

Ο ρόλος της πρωτεϊνικής κινάσης C και των ιντεγκρινών στον καρκίνο του μαστού

Κουλούκουσα Μ., Χαβάκη Σ., Κίππας Χρ., Μαρίνος Ε.

The role of protein kinase C and integrins in breast cancer

Kouloukoussa M., Havaki S., Kittas Chr, Marinos E.

Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens.

Interactions between tumor cells and proteins of extracellular matrix strongly influence tumor development, affecting cell proliferation and survival, as well as the ability to migrate beyond the original location into other tissues to form metastases. Many of these interactions are mediated by integrins, a ubiquitously expressed family of adhesion receptors. By regulating the adhesive capacity of tumor cells, integrins control the formation of metastatic tumors. Migration, growth and development, susceptibility to an internal cell death program, and the formation of new blood vessels to provide nutrients for the growing tumor are all influenced by integrins. Gene expression of integrins is controlled by a cytoplasmic family of proteins known as protein kinase C. The latter consists of a family of 12 different PKC isoforms which play essential role in many signal transduction pathways controlling cell growth, transformation and differentiation. Additionally, PKC is involved in cancer pathogenesis because elevated levels of PKC activity were found in human breast tumors in comparison with normal breast tissue. In this review updated literature is provided concerning the role of integrins and their control by protein kinase C in breast cancer. More specifically, the various signaling pathways which correlate integrins with protein kinase C are described and the possible new therapeutic strategies aiming protein kinase C are underlined.

Keywords: *Protein kinase C, integrins, breast cancer*

Η αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων και των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας δεμέλιας ουσίας επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των όγκων, επιδρώντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική επιβίωση, καθώς και στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν από τον πρωτοπαθή όγκο σε άλλους ιστούς και να σχηματίζουν μεταστάσεις. Πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις

διαμεσολαβούνται από τις ιντεγκρίνες, που αποτελούν μια ευρέως εκφραζόμενη υπεροικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας. Οι ιντεγκρίνες διαμέσου της ρύθμισης της προσκολλητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων ελέγχουν το σχηματισμό των μεταστατικών νεοπλασμάτων. Η μετανάστευση, αύξηση, ανάπτυξη, ευαισθησία ως προς την απόπτωση και ο σχηματισμός νέων αγγείων για την παροχή θρεπτικών ουσιών στον όγκο, αποτελούν διεργασίες που επηρεάζονται άμεσα από τις ιντεγκρίνες. Η γονιδιακή έκφραση των ιντεγκρινών ελέγχεται από μια κυτταροπλασματική οικογένεια πρωτεϊνών γνωστών με τη συλλογική ονομασία "πρωτεϊνική κινάση C". Η πρωτεϊνική κινάση C αποτελείται από μια οικογένεια 12 ισομορφών που παίζουν ουσιαστικό ρόλο σε αρκετές οδούς επαγωγής των σημάτων που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση, το μετασχηματισμό και τη διαφοροποίηση. Επιπρόσθετα, η PKC εμπλέκεται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού γιατί η συνολική της δραστηριότητα αυξάνει σε μια σειρά ανδρώπινων καρκίνων του μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό μαζικού αδένου. Στην παρούσα ανασκόπηση αναφέρονται σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο των ιντεγκρινών και τη ρύθμισή τους από την πρωτεϊνική κινάση C στον καρκίνο του μαστού. Ειδικότερα, περιγράφονται οι διάφορες σηματοδοτικές οδοί που συσχετίζουν τις ιντεγκρίνες με την πρωτεϊνική κινάση C και αναφέρονται οι θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν ως στόχο την πρωτεϊνική κινάση C.

