάκων (Kulkarni SB et al, 1995) και πρόσφεραν πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα δέσμησης του λεουπρολιδίου. Η μορφή αυτή μπορεί να προσφέρει πλεονεκτήματα σε μελλοντικές εφαρμογές σχετιζόμενες με τη δέσμηση και μεταφορά των βιοδραστικών πεπτιδίων στους ιστούς – στόχους.

Με βάση τα παραπάνω, στηριζόμενοι στην εμπειρία του εργαστηρίου στη μελέτη του λεουπρολιδίου και των παραγώγων του και στα πλαίσια της αξιολόγησης της βιολογικής δράσης των πεπτιδικών ορμονών και αναλόγων τους στην κυτταρική ανάπτυξη καρκινικών σειρών, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της φυσικής ορμόνης LHRH-I και του αγωνιστή αυτής λεουπρολίδιο [D-Leu6, Pro9-NHEt] LHRH στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση MMPs και των ενδογενών αναστολέων τους TIMPs σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού.

Σ
Κ
Ο
Π
Ο
Σ

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία νεοπλασία του επιθηλίου του μαστού (Gallager et al) και αποτελεί την πιο κοινή κακοήθεια που εμφανίζεται στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών.

Προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει το σημαντικό ρόλο των οιστρογόνων στη δημιουργία και ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Στον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο, δηλαδή με όγκους θετικούς σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER+), η ορμονική θεραπεία έχει ως σκοπό τη μείωση των επιπέδων οιστρογόνων.

Ο αγωνιστής της Εκλυτικής Ωχρινोटρόπου Ορμόνης (LHRH) αποτελεί μία τέτοια προσέγγιση ορμονικής θεραπείας σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η LHRH συμμετέχει σ'ένα αυτοκρινή / παρακρινή τρόπο ρύθμισης της λειτουργίας φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων και τόσο αυτή όσο και οι υποδοχείς της έχουν ανιχνευτεί σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ορμονοεξαρτώμενο αλλά και ορμονικά ανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα διαφόρων οργάνων.

Σε περίπου 50% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού υπάρχουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας για τη LHRH και έχει δειχτεί από το 1985 (Miller et al) ότι οι αγωνιστές LHRH μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον περιγράφεται η έκφραση τόσο της LHRH-I αλλά και της LHRH-II από φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του μαστού σε βιοψίες και σε κυτταρικές σειρές που επιβάλλουν την αναθεώρηση της βιολογίας της LHRH και της θεραπευτικής χρήσης των αναλόγων της. Από την άλλη μεριά η διήθηση και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων απαιτούν την πρωτεολυτική αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου (ECM). Η διαδικασία αυτή υποβοηθείται από μία οικογένεια ενδοπεπτιδασών, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), που είναι δομικά και λειτουργικά παρόμοιες και εμπλέκονται στην αποικοδόμηση μακρομορίων που συνθέτουν τον εξωκυττάριο χώρο.

Η δραστηριότητα των MMPs μπορεί να ανασταλεί από τους ενδογενείς αναστολείς TIMPs (Duffy et al, 1998).

Το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, έχει εκτεταμένη εμπειρία στη σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων της LHRH (Zompra et al. 2006, Zompra et al. 2007) Η μελέτη των σχέσεων δομής-διαμόρφωσής και δομής-βιοδραστηριότητας αποσκοπεί στη

σύνθεση νέων αναλόγων με υψηλότερη βιοδραστικότητα και καλύτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Το λεουπρολίδιο έχει αποτελέσει ένωση-οδηγό για το σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων πεπτιδικών αναλόγων του. Ειδικότερα, στο εργαστήριο, έχει αναπτυχθεί μια μεθοδολογία σύνθεσης του λεουπρολιδίου σε ινδολ-αιθυλάμιδο ρητίνη {[3-(αιθυλ-N-Fmoc-αμινομέθυλ)ινδολ-1-υλ]ακετυλ AM ρητίνη} με Fmoc/tBu χημεία, η οποία χαρακτηρίζεται από απόδοση 55%, μεγαλύτερη από αυτές που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

Το εργαστήριο έχει επίσης εμπειρία στη δημιουργία ουσιών που ονομάστηκαν LILs (liposomes in liposomes), των οποίων η παρασκευή βασίστηκε στη διαδικασία παρασκευής των SUV λιποσωμάτων (Saroglou V et al, 2006). Τα λιποσώματα έχει βρεθεί ότι μπορούν να τροποποιήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και να βελτιώσουν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φαρμάκων (Kulkarni SB et al, 1995) και πρόσφεραν πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα δέσμησης του λεουπρολιδίου. Η μορφή αυτή μπορεί να προσφέρει πλεονεκτήματα σε μελλοντικές εφαρμογές σχετιζόμενες με τη δέσμηση και μεταφορά των βιοδραστικών πεπτιδίων στους ιστούς – στόχους.

Με βάση τα παραπάνω, στηριζόμενοι στην εμπειρία του εργαστηρίου στη μελέτη του λεουπρολιδίου και των παραγώγων του και στα πλαίσια της αξιολόγησης της βιολογικής δράσης των πεπτιδικών ορμονών και αναλόγων τους στην κυτταρική ανάπτυξη καρκινικών σειρών, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της φυσικής ορμόνης LHRH-I και του αγωνιστή αυτής λεουπρολίδιο [D-Leu6, Pro9-NH₂] LHRH στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση MMPs και των ενδογενών αναστολέων τους TIMPs σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού.

Π
Ε
Ι
Ρ
Α
Μ
Α
Τ
Ι
Κ
Ο

Μ
Ε
Ρ
Ο
Σ

1. Κυτταρικές καλλιέργειες

Η παρούσα μελέτη έγινε στην θετική σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER⁺) χαμηλής μεταστατικότητας σειρά επιθηλιακών κυττάρων μαστού ανθρώπου (MCF-7). Η κυτταρική σειρά ελήφθησε από την εταιρεία ATCC (American Type Culture Collection). Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε EMEM (Biochrom) θρεπτικό υλικό, συμπληρωμένο με 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum, ορός αίματος βόειου εμβρύου), παρουσία 2 mM L-γλουταμίνης, 1.0 mM πυροσταφυλικού νατρίου, 0.1 mM μη απαραίτητων αμινοξέων, 1.5 g/L όξινου ανθρακικού νατρίου και 10 μg/mL βόειας ινσουλίνης. Για την προστασία των καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις των 100 IU/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη, 10 μg/mL γενταμυκίνη και 2.5 μg/mL αμφοτερεσίνη B.

Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% (v/v) CO₂, με αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 48-72 h. Οι πλήρεις καλλιέργειες (~80%) εκπλύθηκαν με PBS και τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από ενζυμική κατεργασία με διάλυμα θρυψίνης, περιεκτικότητας 0.05% (w/v) θρυψίνης σε PBS που περιείχε 0.02% (w/v) Na₂EDTA. Η συλλογή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση στις 1700 στροφές για 3 min. Όταν τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη νέας καλλιέργειας, επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό και τοποθετήθηκαν σε νέες φιάλες κυτταρικών καλλιεργειών. Όταν χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή πειραμάτων κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και συγκεκριμένοι αριθμοί κυττάρων τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες καλλιέργειας, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση του RNA τους, έγινε έκπλυση τους με ψυχρό PBS (4°C) και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση και συλλογή τους.

Για τη μελέτη της δράσης του αγωνιστή LH-RH Leuprolide στην έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών και των ενδογενών τους αναστολέων, έγινε προσθήκη στις φιάλες των καλλιεργειών των καρκινικών κυττάρων στη συγκέντρωση των 30 μM παρουσία ορού για 48 h.

1. Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έγινε με δύο τρόπους.

Ο πρώτος αφορά στην προσθήκη ραδιενεργά επισημασμένης θυμιδίνης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και την ενσωματώσή αυτής στο γενετικό τους υλικό. Έτσι στις καλλιέργειες 16 h πριν το τέλος του πειράματος προστίθενται 0.15 $\mu\text{Ci/mL}$ [^3H]-θυμιδίνη. Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και τα κύτταρα εκπλένονται με PBS, οπότε προστίθεται διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος (TCA) 10% w/v, θερμοκρασίας 4°C. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με το διάλυμα του TCA επί 10 min και στη συνέχεια εκπλένονται καλά με νερό. Όταν στεγνώσουν, το μονιμοποιημένο DNA διαλυτοποιείται με την προσθήκη 0.5 mL 0.3 N NaOH/0.1% SDS. Τα λύματα προστίθενται σε υγρό σπινθηρισμού και μετρώνται σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

Ο δεύτερος τρόπος χρησιμοποιεί το αντιδραστήριου 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην αναγωγή του MTT σε ένα μπλε προϊόν φορμαζάνης από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η ένταση του μπλε χρώματος αποτελεί μέτρο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Τρεις (3) ώρες πριν το τέλος του πειράματος προστίθεται αντιδραστήριου MTT (5 mg MTT/mL PBS) στο θρεπτικό μέσο ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.5 mg/mL. Μετά την επώαση και έλεγχο με το μικροσκόπιο, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και διαλυτοποιούνται σε DMSO. Η απορρόφηση στα 490 nm μετράται με φωτόμετρο ELISA.

2. Απομόνωση RNA

Η καθαρότητα και ακεραιότητα του RNA που απομονώνεται από τα κύτταρα είναι σημαντικοί παράγοντες για τη χρήση του σε διάφορες τεχνικές, μια από τις οποίες είναι και η ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR).

Η επιτυχής απομόνωση ακέραιου RNA απαιτεί την πραγματοποίηση τεσσάρων βημάτων:

- i) Επιτυχή διάσπαση των κυττάρων
- ii) Μετουσίωση των συμπλόκων νουκλεοπρωτεϊνών
- iii) Απενεργοποίηση της δράσης των ενδογενών ριβονουκλεασών (RNase), και
- iv) Καθαρισμό του RNA από DNA και πρωτεΐνες.

Το σημαντικότερο βήμα είναι η απενεργοποίηση της δράσης των ενδογενών ριβονουκλεασών, που απελευθερώνονται από οργάνidia της κυτταρικής μεμβράνης κατά την διάσπαση του κυττάρου (Makatsori and Karamanos, 1998).

Το RNA βρίσκεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το κυτταροπλασματικό RNA αποτελείται από ριβοσωμικό RNA (rRNA), μεταφορικό RNA (tRNA), αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και άλλα μικρά τμήματα RNA. Στον πυρήνα βρίσκεται το ετεροπυρηνικό RNA (hnRNA), πρόδρομος του RNA. Μόνο το 1-2% του ολικού RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι mRNA. Η πλειοψηφία του ολικού RNA είναι rRNA.

Η επιλογή της μεθόδου απομόνωσης του RNA εξαρτάται από την προέλευση, το είδος, τη διαθεσιμότητά του και την ποσότητα του αρχικού δείγματος. Το RNA είναι επιρρεπές στην αποικοδόμηση και πρέπει να λαμβάνονται πολλές προφυλάξεις κατά την απομόνωσή του. Όλες οι μέθοδοι απομόνωσης RNA χρησιμοποιούν ισχυρά μετουσιωτικά για να παρεμποδίσουν τις ενδογενείς RNases και να ληφθεί ανέπαφο το RNA. Οι πιο κοινές μέθοδοι απομόνωσης του RNA διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: σε αυτές που χρησιμοποιούν 4M θειοκυανική γουανιδίνη (Cox, 1968) και σε αυτές που χρησιμοποιούν φαινόλη και SDS (Kirby, 1968).

3.1 Επίτευξη περιβάλλοντος ελευθέρου από ριβονουκλεάσες

Η απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών (RNases) είναι εξαιρετικά δύσκολη. Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στη μη επιθυμητή εισαγωγή ριβονουκλεασών στο RNA που απομονώνεται, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, ή και μετά από αυτήν, από εξωγενείς παράγοντες. Οι πιο κοινές πηγές μόλυνσης είναι τα χέρια του ερευνητή και τα βακτήρια που βρίσκονται στη σκόνη και στα γυαλικά του εργαστηρίου. Για την αποφυγή τέτοιου είδους μόλυνσης πρέπει να υπάρχουν στείρες συνθήκες, να γίνεται χρήση αποστειρωμένων εξαρτημάτων και ο ερευνητής να φοράει συνέχεια

γάντια. Η αποστείρωση των γυαλικών πραγματοποιείται με θέρμανση στους 200°C για 18 h, ενώ των πλαστικών είτε με ξέπλυμα με 0.1 N NaOH / 1mM EDTA και στη συνέχεια με νερό που δεν περιέχει ριβονουκλεάσες (κατεργασμένο με DEPC, diethyl pyrocarbonate). Η κατεργασία με DEPC γίνεται ως εξής: υδατικό διάλυμα DEPC 0.1% (v/v) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h και κατόπιν αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο για την απομάκρυνση τυχόν εναπομένοντος ίχνους DEPC (Fedorcsak and Ehrenberg, 1966).

3.2 Πορεία απομόνωσης

Η πορεία της απομόνωσης του RNA έγινε με την μέθοδο της θειοκυανικής γουανιδίνης (GTC) και της β-μερκαπτοαιθανόλης (Promega GmbH, Hilden, Germany), και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Μεταφορά των κυττάρων σε φυγοκεντρικό σωλήνα, έκπλυση με ψυχρό PBS (4°C), φυγοκέντρωση στις 1700 στροφές για 3 min και μεταφορά σε πάγο.
2. Διάσπαση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων με τα αποδιατακτικά GTC και θεικό δωδεκύλικό νάτριο (SDS), και απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών που βρίσκονται στο εκχύλισμα των κυττάρων με β-μερκαπτοαιθανόλη. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπεται στο RNA να αποδεσμευτεί στο διάλυμα ελεύθερο από πρωτεΐνες. Υψηλές συγκεντρώσεις GTC παρουσία SDS προκαλούν επιλεκτική καταβύθιση των πρωτεϊνών του κυττάρου, με το RNA να παραμένει στο υπερκείμενο. Φυγοκέντρωση στις 13,000 στροφές για 10 min και παραλαβή του υπερκειμένου.
3. Καταβύθιση του RNA με την προσθήκη αιθανόλης 95% και φυγοκέντρωση στις 13,000 στροφές για 1 min.
4. Προσθήκη διαλύματος πέψης του DNA που περιέχει $MnCl_2$ και δεοξυριβονουκλεάση (DNase I), για την απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA. Επώαση για 15 min στους 20-25°C.
5. Προσθήκη ενός διαλύματος που περιέχει 2 M ισοθειοκυανική γουανιδίνη, 4 mM Tris-HCl (pH 7.5) και 57% (v/v) αιθανόλη και προκαλεί την λήξη της δράσης του διαλύματος που προκαλεί την ενζυμική διάσπαση του DNA. Φυγοκέντρωση στις 13,000 στροφές για 1 min.
6. Περαιτέρω καθαρισμός γίνεται με διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 60 mM οξικού καλίου, 10 mM Tris HCl (pH 7.5) και 60% (v/v) αιθανόλη, για την απομάκρυνση

αλάτων, πρωτεϊνών και διαφόρων κυτταρικών ακαθαρσιών, τρεις φορές στις 13,000 στροφές για 1 min.

7. Έκλουση του RNA με νερό που δεν περιείχε νουκλεάσες και παραλαβή του με φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές για 1 min.

3.3 Υπολογισμός της απόδοσης απομόνωσης και της καθαρότητας του RNA

Η απόδοση της απομόνωσης προσδιορίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm, όπου μια μονάδα απορρόφησης (A_{260}) ισοδυναμεί με 40 μg μονόκλωνου RNA/mL ($1 A_{260}\text{unit} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$). Το RNA για να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις DNA ή πρωτεϊνών. Το καθαρό RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} = 2$. Όταν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1.7-2.0 τότε το RNA θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Αν ο παραπάνω λόγος είναι πολύ διαφορετικός συνίσταται επανεκχύλιση του RNA με συνέπεια χαμηλή απόδοση στην απομόνωση. Η τυχόν επιμόλυνση του RNA από DNA ελέγχεται με αντίδραση PCR και ηλεκτροφόρηση αгарόζης 2% (w/v) παρουσία βαφής Gelstar stain (BioWhittaker, Rockland, ME USA) και UV. Αν το RNA δεν έχει επιμολυνθεί, η PCR δε θα δώσει κανένα αποτέλεσμα.

3.4 Καθαρισμός του RNA από DNA

Σε περίπτωση που το παρασκεύασμα του RNA περιέχει γονιδιακό DNA, αντί για επανεκχύλιση που θα είχε ως αποτέλεσμα απώλεια ~40% του RNA που απομονώθηκε, μπορεί να γίνει κατεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase).

Για το σκοπό αυτό, γίνεται προσθήκη του ενζύμου σε αναλογία 0.2 units ανά 2 μg συνολικού RNA και κατεργασία για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνολικό όγκο 10 μL , χρησιμοποιώντας 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, το οποίο περιέχει 2 mM MgCl_2 , 50 mM KCl και 40 units αναστολέα των ριβονουκλεασών (RNase inhibitor). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 μL διαλύματος 25 mM Na_2EDTA και επώαση στους 65°C για 15 min για την αδρανοποίηση του ενζύμου και την αποδιάταξη του RNA, εάν αυτό απαιτείται για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA).

4. Ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

4.1 Βασική αρχή

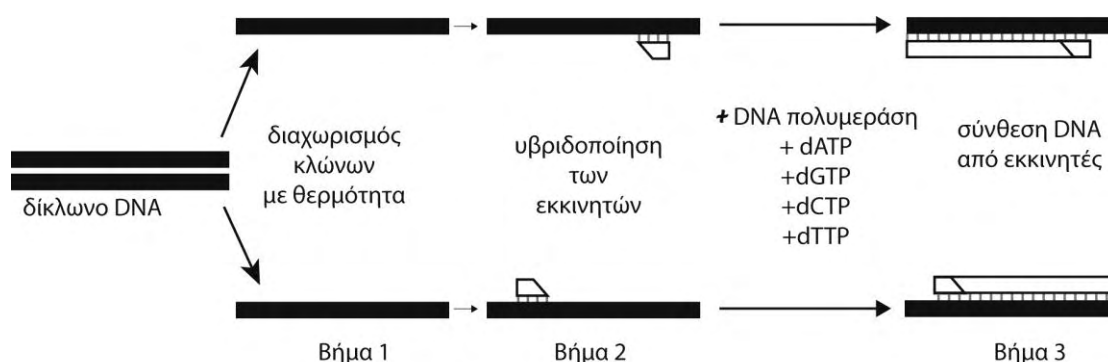
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή μιμείται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος (Makatsori and Karamanos, 1998). Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της. Η τεχνική αναπτύχθηκε το 1984 από τον Dr. Kary Banks Mullis, ερευνητή της εταιρείας Cetus Corporation, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993 για τη συνεισφορά του αυτή.

Με την τεχνική PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση *in vitro* ενός τμήματος DNA. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών το DNA στόχος πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κλώνων της αντίδρασης.

Το DNA στόχος που πρόκειται να ενισχυθεί, προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με DNA πολυμεράση, εκκινητικά μόρια, δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και μαγνήσιο, και υπόκειται σε μια εναλλαγή θερμοκρασιών. Το DNA στόχος είναι αυτό που θα αποτελέσει το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αφετηρία τους εκκινητές, δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση στους 95°C, για 15 sec - 2 min. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον.
2. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40-60°C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται με τους κλώνους του DNA στόχου και τα δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητικά μόρια.

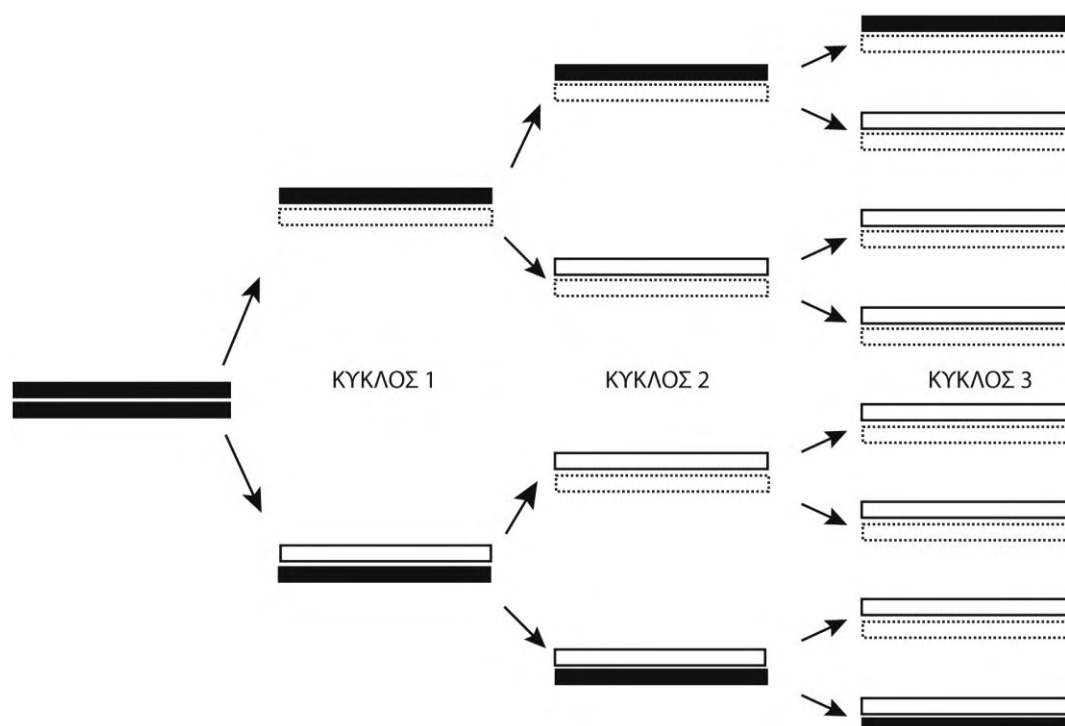
3. Τέλος, ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2 min και πραγματοποιείται στους 74°C.



Σχήμα 13: Στάδια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR. Στάδιο I: μετουσίωση δίκλωνου DNA. Στάδιο II: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA. Στάδιο III: Επιμήκυνση της αλυσίδας κατόπιν προσθήκης βάσεων με την επίδραση της DNA-πολυμεράσης.

Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1 όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA (Σχήμα 13).