Λέξεις-κλειδιά: Πρωτεϊνική κινάση C, ιντεγκρίνες, καρκίνος του μαστού.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε παγκόσμια κλίμακα ο καρκίνος του μαστού είναι τρίτος σε συχνότητα και το ποσοστό θανάτων από αυτή την αιτία ανέρχεται σε ποσοστό 60% επί του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου. Στις γυναίκες, ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη μορφή κακοήθειας και η συχνότερη αιτία θανάτου¹. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) και στον Καναδά, 1 στις 8 γυναίκες περίπου θα εκδηλώσουν καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους, ενώ στην Ευρώπη η αναλογία αυτή διαμορφώνεται σε 1 στις 11 γυναίκες. Ειδικότερα, στις ΗΠΑ στις 100,000 γυναίκες ανά χρόνο, 111 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού διαγιγνώσκονται και 24 ασθενείς τελικά πεθαίνουν². Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στην Ευρώπη είναι 6 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις χώρες της Ασίας και της Αφρικής, κάτι που πιθανώς σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παρά με γενετικούς παράγοντες^{3,4}. Στην Ελλάδα, όπως και στις άλλες μεσογειακές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία), παρατηρείται μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου

του μαστού σε αντίθεση με την Ολλανδία και τη Γερμανία, όπου παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης⁵. Ωστόσο, ο καρκίνος του μαστού προσβάλλει περίπου 4.500 Ελληνίδες το χρόνο και ευδύνεται για τους περισσότερους θανάτους μετά τον καρκίνο του πνεύμονα.

Τα τελευταία 40 χρόνια, έχει παρατηρηθεί διεθνώς αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου του μαστού με κορύφωση στο τέλος της δεκαετίας του '80. Από τότε όμως, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σταθεροποιήθηκε. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μείωση της θνησιμότητας τα τελευταία χρόνια και το ποσοστό της ετήσιας μείωσης είναι περίπου 3,4%^{2,6}. Αυτή η μείωση της θνησιμότητας είναι πιθανόν να οφείλεται: α) στην ευρεία και συστηματική χρήση της μαστογραφίας, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται συχνά όγκοι σε αρχικό σχετικά στάδιο, β) στη χρήση της χημειοθεραπείας με συνδυασμό διαφόρων φαρμάκων, ως συμπληρωματική μέθοδο θεραπείας μετά τη χειρουργική επέμβαση, καθώς και γ) στη χρήση συμπληρωματικής ορμονολογικής θεραπείας στις περιπτώσεις των καρκίνων που εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης^{7,8}.

ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ

Η δημιουργία όγκων οφείλεται στη συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων σε ρυθμιστικά γονίδια που ανήκουν στο σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα εξαλλαγμένα νεοπλασματικά κύτταρα να αποκτούν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται χωρίς τους φυσιολογικούς περιορισμούς και να διαιρούνται ταχύτερα από τα περιβάλλοντα φυσιολογικά κύτταρα. Η αποκόλληση των νεοπλασματικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο και η μετανάστευσή τους σε απομακρυσμένες θέσεις του οργανισμού, όπου στη συνέχεια δημιουργούν τους δευτερογενείς όγκους, αναφέρεται ως μετάσταση. Τα νεοπλασματικά κύτταρα μεταναστεύουν διαμέσου των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΟ) που περιβάλλει τα κύτταρα ενός πρωτοπαθούς όγκου και εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία ή στα λεμφικά αγγεία, μέσω των οποίων μεταφέρονται στα περιφερικά όργανα.

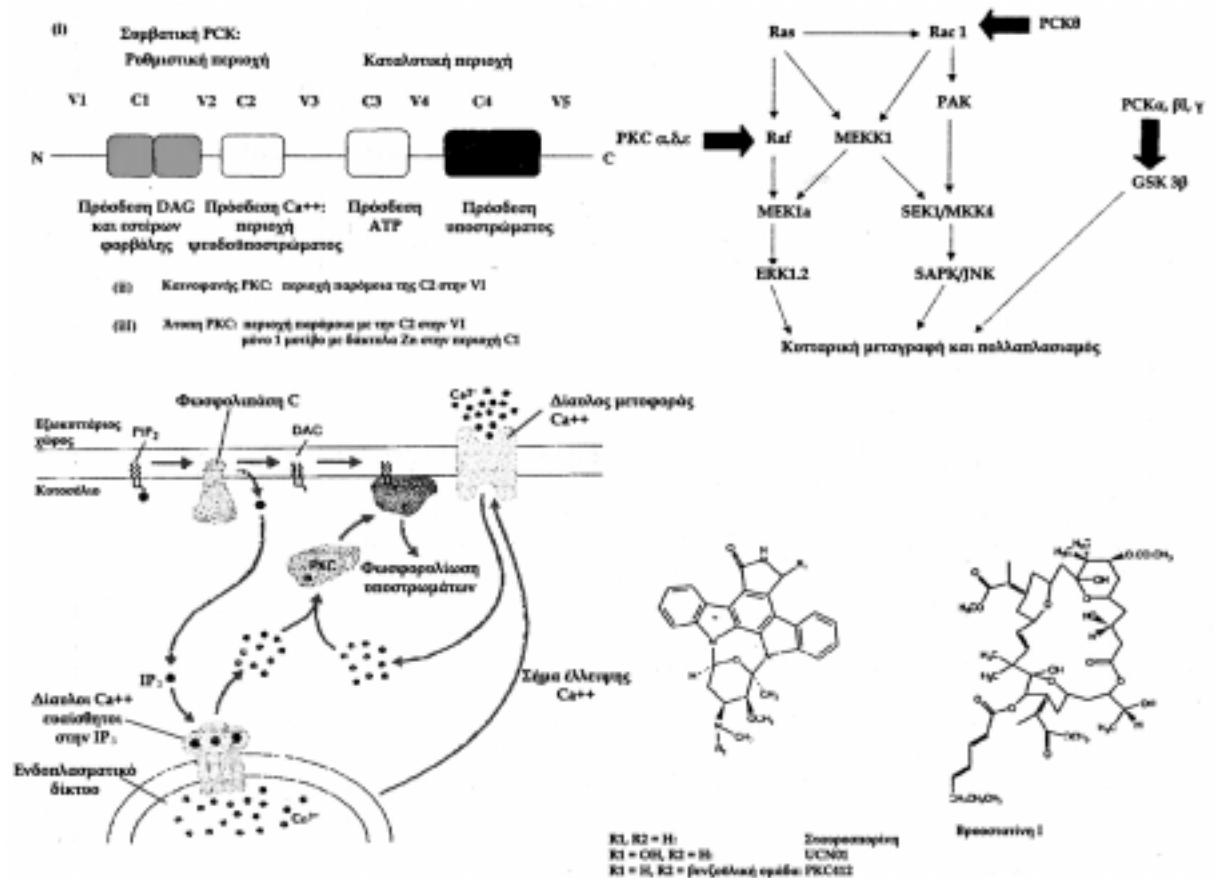
Η προσκόλληση των νεοπλασματικών κυττάρων μεταξύ τους, σε ετερόλογα κύτταρα ή σε πρωτεΐνες της ΕΘΟ οφείλεται στη διαμεσολάβηση μιας υπεροικογένειας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, οι οποίες είναι γνωστές ως ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες διαμέσου της ρύθμισης της προσκολλητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων ελέγχουν το σχηματισμό των μεταστατικών νεοπλασμάτων. Η μετανάστευση, η αύξηση και η ανάπτυξη, η ευαισθησία ως προς την απόπτωση και ο σχηματισμός νέων αγγείων για την παροχή θρεπτικών ουσιών στον όγκο αποτελούν διεργασίες που επηρεάζονται άμεσα από τις ιντεγκρίνες. Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας καταδεικνύεται ότι η γονιδιακή έκφραση των ιντεγκρινών ελέγχεται από μια κυτταροπλασματική οικογένεια πρωτεϊνών γνωστών ως πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Σύμφωνα με τους Rosfjord et al⁹ η PKC διαμορφώνει την έκφραση των γονιδίων $\alpha 2$ και $\beta 1$ των ιντεγκρινών, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η κυτταρική προσκόλληση των MCF-7 κυττάρων, τα οποία αποτελούν πρότυπη σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού.