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον τέσσερις και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2^ο κύκλο. Στο τέλος του 2^{ου} κύκλου οι κλώνοι θα είναι οκτώ και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός ανατύπων του στόχου DNA, επειδή οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου, 2ⁿ όπου n ο αριθμός των κύκλων (Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1^{ου} κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2^{ου} κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3^{ου} κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

4.2 Συστατικά της PCR αντίδρασης

❶ Taq DNA πολυμεράση

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας την θερμοάαντοχη Taq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μειωμένη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών, και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και την απόδοση του προϊόντος. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει $5' \rightarrow 3'$ δράση εξωνουκλεάσης.

❷ Ολιγονουκλεοτίδια - Εκκινητές

Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται, μεταξύ 20-30 νουκλεοτιδίων και πάντα πρέπει να αποτελούνται από τουλάχιστον 16 νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60%

γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών κατά την διάρκεια της PCR. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά βάση των σημείων τήξης τους, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές.

❸ Ρυθμιστικά διαλύματα

Το πιο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) και 1.5 mM $MgCl_2$. Τα ιόντα Mg^{2+} είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της Taq DNA πολυμεράσης. Απουσία των ελευθέρων ιόντων μαγνησίου, η DNA πολυμεράση είναι ανενεργή, ενώ σε περίσσεια αυτής η ακρίβεια του ενζύμου μειώνεται και είναι πιο πιθανή η πραγματοποίηση μη ειδικής ενίσχυσης. Η συγκέντρωση χηλικών παραγόντων, όπως είναι το EDTA, ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες, όπως είναι τα φωσφορικά ιόντα, πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα και αυτό γιατί χηλικοί ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες θα δημιουργούσαν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg^{2+} με αρνητικά αποτελέσματα στη δράση της Taq DNA πολυμεράσης.

❹ dNTPs

Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις κορεσμού (0.2 mM το καθένα).

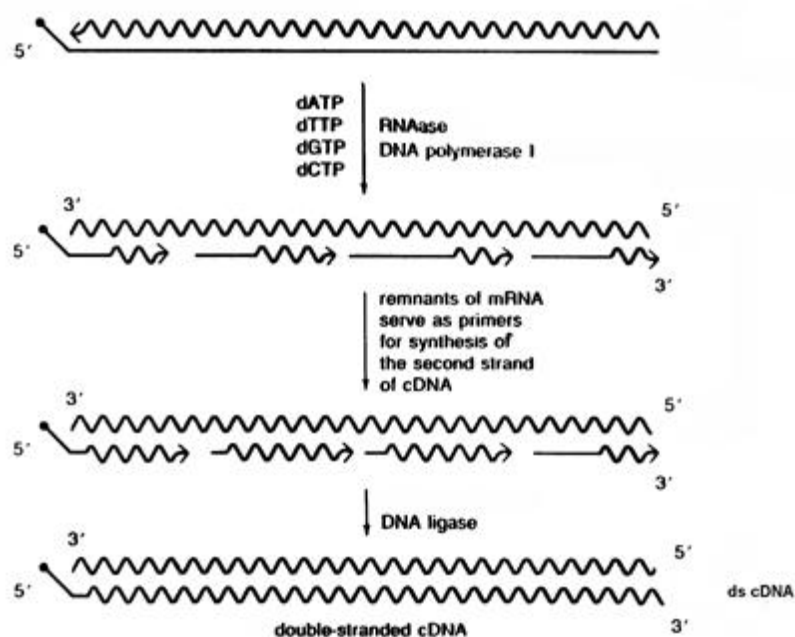
❺ Αλληλουχίες-στόχοι

Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονο- αλλά και δίκλωνη μορφή. Το μέγεθος του DNA δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, αλλά έχειδειχθεί ότι είναι καλύτερο μεγάλα τμήματα DNA να χρησιμοποιούνται αφού πρώτα γίνει η διάσπασή τους με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου μέσα στο τμήμα του DNA που χρησιμοποιείται δεν είναι συχνά υπό τον έλεγχο του ερευνητή. Θα ήταν ωφέλιμο, πριν από την πραγματοποίηση των πειραμάτων, να γινόταν μια σειρά πειραμάτων ελέγχου με διαφορετικά ποσά των γνωστών αλληλουχιών έτσι ώστε να ελεγχθεί η ευαισθησία της αντίδρασης (Makatsori and Karamanos, 1998).

4.3 RT-PCR

Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοστεί και για τη γονιδιακή επέκταση RNA. Επειδή όμως, οι θερμοάαντοχες πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία

της βασικής PCR απαιτούν ένα εκμαγείο DNA, πρέπει πρώτα το RNA μετατραπεί σε συμπληρωματικό του DNA (cDNA) (Σχήμα 15). Αυτό γίνεται με τη δράση του ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ανάστροφη μεταγραφάση (RT-PCR) είναι δυνατή η γονιδιακή επέκταση RNA ιών.



Σχήμα15: Αντίστροφη μεταγραφή και παραγωγή cDNA. Η DNA πολυμεράση I, έχοντας ως εκμαγείο το μονόκλωνο RNA, συνθέτει έναν δεύτερο συμπληρωματικό κλώνο, σχηματίζοντας το cDNA.

Υπάρχουν δυο ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη ανάστροφης μεταγραφάσης, η μια προέρχεται από ιό μυελοβλάστωσης πτηνών (AMV) και η άλλη από ιό της λευχαιμίας Moloney και ποντικών (M-MLV). Άλλα είδη αντίστροφης μεταγραφάσης είναι η Taq DNA πολυμεράση, η οποία είναι μια τροποποιημένη 94 kDa DNA πολυμεράση, και κάποια ανασυνδυασμένα ετεροδιμερή ένζυμα. Η Taq DNA πολυμεράση απομονώνεται από το γένος *Thermus aquaticus*, το οποίο εκφράζεται σε *E.coli* και προσφέρει υψηλά εξειδικευμένη ενίσχυση κατά τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του cDNA, έχοντας αντοχή σε μεγάλες θερμοκρασίες. Τα ανασυνδυασμένα ετεροδιμερή ένζυμα εκφράζονται και αυτά σε *E.coli* και προσφέρουν υψηλή αποτελεσματικότητα και εξειδίκευση στην αντίστροφη μεταγραφή.

4.4 Πορεία RT-PCR

Η πορεία της PCR, για την παραλαβή cDNA από RNA, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον προμηθευτή των αντιδραστηρίων (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

Για την παρασκευή του cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα 1 μ g RNA ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 1 μ M. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 50 μ l ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε Tris-HCl, KCl, DTT, $MgCl_2$ και ποσότητα από τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP).

Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται πιο πάνω για την PCR αφού ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 30 min στους 50°C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια 15 min στους 95°C για την ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης και απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, 30 sec στους 94°C για τη μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA, 30 sec στη θερμοκρασία υβριδοποίησης ανάλογα με τον κάθε εκκινητή (Πίνακας I και II) και 1 min στους 72°C για την επέκταση των κλώνων. Το τελικό βήμα ήταν η τελική επέκταση η οποία έγινε για 10 min στους 72°C. Ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση κυμαινόταν ανάλογα με τις απαιτήσεις των εκκινητών.

Οι αλληλουχίες των cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) (Takada *et al.*, 1994), η οποία είναι ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς (housekeeping gene). Στις ίδιες συνθήκες με την εκτέλεση της RT-PCR αντίδρασης για τις μεταλλοπρωτεΐνάσες και τους ενδογενείς αναστολείς τους γινόταν RT-PCR αντίδραση και με τους εκκινητές για το cDNA της GAPDH.

Πίνακας Ι: Εκκινητές και συνθήκες RT-PCR για την ταυτοποίηση mRNAs που κωδικοποιούν τις MMPs.

MMPs	Up-stream	Down-stream	Length (bp)	T _{an.} (°C)	cycles
MMP-1	ATTGGAGCAGCAAGAGGCTGGGA	TTCCAGGTATTTCTGGACTAAGT	183	60	35
MMP-2	CACAGCCAACTACGATGACG	CTCCTGAATGCCCTTGATGT	828	57	35
MMP-3	GCATAGAGACAACATAGAGCT	TTCTAGATATTTCTGAACAAGG	156	60	35
MMP-7	AGATGTGGAGTGCCAGATGT	TAGACTGCTACCATCCGTCC	324	60	35
MMP-9	GGCCCTTCTACGGCCACT	CAGAGAATCGCCAGTACTT	515	57	35
MMP-11	CGCAACCGACAGAAGAGGTTTCG	GCAGGAAGTAGGCATAGCCATCAG C	-	60	35
MMP-14	CGCTACGCCATCCAGGGTCTCAAA	CGGTCATCATCGGGCAGCACAAAA	497	62	35
MMP-15	ACAACCACCATCTGACCTTTAGCA	AGCTTGAAGTTGTCAACGTCCTTC	454	62	35
MMP-16	TTACTTCTGGCGGGGCTTGCCTCCTA GTAT	ACAGTACAGTATGTGGCGGGGTGT TCCTTT	652	58	35
GAPDH	ACATCATCCCTGCCTCTACTGG	AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC	261	-	-

Πίνακας ΙΙ: Εκκινητές και συνθήκες RT-PCR για την ταυτοποίηση mRNAs που κωδικοποιούν τους TIMPs.

1 TIM Ps	Up-stream	Down-stream	Length (bp)	T _{an.} (°C)	cycles
TIMP-1	CTTCCACAGGTCCCACAACC	CAGCCCTGGCTCCCGAGGC	300	60	30
TIMP-2	GATGCACATCACCTCTGTG	GTGCCCCGTTGATGTTCTTCT	303	60	30
TIMP-3	CGCTGGTCTACACCATCAAGC	CAGGAGGATAGTTCCCAATAAACC	658	60	30
TIMP-4	CAGTGAGAAGGTAGTTCCGGCC	TCTTATTAGCTGGCAGCAAGAGG	626	60	30

4.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος των προϊόντων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris - βορικό οξύ - EDTA, pH 8.3 (TBE), που περιείχε Gelstar[®] Stain (5 μ L βαφής / 50 mL TBE). Η βαφή αυτή είναι μια υψηλά ευαίσθητη φθορίζουσα ουσία για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου. Συμπλοκοποιείται στην διπλή έλικα του DNA και με αυτόν τον τρόπο το καθιστά ορατό κάτω από UV ακτινοβολία, έχοντας όμως μικρότερη επίδραση στη μετανάστευση του DNA αλλά και μικρότερη τοξικότητα από αυτήν του βρωμιούχου εθιδίου (EtBr).

Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ποσότητα βαφής φόρτωσης των δειγμάτων, το προϊόν της RT-PCR ανάλυσης για τη GAPDH και TBE. Η βαφή φόρτωσης των δειγμάτων (loading dye), περιέχει 15% (v/v) Ficoll[®] 400, 0.03% (w/v) bromophenol blue, 0.03% (w/v) xylene cyanol FF, 0.4% (w/v) orange G, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) και 50 mM EDTA, ενώ η συνιστώμενη ποσότητα ενδείκνυται σε ένα μέρος βαφής για κάθε πέντε μέρη διαλύματος DNA.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο 90 V για 2 h, ενώ τόσο η άνοδος όσο και η κάθοδος ήταν βυθισμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M TBE. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR αντίδρασης έγινε με τοποθέτηση των πηκτωμάτων πάνω σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η φωτογράφιση των πηκτωμάτων έγινε με CCD κάμερα ενώ η ανάλυση, η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των ζωνών στα πηκτώματα αγαρόζης έγιναν βάση του προγράμματος ανάλυσης εικόνας UNIDocMn version 99.03 for Windows (UVI Tech, Cambridge, UK) έπειτα από μέτρηση και ολοκλήρωση του εκπεμπόμενου φθορισμού των ζωνών. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος του φθορισμού του κάθε μορίου που αναλύθηκε με διαίρεση της τιμής του φθορισμού του με την τιμή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) που χρησιμοποιήθηκε.

3. Προσδιορισμός της MMP-9 σε επίπεδο πρωτεΐνης

Το εξωκυττάριο υλικό καλλιέργειας διαχωρίστηκε από τα κύτταρα με απλή απόχυση και συλλέχθηκε.

Ο προσδιορισμός της MMP-9 έγινε με μη συναγωνιστική ανοσοενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο (ELISA) σε μικροπλάκες. Η ακινητοποίηση του αντιγόνου (MMP-9) έγινε στις μικροπλάκες πολυστυρολίου ενώ η ανίχνευσή του έγινε με ενζυμοσύνδετα αντισώματα και ως εκ τούτου η μέθοδος ονομάζεται ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA).

Μετά από έκθεση των μικροπλακών πολυστυρολίου σε υπεριώδη ακτινοβολία για 15 min., τα δείγματα ή διαλύματα MMP-9 γνωστής συγκέντρωσης (50 μL /κελλίο) ακινητοποιούνται στα κελλία της μικροπλάκας με θέρμανση στους 60°C για 4 h. Τα μόρια που δεν ακινητοποιούνται στην πλάκα καθώς και τα χαλαρά συνδεδεμένα απομακρύνονται με τρεις πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate-Buffered Saline, PBS) που περιέχει 0.1% (v/v) Tween 20 (200 μL PBS-T/κελλίο). Με σκοπό την αποφυγή δημιουργίας μη ειδικών δεσμεύσεων, που θα αλλοίωναν το τελικό αποτέλεσμα, οι μικροπλάκες επωάζονται με διάλυμα 4% (w/v) ζελατίνης σε PBS-T για 1 h στους 25°C. Στη συνέχεια εκπλύνονται με PBS-T (200 μL /κελλίο) και επωάζονται για 16 h στους 4°C με ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της MMP-9 (Chemicon International) (100 μL /κελλίο) συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/mL}$ σε PBS-T. Μετά το πέρας της επώασης και των εκπλύσεων με PBS-T, η ανίχνευση γίνεται με επώασης για 1 h στους 37°C με υπεράντιστο ορό αίματος αιγός έναντι IgG κουνελιού συζευγμένο με υπεροξειδάση ραπανιού (Sigma Chemical Company) αραιωμένο 1:2000 σε PBS-T (100 μL /κελλίο). Στη συνέχεια, οι πλάκες εκπλύνονται προσεκτικά και προστίθεται διάλυμα 0.1 M κιτρικού νατρίου που περιέχει 0.4 mg/mL υδροχλωρικής ορθο-φαινυλενοδιαμίνης και 0.03% (v/v) H_2O_2 (100 μL /κελλίο). Η χρωμοαντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. απουσία φωτός και τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος 1 M H_2SO_4 (100 μL / κελλίο). Η απορρόφηση των εγχρώμων προϊόντων μετράται σε μήκος κύματος 490 nm με τη βοήθεια ειδικού φωτομέτρου (Molecular Devices E-max photometer). Για το έλεγχο παρουσίας μη ειδικών δεσμεύσεων, για κάθε αντίδραση ορισμένα κελλία επιστρώνονται μόνο με

ζελατίνη ενώ για άλλα κελλία που έχουν επιστρωθεί με δείγμα παραλείπεται το στάδιο της προσθήκης του ειδικού αντισώματος έναντι της MMP-9. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού SOFT max PRO (version 1.2.0) της εταιρείας Molecular Devices.

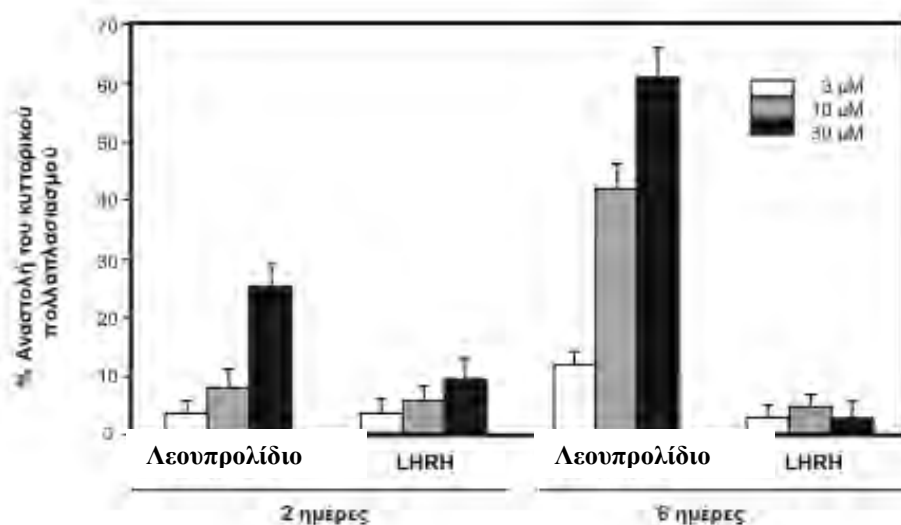
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Μελέτη της επίδρασης της φυσικής ορμόνης και του αγωνιστή της [D-Leu⁶, Pro⁹-NH₂Et]LHRH στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων

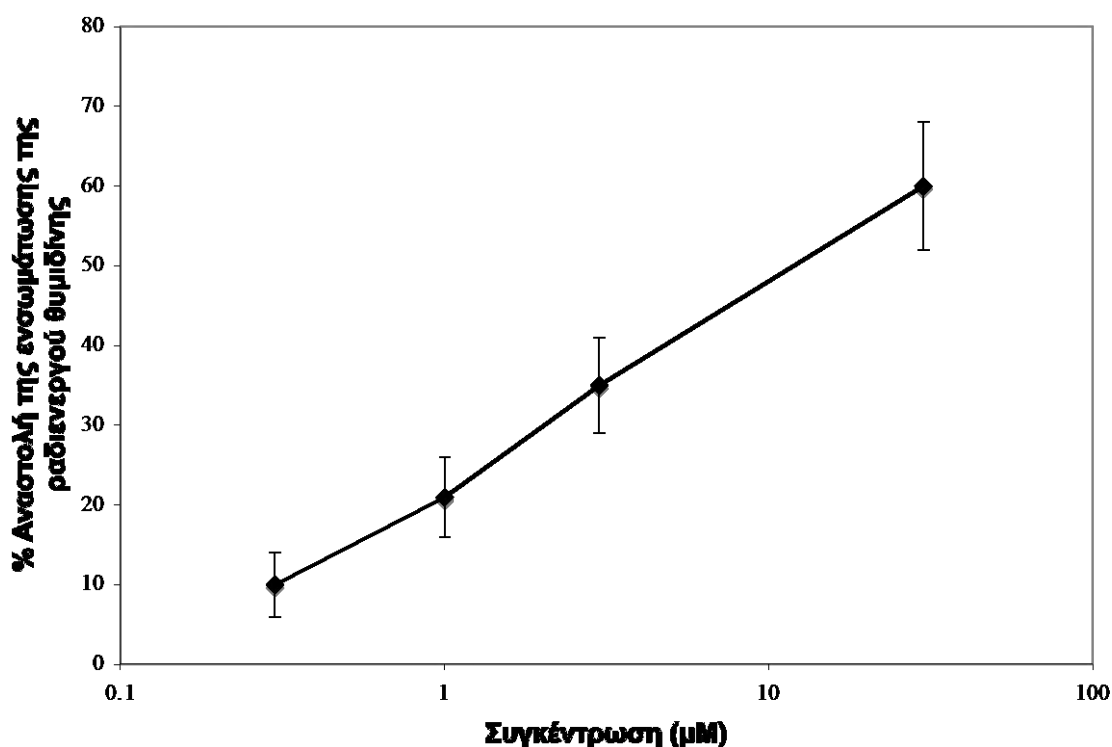
Τα οιστρογονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα (MCF-7) κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις της φυσικής ορμόνης και του λεουπρολιδίου για διαφορετικά χρονικά διαστήματα παρουσία ορού και η κυτταρική βιωσιμότητα μετρήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT (Σχήμα 16). Τα αποτελέσματα δείχνουν μια δοσο-εξαρτώμενη και χρόνο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από το λεουπρολίδιο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3 μ M. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν άμεση ανασταλτική δράση αναλόγων της LHRH στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού [Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM. Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature*. 1985 Jan 17-23;313(5999):231-3.]. Ειδικά για το λεουπρολίδιο, είχε προηγουμένως αναφερθεί ότι μόνο του σε συγκέντρωση 1 μ M δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων που καλλιεργούνται παρουσία ορού, ο οποίος είχε επεξεργαστεί με ενεργό άνθρακα (charcoal-treated) [Sica G, Iacopino F, Marini L, Robustelli della Cuna G. Antiproliferative effect of leuporelin acetate, alone or combined with tamoxifen or medroxyprogesterone acetate, on human breast cancer cell lines. *Clin Ther*. 1992;14 Suppl A:87-96.]. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιβεβαιώνουν τις δικές τους παρατηρήσεις αφού η αναστολή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 3 μ M και τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία ορού, ο οποίος περιέχει πληθώρα αυξητικών παραγόντων/κυτταροκινών που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό τους. Η φυσική ορμόνη δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από δύο ή έξι ημέρες επώαση. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη επιδεκτικότητα της φυσικής ορμόνης στην πρωτεολυτική δράση πολλών ενζύμων. Φυσιολογικά καταβολίζεται εντός ολίγων λεπτών. Οι πεπτιδικοί δεσμοί μεταξύ Tyr⁵ και Gly⁶, καθώς και Gly⁶ και Leu⁷ αποτελούν στόχο για πολλές ενδοπεπτιδάσες, ενώ ο δεσμός μεταξύ Pro⁹ και Gly¹⁰ αποτελεί στόχο για καρβοξυ-πεπτιδάσες. Η αλλαγή της Gly⁶ με το μη φυσικό αμινοξύ D-Leu⁶,

η απαλοιφή της τελικής Pro¹⁰ και η εισαγωγή της αιθυλομάδας στην τελική αμινομάδα της Pro⁹ στο μόριο του λεουπρολιδίου εξηγούν την αυξημένη σταθερότητα του μορίου στα πρωτεολυτικά ένζυμα.



Σχήμα 16. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της φυσικής ορμόνης LHRH και του αγωνιστή αυτής Λεουπρολιδίου στον αριθμό των κυττάρων MCF-7 (5000 κύτταρα/κελλίο ανάπτυξης κυττάρων), όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT. Η επώαση έγινε παρουσία ορού στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων. Για την επώαση των 6 ημερών το θρεπτικό μέσο άλλαζε κάθε 48 h. Τα πειράματα έγιναν σε τρεις επαναλήψεις και οι μετρήσεις εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με καλλιέργειες απουσία ορμόνης.

Με σκοπό την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του Λεουπρολιδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MCF-7 κυττάρων, μετρήθηκε η επίδραση της επώασης των κυττάρων παρουσία ορού με διαφορετικές συγκεντρώσεις στην ενσωμάτωση της ραδιενεργού θυμιδίνης (Σχήμα 17). Επιβεβαιώθηκε η δόσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση του Λεουπρολιδίου στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων. Από το διάγραμμα αυτό, προκύπτει ότι η συγκέντρωση του Λεουπρολιδίου που προκαλεί το ήμισυ της αναστολής (IC₅₀) είναι 13 μM.

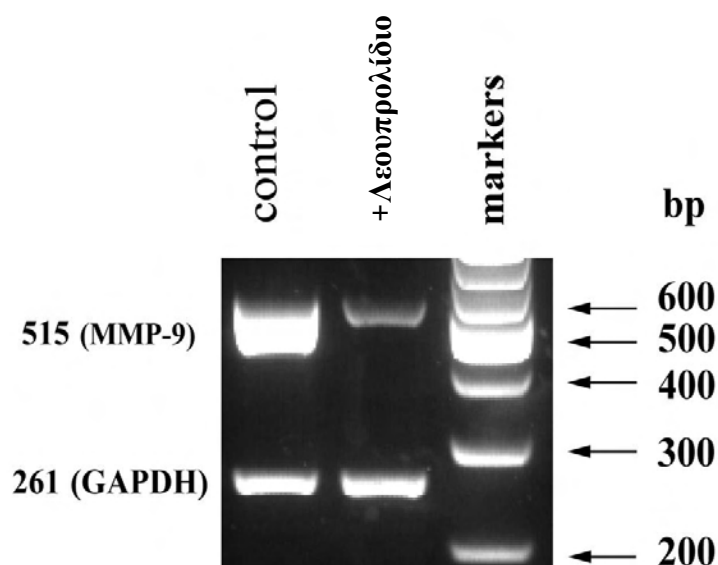


Σχήμα 17: Επίδραση του λεουπρολιδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε επίπεδο DNA στα MCF-7 κύτταρα (ενσωμάτωση της [^3H]- θυμιδίνης, 5000 κύτταρα/κελλίο καλλιέργειας). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις λεουπρολιδίου παρουσία ορού για 48 h.

2. Επίδραση λεουπρολιδίου στην έκφραση των MMPs από τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα

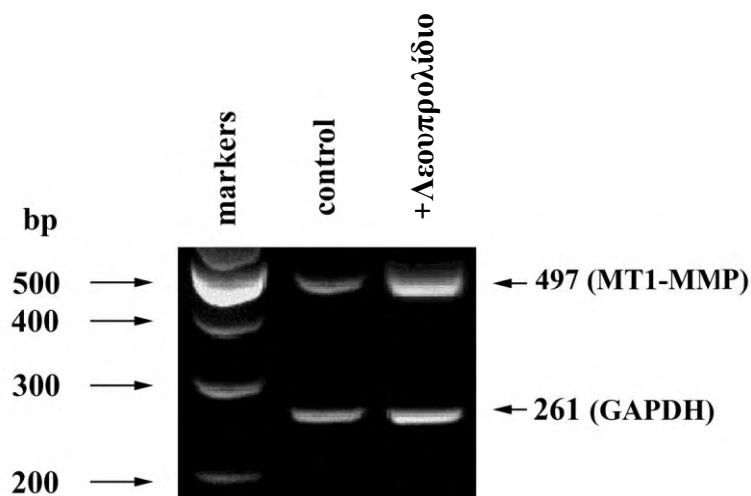
Η ανάλυση σε γονιδιακό επίπεδο για τον προσδιορισμό του mRNA αρκετών μεταλλοπρωτεϊνών έγινε με RT-PCR ανάλυση. Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που περιγράφονται στους Πίνακες I και II (βλ. πειραματικό μέρος) μελετήθηκαν τα γονίδια των MMP-1, -2, -3, -7, -9, -11 και των μεμβρανικών MT1- και MT2-MMPs. Δεν ανιχνεύτηκε το mRNA κανενός μέλους των κολλαγονασών (MMP-1, -8 και -13) και των στρωμαλυσινών (MMP-3, -7 και -11), ενώ από τις ζελατινάσες ανιχνεύθηκε το mRNA της MMP-9 (515 bp) σε μεγάλα ποσά (Σχήμα 18). Ημιοσοτική ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση της MMP-9 από τα MCF-7 κύτταρα (λόγος φθορισμού MMP-9/GAPDH: 1.95 ± 0.10) μειώνεται σημαντικά ($p < 0.001$) από την επώαση με το

λεουπρολίδιο σε συγκέντρωση 30 μ M για 48 h (λόγος φθορισμού MMP-9/GAPDH: 0.40 ± 0.03) (Σχήμα 21). Η σύνθεση δηλαδή του mRNA της MMP-9 από τα MCF-7 κύτταρα υποπενταπλασιάζεται μετά την επώαση παρουσία λεουπρολιδίου. Εφαρμογή ELISA στο μέσο καλλιέργειας έδειξε ότι η παρουσία του λεουπρολιδίου έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της MMP-9 σε επίπεδο πρωτεΐνης.



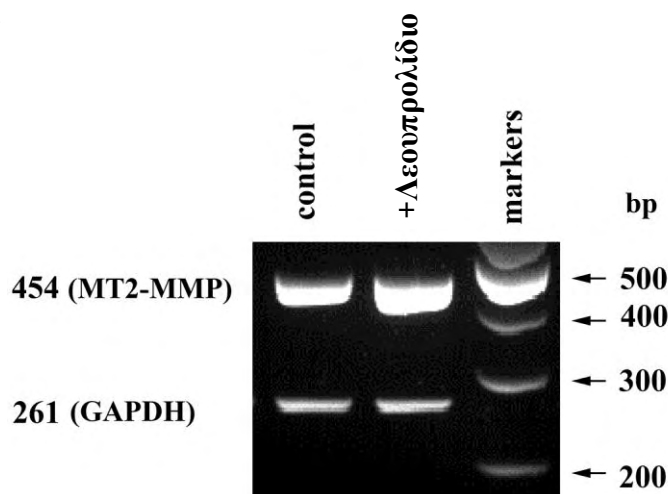
Σχήμα 18: RT-PCR ανάλυση για την ανίχνευση mRNA που κωδικοποιεί την MMP-9. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αгарόζης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE παρουσία βαφής και τα προϊόντα εμφανίστηκαν με έκθεση σε UV ακτινοβολία.

Από τις μεμβρανικές μεταλλοπρωτεΐνάσες μελετήθηκαν οι MMP-14, και -15 (MT1- και MT2-MMP, αντίστοιχα). Ανιχνεύθηκαν τα mRNA και των δύο μεμβρανικών MMPs στην καρκινική σειρά MCF-7. Ημιοσοτική ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση της MT1-MMP από τα MCF-7 κύτταρα (λόγος φθορισμού MT1-MMP /GAPDH: 0.55 ± 0.03) αυξάνει σημαντικά ($p < 0.001$) από την επώαση με το λεουπρολίδιο σε συγκέντρωση 30 μ M για 48 h (λόγος φθορισμού MT1-MMP /GAPDH: 1.01 ± 0.05) (Σχήμα 19).



Σχήμα 19: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της RT-PCR ανάλυσης για την ανίχνευση του mRNA που κωδικοποιεί την MT1-MMP. Οι συνθήκες είναι όμοιες με εκείνες του Σχήματος 18.

Ημιοσοτική ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση της MT2-MMP από τα MCF-7 κύτταρα (λόγος φθορισμού MT2-MMP /GAPDH: 3.01 ± 0.14) αυξάνει επίσης σημαντικά ($p < 0.001$) από την επώαση με το λευπρολίδιο σε συγκέντρωση $30 \mu\text{M}$ για 48 h (λόγος φθορισμού MT2-MMP /GAPDH: 5.33 ± 0.22) (Σχήμα 20). Η έκφραση δηλαδή της MT2-MMP αυξάνει κατά 78% μετά των επώαση παρουσία του λευπρολιδίου.



Σχήμα 20: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της RT-PCR για την ανίχνευση του mRNA που κωδικοποιεί την MT2-MMP. Οι συνθήκες είναι όμοιες με εκείνες του Σχήματος 19.

Η ποσοτικοποίηση των cDNAs των MMPs, έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), παρουσιάζεται στον Πίνακα III.

Πίνακας III: Επίπεδα mRNAs που κωδικοποιούν τις μεταλλοπρωτεΐνάσες για την κυτταρική σειρά MCF-7 απουσία και παρουσία του λεουπρολιδίου στη συγκέντρωση

MMP	Μέγεθος Προϊόντων (bp)	Σχετικός Φθορισμός	
		Control Mean $\pm$ S.D. (n=3)	Λεουπρολίδιο Mean $\pm$ S.D. (n=3)
MMP-1	183	N.D.	N.D.
MMP-2	828	N.D.	N.D.
MMP-3	156	N.D.	N.D.
MMP-7	324	N.D.	N.D.
MMP-9	515	1.95 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.03*
MMP-11	-	N.D.	N.D.
MT1-MMP	497	0.55 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.05*
MT2-MMP	454	3.01 $\pm$ 0.14	5.33 $\pm$ 0.22*

* Στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p<0.001). N.D: Δεν ανιχνεύτηκε.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα για την έκφραση των MMPs και την επίδραση του λεουπρολιδίου στην κυτταρική σειρά MCF-7.

1. Η MCF-7 κυτταρική σειρά παρουσία ορού εκφράζει μόνο τις MMP-9 και τις MT1-και MT2-MMPs. Τα πειράματα έγιναν παρουσία ορού και συμφωνούν με πρόσφατη δημοσίευση [Kousidou OC, Roussidis AE, Theocharis AD, Karamanos NK. Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. Anticancer Res. 2004;24(6):4025-30], η οποία δείχνει διαφοροποιημένη έκφραση των MMPs απο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, καθώς και από την ίδια παρουσία και απουσία ορού στο μέσο καλλιέργειας. Η μόνη διαφορά έγκειται στην MMP-2, η οποία δεν ανιχνεύθηκε στην παρούσα εργασία. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με την πληρότητα της φιάλης καλλιέργειας σε κύτταρα (confluency).

Έχει δειχθεί ότι η MMP-2, η οποία εκφράζεται σε αραιές καλλιέργειες, χάνεται προοδευτικά καθώς οι φιάλες καλλιέργειας προσεγγίζουν την πληρότητα [Menashi S,

Dehem M, Souliac I, Legrand Y, Fridman R. Density-dependent regulation of cell-surface association of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in breast-carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1998 Jan 19;75(2):259-65]. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη, μετά τη διήμερη επώαση οι φιάλες καλλιέργειας είχαν υψηλό βαθμό πληρότητας και αυτό μπορεί να εξηγήσει τη μη-ανίχνευση της MMP-2 σε επίπεδο mRNA.

2. Ο μικρός αριθμός μεταλλοπρωτεϊνών που παράγεται από τα MCF-7 κύτταρα είναι πιθανόν ότι σχετίζεται με τη μικρή αλλά υπαρκτή μεταστατική ικανότητα αυτών των κυττάρων. Η έκφραση των MMP-9 και των MT1-και MT2-MMPs, μπορεί να σχετίζεται είτε με τη μικρή δυνατότητα μετάστασης είτε με τις φυσιολογικές διαδικασίες. Αντίθετα, άλλες κυτταρικές σειρές με μεγάλη μεταστατική ικανότητα εκφράζουν πολύ μεγαλύτερο αριθμό MMPs [Kousidou et al. 2004].

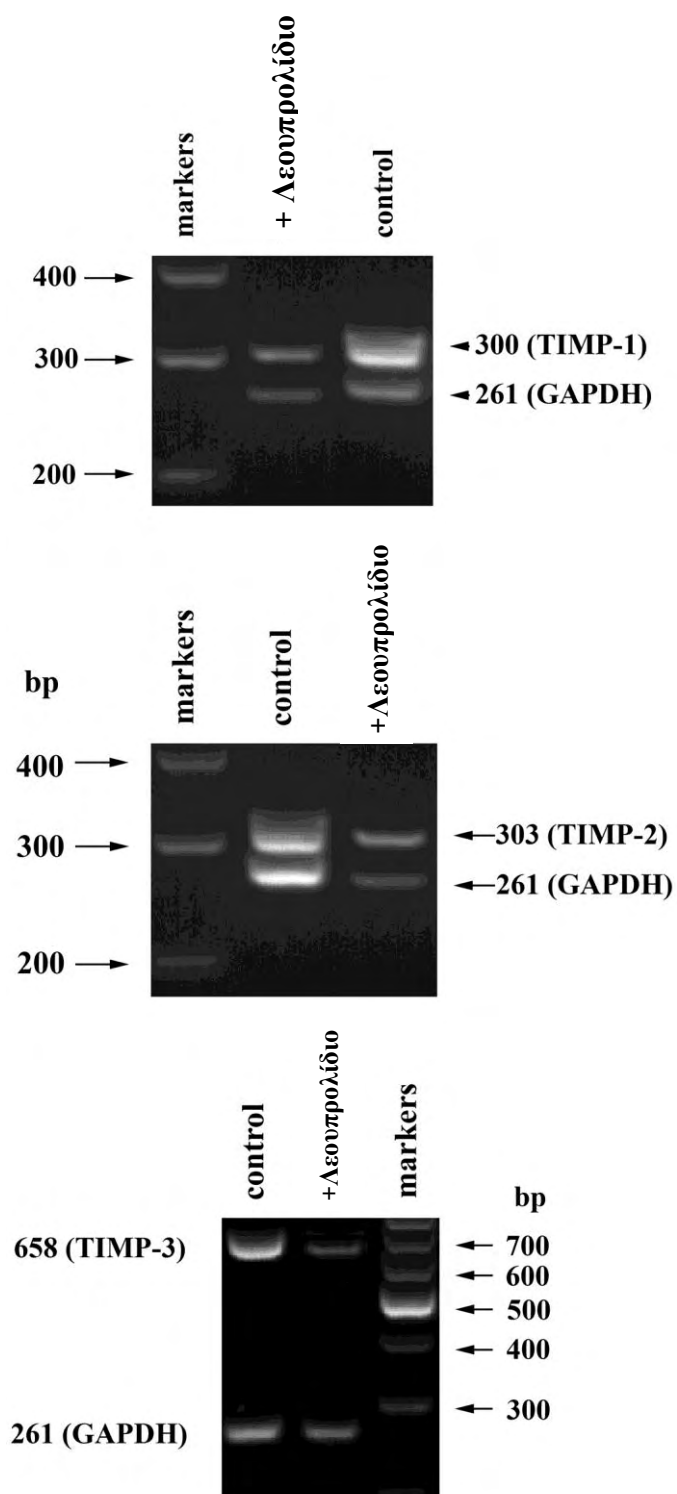
3. Η MMP-9 υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα [Kousidou et al. 2004]. Ο προσδιορισμός της MMP-9 στο πλάσμα έχει προταθεί ως αξιόπιστος δείκτης πρόγνωσης και παρακολούθησης της θεραπείας στον καρκίνο του μαστού [Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2003;106(5):745-51]. Η ζελατινάση MMP-9 αποικοδομεί κολλαγόνα πολλών τύπων, αλλά κυρίως κολλαγόνο τύπου IV που είναι το βασικό δομικό συστατικό του εξωκυττάριου χώρου. Η επώαση των κυττάρων με το λεουπρολίδιο επάγει τη σημαντική μείωση της έκφρασης της MMP-9. Αυτό είναι σημαντικό εύρημα και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να μελετηθεί η αξία του.

4. Οι μεμβρανικές MT1- και MT2-MMPs αποικοδομούν το κολλαγόνο τύπου I, καθώς και άλλα μακρομόρια του εξωκυττάριου χώρου. Η MT2-MMP υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού σε σχέση με τα φυσιολογικά [Kousidou et al. 2004], γεγονός που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη. Η επώαση των κυττάρων με το λεουπρολίδιο αυξάνει την έκφραση αυτών των δύο MT-MMPs. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την επίδραση της γενιστεΐνης στην έκφραση των δύο MT-MMPs από τα MCF-7 κύτταρα [Kousidou et al. 2005]. Συγκεκριμένα, η γενιστεΐνη η οποία είναι αναστολέας κινάσων τυροσίνης αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των MCF-7, μειώνει την έκφραση της MMP-2 και -

9, αλλά αυξάνει την έκφραση των MT1- και MT2-MMPs [Kousidou et al. 2005]. Η αύξηση των MT-MMPs στα MCF-7 κύτταρα που είχαν όμως επωαστεί με γενιστεΐνη δεν ήταν αρκετή για να προσδώσει στα κύτταρα διηθητική ικανότητα. Αυτό δηλώνει ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης αυτών των MMPs είναι διαφορετικοί από τους μηχανισμούς ρύθμισης των άλλων MMPs στα MCF-7 κύτταρα..

3. Επίδραση λευπρολιδίου στην έκφραση των ενδογενών αναστολέων των MMPs (TIMPs) από τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα

Οι μέχρι σήμερα γνωστοί ενδογενείς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών είναι τέσσερις: οι TIMP-1, -2, -3 και -4. Η έκφρασή τους μελετήθηκε στην κυτταρική σειρά MCF-7 απουσία και παρουσία του λευπρολιδίου στη συγκέντρωση των 30 μ M σε θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό. Μετά τις ηλεκτροφορήσεις, έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 21 και συνοψίζονται στον Πίνακα IV.



Σχήμα 21: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR ανάλυσης για την ανίχνευση των mRNAs που κωδικοποιούν τους TIMP-1, -2, και -3. Οι συνθήκες είναι όμοιες με εκείνες του Σχήματος 18.

Τα mRNAs των αναστολέων TIMPs -1, -2 και -3 ανιχνεύθηκαν στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η ημιποσοτική ανάλυση έδειξε ότι ο TIMP-1 (300 bp) εκφράζεται στην καρκινική σειρά MCF-7 (λόγος φθορισμού TIMP-1/GAPDH: 2.47 ± 0.13) ενώ το λεουπρολίδιο επάγει σημαντική μείωση του mRNA του TIMP-1 (λόγος φθορισμού TIMP-1/GAPDH: 1.67 ± 0.08). Επομένως, το mRNA του TIMP-1 μειώνεται κατά 32%. Η έκφραση του γονιδίου του TIMP-2 (303 bp) (λόγος φθορισμού TIMP-2/GAPDH: 0.73 ± 0.04) αυξάνει σημαντικά (70%) από την επώαση με το λεουπρολίδιο (λόγος φθορισμού TIMP-2/GAPDH: 1.25 ± 0.06) (Σχήμα 6). Αντίθετα, ημιποσοτική ανάλυση έδειξε ότι το mRNA του TIMP-3 (658 bp) (λόγος φθορισμού TIMP-3/GAPDH: 1.19 ± 0.06) μειώνεται κατά 75% από το λεουπρολίδιο (λόγος φθορισμού TIMP-3/GAPDH: 0.29 ± 0.02) (Σχήμα 24).

Η ποσοτικοποίηση των cDNAs των TIMPs, έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), παρουσιάζεται στον Πίνακα IV.

Πίνακας IV: Επίπεδα mRNAs που κωδικοποιούν τους TIMPs για την κυτταρική σειρά MCF-7 απουσία και παρουσία του λεουπρολιδίου στη συγκέντρωση των 30 μ M.

TIMP	Μέγεθος Προϊόντων (bp)	Σχετικός Φθορισμός	
		Control Mean $\pm$ S.D. (n=3)	Λεουπρολίδιο Mean $\pm$ S.D. (n=3)
TIMP-1	300	2.47 ± 0.13	$1.67 \pm 0.08^*$
TIMP-2	303	0.73 ± 0.04	$1.25 \pm 0.06^*$
TIMP-3	658	1.19 ± 0.06	$0.29 \pm 0.02^*$
TIMP-4	626	N.D.	N.D.

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.001$).

Υπάρχουν δυο εκδοχές για την έκφραση των ενδογενών αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών σε περιπτώσεις καρκίνου. Η πρώτη υποστηρίζει ότι στον καρκίνο, όπου τα επίπεδα των MMPs είναι αυξημένα, η έκφραση των TIMPs

μειώνεται, ενώ η δεύτερη υποστηρίζει ότι σε περιπτώσεις καρκίνου οι TIMPs που είναι υπεύθυνοι για την αναστολή κάποιων MMPs, αυξάνονται και αυτοί για να μπορέσουν να αντιμετωπίσουν την παράτυπη αυτή αύξηση. Οι TIMPs εκφράζονται σε αξιοσημείωτο βαθμό από την κυτταρική σειρά MCF-7 πιθανώς για να αντισταθμίσουν την αυξημένη έκφραση των MMPs [Kousidou et al. 2004] και αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη. Το λεουπρολίδιο επάγει μείωση των επιπέδων των TIMP-1 και TIMP-3 και αυξάνει την έκφραση του TIMP-2. Πιθανώς αυτή η διαφοροποίηση της έκφρασης των TIMPs παρουσία του λεουπρολιδίου είναι αποτέλεσμα προσπάθειας των κυττάρων να αντισταθμίσουν τις αλλαγές που επήλθαν από τις αλλαγές στην έκφραση των MMPs. Συγκεκριμένο παράδειγμα αποτελεί η έκφραση της MMP-9, η οποία όπως γνωρίζουμε αναστέλλεται από τον TIMP-1. Παρουσία του λεουπρολιδίου μειώνεται η έκφραση και των δύο μορίων σε δυσανάλογο βέβαια βαθμό. Η έκφραση της MMP-9 υποπενταπλασιάζεται, ενώ του TIMP-1 ελαττώνεται μόνο κατά 30%. Η διαφοροποιημένη έκφραση των TIMPs στον καρκίνο του μαστού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα το οποίο χρήζει εν γένει περαιτέρω ερευνητικής μελέτης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΠΤΙΚΕΣ

Η έκφραση των MMP και TIMP γονιδίων και η ενεργοποίηση των MMPs έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και η υπερέκφραση αυτών σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση για τον ασθενή (Bjorklund et al 2005, Wurtz et al 2005). Σε αυτή την εργασία δείχτηκε με RT-PCR ανάλυση ότι τα MCF-7 κύτταρα εκφράζουν MMP-9, MT1- και MT2-MMP, αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν προηγούμενες εργασίες (Kousidou et al 2004, Kousidou et al 2005) και που μπορεί να σχετίζονται με τη χαμηλή δυνατότητα μετάστασης της καρκινικής αυτής σειράς. Εντούτοις MMP2-mRNA δεν ανιχνεύτηκε, παρά το γεγονός ότι η MMP2 συχνά εμφανίζεται σε κακοήθεις ιστούς στο μαστό.

Η επώαση των κυττάρων με λεουπρολίδιο για 48h οδήγησε σε χαμηλότερα επίπεδα της MMP-9 mRNA. Έχει δεοχτεί ότι, σε αντίθεση με την MMP-2, η έκφραση της MMP-9 εξαρτάται από την παρουσία αυξητικών παραγόντων, χημοκινών και άλλων μορίων σηματοδότησης (Bjorklund et al, 2005). Σε αυτό το πλαίσιο η υπερέκφραση της MMP-9 δεν διατηρείται όταν τα καρκινικά κύτταρα επωάζονται σε περιβάλλον ελεύθερο τέτοιων παραγόντων, υποθέτοντας ότι η παρουσία στον ορό μερικών αυξητικών παραγόντων παρακινούν την έκφραση βασικών MMPs σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.

Από τις μεμβρανικές μεταλλοπρωτεΐνες οι MT1- (MMP-14) και MT2 (MMP-15) εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά και αυξάνονται παρουσία του αγωνιστή LHRH, λεουπρολιδίου. Επιπλέον η MT1-MMP και η TIMP-2 συμμετέχουν στην κύρια οδό ενεργοποίησης του MMP-2 στην επιφάνεια των κυττάρων με τη δημιουργία ενός τριμοριακού συμπλέγματος MMP-2, MT1-MMP και TIMP-2 (Deryugina et al 2001, Lafleur et al 2003). Σε αυτήν την εργασία τα επίπεδα TIMP-2 mRNA επίσης αυξήθηκαν. Έτσι θα μπορούσε να ειπωθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα MT1-MMP και TIMP-2 mRNA εκφράζουν την διάθεση των κυττάρων να ενεργοποιήσουν την proMMP-2.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα γονίδια TIMP-1 και TIMP-3 μειώνονται παρουσία του αγωνιστή LHRH, λεουπρολιδίου. Η αύξηση των TIMPs από τα καρκινικά κύτταρα για να εξισοροπήσουν την υψηλή προτεολυτική δράση των MMPs αποτελεί μία πιθανή θεώρηση (Brown et al, 1998). Αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί

ως ένας αμυντικός μηχανισμός του ανθρώπινου οργανισμού για να αντιμετωπήσει την ανώμαλη αύξηση των MMPs. Έτσι τα χαμηλότερα επίπεδα του TIMP-1 mRNA μπορεί να σχετίζονται με τα χαμηλότερα επίπεδα MMP-9, παρουσία του λεουπρολιδίου, αφού ο TIMP-1 αναστέλλει την MMP-9 με μεγάλη εξειδίκευση. Εντούτοις ιστοί με μεγάλη περιεκτικότητα σε TIMP-1 mRNA και πρωτείνες σχετίζονται με κακή πρόγνωση ασθενών με καρκίνο του μαστού, παρα την ανασταλτική δράση των MMPs. Η πρόσφατη ανακάλυψη της αντι αποπτοτικής και προ αγγειογενετικής δράσης του TIMP-1 μπορεί να είναι μέρος αυτής της υπόθεσης (Wurtz et al, 2005). Έχοντας αυτό υπόψη τα παρατηρούμενα χαμηλά επίπεδα TIMP-1 mRNA μπορεί να είναι αποτέλεσμα και άλλων δράσεων με ωφέλιμο ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Γενικά η διαφορετική έκφραση των TIMPs στον καρκίνο του μαστού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό θέμα, που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματά μας δεικνύουν ότι ο αγωνιστής LHRH, λεουπρολίδιο, μπορεί να τροποποιήσει σημαντικά την έκφραση των γονιδίων MMP/TIMP στα κύτταρα MCF-7. Οι MMPs και TIMPs είναι πολυδύναμα μόρια με σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του καρκίνου, της μετάστασης και της αγγειογένεσης.

Δεδομένου ότι τα ανάλογα LHRH αποτελούν μέρος της θεραπείας ασθενών με προ ή μετά εμμηνοπαυσιακό καρκίνο του μαστού, η επίδραση των παραπάνω αναφερθέντων μεταβολών από τη χρήση του λεουπρολιδίου, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

1. Ξένη Βιβλιογραφία

- ♦ Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24:227
- ♦ Adams MD (1999). Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*, 377:3
- ♦ Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P. J., Kellis, J. T., Jr. & Vickery, L. E. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavoid phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **44**: 147-153
- ♦ Akiyama, T., Ishida, J., Nagawaka, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. & Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* (262):**12**: 5592-5595
- ♦ Atkinson, S. J., Crabbe, T., Cowell, S., Ward, R. V., Butler, M. J., Sato, H., et al. (1995). *J. Biol. Chem.* (270): 5331-5338
- ♦ Balduyck, M., Zerimech, F., Gouyer, V., et al., (2000). Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*. **18**: 171-178
- ♦ Barnes, S. (1995). Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *J Nutr.* (125) 777S-783S
- ♦ Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, Holland, Frei. Neoplasms of the breast. *Cancer Medicine*. (118) **32**: 3-4
- ♦ Benaud, C., Dickson, R. B., Thompson, E. W. (1998). Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. (50) 97-116
- ♦ Berardo, M. D., Allred, D. C., O'Connell, P. (1998). Breast Cancer. *Principles of Molecular Medicine*. **63**: 625
- ♦ Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., De Carlo, A., Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: A review. *Crit. rev. Oral. Biol. Med.* **4**: 197-250

- ♦ Braunhut, S. J., Moses, M. A. (1994). Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). *J. Biol. Chem.* (269) 13472-13479
- ♦ Brummer, O., Athar, S., Riethdorf, A.R., Loning, T. & Herbst, H. (1999). Matrix metalloproteinase -1, -2, -3, their tissue inhibitors -1, -2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch.* (435) 566-573
- ♦ Carlsson, S. R. Glycobiology: A practical approach.
- ♦ Chambers, A. F. and Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis. *J Natl Cancer Inst.* **89**: 1260-1270
- ♦ Coussens, L. M. and Werb, Z. (1996). *Chem. Biol.* **3**: 895-904
- ♦ Cox, R. A. (1968). *Meth. Enzymol.* **12B**: 120
- ♦ Cunningham MP. Giving life to numbers (1997). *CA* 47:3-4
- ♦ Dobra, K., Andang, M., Syrokou, A., Karamanos, N. K., Hjerpe, A. (2000). Differentiation of mesothelioma cells is influenced by the expression of proteoglycans. *Exp. Cell Res.* **258**: 12-22
- ♦ Dollinger, M. D., Ernest Rosenbaum, M. D., Cable, G. (1992). **1**: 33-40, **37**: 296-299, 304-312, 319
- ♦ Donegan and Spratt. (1995). Cancer of the breast. *W. B. Saunders Company*. 4th edition. 1, 22-42, 168-189
- ♦ Donegan, W. L., and Perez-Mesa, C. M. (1972). Lobular carcinoma: An indicator for elective biopsy of the second breast. *Ann. Surg.* **177**: 178-187
- ♦ Duffy, M. J. (1992). Role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* **10**: 145-155
- ♦ Duffy, M. J., McCarthy, K (1998). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy. *Int J Oncol.* **12**: 1343-1348
- ♦ Kulkarni SB, Betageri GV, Singh M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J. Microencaps*, 1995; 12: 229-246
- ♦ Saroglou V, Hatziantoniou S, Smyrniotakis M, Kyrikou I, Mavromoustakos T, Zompra A, Magafa V, Cordopatis P. Demetzos C (2006). Synthesis, liposomal

formulation and thermal effects on phospholipid bilayers of leuprolide. *J. Peptide Sci.* 2006; 12 43-50

♦ Farina, A. R., Coppa, A., Tiberio, A., Turco, A., Colletta, G., Gulino, A. & Mackay, A.R.. (2002). Transforming growth factor beta-1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int. J. Cancer.* **75**: 721-730

♦ Fernald RD, White RB (1999). Gonadotropin - releasing hormone genes:phylogeny, structure and functions. *Front. Neuroendocrinology* 20:224-240

♦ Fernanedz Resa, P., Mira, E., and Quesada, A. R. (1995). *Anal. Biochem.* **224**: 434-435

♦ Fisher, E. R., Gregorio, R. M., Fisher, B., *et al.*, (1975). The pathology of invasive breast cancer: A syllabus derived from findings of the national Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). *Cancer.* **36**: 1

♦ Fisher, E. R., Palekar, A. S., Redmond, E., *et al.*, (1980). Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project protocol (No. 4) VI Invasive Papillary Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **73**: 313

♦ Folman, Y. & Pope, G. S. (1966). The interaction of the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. *J. Endocrinol.* **34**: 215-225

♦ Fuqua, S. A. W. (2001). The role of estrogen receptors in breast cancer metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* (6) **4**: 407-417

♦ Gallager, H. St., Leis, H. P. Jr, Snyderman, R. K., Urban, J. A. (1978). The Breast. *The C.V. Mosby Company.* 4-21, 49, 69

♦ Giambernardi, T. A., Grant, G. M., Taylor, G. P., *et al.*, (1998). Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol.* **16**: 483-96

♦ Gilles, C., Polette, M., Birembaut, P., *et al.*, (1997). Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, ETM-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis.* **15**: 519-26

♦ Gohlke, U., Gomis-Ruth, F. X., Crabbe, T., Murphy, G., Docherty, A. J. P., Bode, W. (1996). *FEBS Lett.* **378**: 126-130

- ♦ Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P., (1997). *Eur. J. Cell Biol.* **74**:111-122
- ♦ Gomis-Ruth, F. X., Gohlke, U., Betz, M., Knauper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C., Bode, W. (1996). *J. Mol. Biol.* **264**: 556-566
- ♦ Goss, P. E., and Yow. O. An overview of aromatase inhibitors in the treatment of metastatic breast cancer. *Cur. Oncol.* (8) **2**: 1
- ♦ Grigon, D. J., Sakr, W., Toth, M., Ravery, V., Angulo, J., Shamsa, F, *et al.*, (1996). High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (MMP-2) expression is associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* **56** : 1654-1659
- ♦ Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N., Siple, J., *et al.*, (1999). Activation of pro-MMP-9 by plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci.* **878**: 973-87
- ♦ Hernandez-Barrantes, S., Bernardo, M., Toth, M. & Fridman, R. (2002). Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Cancer Biology.* **12** : 131-138
- ♦ Hernandez-Barrantes, S., Bernardo, M., Toth, M. and Fridman, R. (2002). Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Cancer Biology.* **12**: 131-138
- ♦ Hoekstra, R., Eskens, F. A. L. M., Verweij, J., (2001). Matrix metalloproteinase Inhibitors: Current developments and Future Perspectives. *The Oncologist.* **6**: 415-427
- ♦ Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z., Helferich, W. G. (1998). Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **58**: 3833-3838
- ♦ Kao, Y. C., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C. A. & Chen, S. (1998). Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. *Environ. Health Perspect.* **106**: 85-92
- ♦ Karamanos, N. K., Tzanakakis, G. N., Hjerpe, A. (1995). Effects on glycosaminoglycan synthesis in cultured human malignant mesothelioma cells of

transforming, epidermal, and fibroblast growth factors and their combinations with platelet-derived growth factor. *Exp Cell Res.* (220) **1**: 130-137

♦ Karamanos, N. K., Tzanakakis, G. N., Syrokou, A., Hjerpe, A. (1996). Effect of insulin and epidermal growth factors on the synthesis of glycosaminoglycans/proteoglycans in cultured human malignant mesothelioma cells of different phenotypic morphology. *APMIS.* (104) **10**: 718-728

♦ Kim, H., Peterson, T. G. & Barnes, S. (1998). Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. *Am J Clin Nutr.* **68**: 1418S-25S

♦ Kirby, K. S. (1968). *Meth. Enzymol.* **12B**: 87

♦ Kleiner, D. E., Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix Metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* **43**(Suppl): S42-S51

♦ Kolkhorst, V., Sturzebecher, J., Wiederanders, B. (1998). Inhibition of tumor cell invasion by protease inhibitors: Correlation with the protease profile. *J Cancer Res Clin Oncol.* **124**: 598-606

♦ Kreis, T. and Ronald, V. (1999). Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins. Oxford University Press. 2nd Edition. 524-526, 531-532

♦ Lamartiniere, C A., Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Wang, J., Mentor-Marcel, R. & Elgavish, A. (2002). Genistein chemoprevention: Timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. Fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. American Society for Nutritional Sciences.

♦ Leber Th. M., and Balkwill Fr. R. (1997). Zymography: A single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. *Analytical Biochemistry.* **249**: 24-28

♦ Libson, A. M., Gittis, A. G., Collier, I. E., Marmer, B. L., Goldberg, G. I., Lattman, E. E. (1995). *Nature Struct. Biol.* **2**: 938-942

♦ Limonta P., Montagnani Marelli M., Moretti R.M.(2001). *Exp. Opin. Invest. Drugs* **10** (4): 709-720

- ♦ Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. **284**: 67-68
- ♦ Logan S. K., Garabedian M J., Campbell C. E., Werb Z. (1996). Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases- 1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* **271**: 774-782
- ♦ Mackay, A. R., Ballin, M., Pelina, M. D., *et al.*, (1992). Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion and Metastasis*. **12**: 168-84
- ♦ Makatsori, E. and Karamanos, N. K. (1998). Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Applications. Scientific Sessions. Pharmakeftiki (11) **4**: 141-145
- ♦ Matrisian, L. M., Hogan, B. L. (1990). Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **24**: 219-259
- ♦ Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishino, H., Aoike, A. (1993). Genistein arrests cell cycle progression in G₂-M. *Cancer Res.* **53**: 1328-1331
- ♦ McCarthy, K., Maguire, T., McGreal, G., McDermott, E., O' Higgins, N. & Duffy, M. J. (1999). High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*. **84**: 44-48
- ♦ Messina, M. J. & Loprinzi, Ch. L. (2001). Soy for breast cancer survivors : A critical review of the literature. American Institute for Cancer Research 11th Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer. American Society for Nutritional Sciences
- ♦ Mignatti, P., Rifkin, D. (1993). *Physiological Rev.* (73) **1**: 161-195
- ♦ Miodini, P., Fioravanti, L., Cappelletti, V. (1999). The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *British Journal of Cancer*. (80) **8**: 1150-1155

- ♦ Mitropoulou, T. N., Tzanakakis, G. N., Kletsas, D., Kalofonos, H. P., Karamanos, N. K. (2003). Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int. J. Cancer*. **104**: 155-160
- ♦ Mitropoulou, T. N., Tzanakakis, G. N., Nikitovic, D., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K. (2002). *In vitro* effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans / proteoglycans by estrogen receptor-positive and –negative human breast cancer epithelial cells. *Anticancer Research*. **22**: 2841-2846
- ♦ Molineaux CJ, Lasdun A, Michaud C, Orłowski M (1988). Endopeptidase 24.15 is the primary enzyme that degrades LHRH both in vitro and in vivo. *J. Neurochem*. **51**: 624-633
- ♦ Morodomi, T., Ogata, Y., Sasaguri, Y., Morimatsu, M., Nagase, H. (1992). *J. Biol. Chem*. **285**: 604-611
- ♦ Murphy, G., and Crabbe, T., (1995). *Meth. Enzymol*. **248**: 470-484
- ♦ Murphy, G., and Willenbrock, F., (1995). *Meth. Enzymol*. **248**: 496-510
- ♦ Nagase, H., Woessner, F. J. Jr., (1999). Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*. (274) **31**: 21491-21494
- ♦ Nakopoulou, L., Giannopoulou, J., Gakiopoulou, H., Liapis, H., Tzonou, A. & Davaris, P. S. (1999). Matrix metalloproteinase-1 and –3 in breast cancer : correlation with progesterone receptors and other clinico-pathologic features. *Hum. Pathol*. **30**: 436-442
- ♦ Nutt, J. E., Lunec, J. (1996). Induction of metalloproteinase (MMP-1) expression by epidermal growth factor (EGF) receptor stimulation and serum deprivation in human breast tumor cells. *Eur J Cancer*. **32A**: 2127-35
- ♦ Ogata, Y., Itoh, Y., Nagase, H. (1995). Steps involved in activation of pro-matrix metalloproteinase 9 (prozelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-amino-phenylmercuric acetate and proteinases. *J. Biol. Chem*. **270**: 18506-18511

- ♦ Pagliassi, M. C., Smacchia, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C., Nicoletti, I. (1994). Growth inhibitory effects of the natural phyto-estrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer*. **30**: 1675-1682
- ♦ Pendas, A. M., Uria, J. A., Jimenez, M. G., Balbin, M., Freije, J. P. & Lopez-Otin, C. (2000). An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clinica Chimica Acta*. **291**: 137-155
- ♦ Peterson, G. (1995). Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr*. **125** (Suppl 3): 698S-708S
- ♦ Poletti A, Melgangi RC, Negri.Cesi P, Maggi R, Martini L. (1994). Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone- producing neuronal cell line GT1-1. *Endocrinology* 135: 2623-2638.
- ♦ Quinn, A. L., Burak, Jr. W. E., Brueggemeier, R. W. (1999). Effects of matrix components on aromatase activity in breast stromal cells in culture. *J steroid Biochem Mol Biol*. **70**: 249-256
- ♦ Roussidis, A. E., Karamanos, N. K. (2002). Inhibition of receptor tyrosine kinase-based signal transduction as specific target for cancer treatment. *in vivo*. **16**: 459-470
- ♦ Salo, T., Liotta, L. A., Keski-Oja, J., Turpeenniemi-Huhtanen, T., Tryggvason, K. (1982). Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells-role in metastasis. *Int. J. Cancer*. **30**: 669-673
- ♦ Santen, R. J. Aromatase inhibitors versus inactivators: what are the differences? *Breast cancer anti-aromatase therapies*.
- ♦ Sasano, H., Harado, N. (1998). *Endocr Rev*. **19**: 593-607
- ♦ Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP (1997). Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr. Rev*. 18:180-205
- ♦ Shao, Z. M., Wu, J., Shen, Z. Z., *et al.*, (1998). Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cell lines. *Cancer Res*. **58**: 4851-7

- ◆ Smutzer, Gr., (2002). Matrix metalloproteinases and their inhibitors play key roles in tissue remodeling and pathogenesis of metastatic and inflammatory diseases, Molecular Demolition. *The Scientist*. 34-36
- ◆ Syrokou, A., Tzanakakis, G. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K. (1999). Proteoglycan in human malignant mesothelioma. Stimulation of their synthesis induced by epidermal, insulin and platelet-derived growth factors involves receptors with tyrosine kinase activity. *Biochimie*. **81**: 733-744
- ◆ Takada, J., et al., (1994). *Biochem Biophys Res Commun*. **205**: 1345-1352
- ◆ Thompson, E. W., Reich, R., Martin, G. R., and Albini, A. (1998). Factors regulation basement membrane invasion by tumor cells. *Breast Cancer: Cellular and Molecular Biology*. **11**: 239-242
- ◆ Toi, M., Ishigaki, S. & Tominaga, T. (1998). Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Research and Treatment*. **52**: 113-124
- ◆ Tzanakakis, G. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K. (1997). Proteoglycan synthesis induced by transforming and basic fibroblast growth factors in human malignant mesothelioma is mediated through specific receptors and the tyrosine kinase intracellular pathway. *Biochimie*. **79**: 323-332
- ◆ Tzanakakis, G. N., Karamanos, N. K., Klominek, J., Hjerpe, A. (1995). Glycosaminoglycans from two human malignant mesothelic cell lines: determination, distribution, and effect of platelet-derived growth factor synthesis. *Biochem Cell Biol*. **73**: 59-66
- ◆ Van Bogaert, L. J., and Maldague, P. (1978). Histological classification of pure primary epithelial breast cancer. *Hum. Pathol*. **9**: 175
- ◆ Visscher, D. W., Hoyhtya, M., Ottosen, S. K., Liang, C. M., Sarcar, F. H., Crissman, J. D. & Fridman, R. (1994). Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumour recurrence. *Int. J. Cancer Res*. **58**: 1-6
- ◆ Wang, T. T., Sathyamoorthy, N., Phang, J. M. (1996). Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*. **17**: 271-275
- ◆ Woessner, J. F., Jr. (1995). *Methods Enzymol*. **248**: 510-528

- ◆ Bjorklund M and Koivunen E (2005). Gelatinase – mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1755: 37-69, 2005
- ◆ Wurtz SO, Schroll AS, Sorensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H and Brunner N (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12(2): 215-227.
- ◆ Kousidou OC, Roussidis AE, Theocharis AD and Karamanos NK (2004). Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res* 24(6): 4025-4030.
- ◆ Kousidou OC, Mitropoulou TN, Roussidis AE, Kletsas D, Theocharis AD and karamanos NK (2005). Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol* 26: 1101-1109.
- ◆ Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW and Strongin AY (2001). MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 263: 209-223, 2001
- ◆ Lafleur MA, Tester AM and Thompson EW (2003). Selective involvement of TIMP-2 in th second activational cleavage of pro-MMP-2: refinement of the pro-MMP-2 activation mechanism. *FEBS Lett* 553(3): 457-463.
- ◆ Brown PD (1998). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 52: 125-136.

2. Ελληνική Βιβλιογραφία

- ♦ Παυλάκη, Μ. Χ. (1999). Μελέτη των μεταλλοπρωτεϊνών του καρκινοσαρκώματος Walker 256 και της ενεργοποίησης αυτών. *Διδακτορική Διατριβή*.
- ♦ Μαρκουλάτος, Π. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, Nested-PCR, RT-PCR. Εργαστήριο Ιολογίας. Ελληνικό ινστιτούτο Pasteur
- ♦ Μαρμάρας Β., Λαμπροπούλου Μ. (2000). *Βιολογία Κυττάρου*. Μοριακή προσέγγιση. 4^η έκδοση. 329-330
- ♦ Συρόκου, Α. (1998). Μελέτη γλυκοζαμινογλυκανών και πρωτεογλυκανών σε κακοήθες μεσοθηλίωμα. *Διδακτορική Διατριβή*.
- ♦ Τσίγγανος Κ. Π. και Παπαγεωργακοπούλου Ν. (1997). Ασκήσεις Ενζυμολογίας. Πανεπιστήμιο Πατρών

Abstract

Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) is not only produced by hypothalamus but also by other normal and cancer tissues. LHRH peptide agonists and antagonists inhibit the proliferation of breast cancer cells, but their effect on the expression of metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) has not been studied despite the fact that growth and invasiveness of breast cancer cells in adjacent and distant sites is associated with the expression of MMPs.

In the present study, the effects of [D-Leu⁶,Pro⁹-NH₂]LHRH, leuprolide, on gene expression of MMPs and TIMPs in the breast cancer cell line MCF-7 were examined with semi-quantitative RT-PCR. Results showed that incubation of MCF-7 with 30μM of the leuprolide for 48h in serum-containing medium resulted in a down-regulation of MMP-9 expression and increase in MT1- and MT-2 MMP mRNA levels. Furthermore, leuprolide induced a significant decrease in TIMP-1 and TIMP-3 mRNA levels and increase in TIMP-2 mRNA levels.

The impact of the observed changes on the expression of MMPs and TIMPs warrants further investigation on the effects of LHRH analogues on the invasiveness and metastatic potential of breast cancer cells.