PKC και έλεγχος της κυτταρικής αύξησης

Ο όρος PKC αναφέρεται στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσεων σερίνης/θρεονίνης

αποτελούμενης από τις παρακάτω 12 ισομορφές που συμβολίζονται με ελληνικά γράμματα: α , βI , βII , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , λ και μ . Οι PKC ισομορφές κωδικοποιούνται από 11 γονίδια¹⁰ και παίζουν ουσιωδέστατο ρόλο σε αρκετές οδούς επαγωγής των σημάτων που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση, το μετασχηματισμό και τη διαφοροποίηση^{11,12}. Συγκεκριμένες ισομορφές μπορούν να ενεργοποιηθούν από το ασβέστιο, διάφορα φωσφολιπίδια, τη διακυγλυκερόλη που παράγεται από τη φωσφολιπάση C ή τη φωσφολιπάση D, τους εστέρες της φορβόλης και από τα λιπαρά οξέα που παράγονται στα κύτταρα από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2. Οι διάφορες ισομορφές ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο ως προς τους παραπάνω συμπαράγοντες. Οι PKC ισομορφές ταξινομούνται σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη δομή τους και την απαίτησή τους για συγκεκριμένο συμπαράγοντα: (1) τις κλασικές PKCs (α , βI , βII , γ), οι οποίες ενεργοποιούνται από τη διακυγλυκερόλη ή το ασβέστιο, (2) τις καινοφανείς PKCs (δ , ϵ , η , θ , μ), οι οποίες ενεργοποιούνται από τη διακυγλυκερόλη, αλλά όχι από το ασβέστιο και (3) τις άτυπες PKCs (ζ , ι), οι οποίες δεν ανταποκρίνονται ούτε στη διακυγλυκερόλη ούτε στο ασβέστιο. Κάθε μια από αυτές τις ισομορφές περιέχει μια αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή (regulatory, REG) και μια καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή με δραστηριότητα κινάσης (catalytic, CAT)¹³. Οι ρυθμιστικές περιοχές όλων των PKC ισομορφών περιέχουν μια περιοχή ψευδοϋποστρώματος, μια αυτο-ανασταλτική περιοχή με αλληλουχίες παρόμοιες με τα υποστρώματα των PKC ισομορφών, που διατηρεί το ένζυμο σε αδρανή κατάσταση, προφανώς αλληλεπιδρώντας με την περιοχή πρόσδεσης για τα υποστρώματα στην καταλυτική περιοχή^{11,12,14}. Οι ενεργοποιητές της PKC, όπως η διακυγλυκερόλη, οι εστέρες της φορβόλης και τα ιόντα ασβεστίου, θεωρούνται ότι απαλλάσσουν το μόριο από την παραπάνω ενδομοριακή καταστολή, οδηγώντας το σε μια αλλαγή της χωροδιάταξής του, που προκαλεί την απελευθέρωση της περιοχής πρόσδεσης για τα υποστρώματα από την περιοχή του ψευδοϋποστρώματος. Έχει αποδειχθεί ότι συνθετικά ολιγοπεπτίδια που περιέχουν αλληλουχίες παρόμοιες με την περιοχή του ψευδοϋποστρώματος, αναστέλλουν την PKC *in vivo* και *in vitro*^{15,16} (Εικ. 1).

Η ανακάλυψη ότι ο οξικός εστέρας της



Εικόνα 1. PKC: Δομή και λειτουργικές ιδιότητες. Α) Δομή του μορίου της PKC. Β) Αλληλεξάρτηχη με τα ιόντα Ca και τα φωσφοϊνοσιτίδια. Γ) Συντακτικοί τύποι αναστολέων της PKC.

μυριστοϋλ-φορβόλης (phorbol myristoyl acetate- PMA) επάγει το σχηματισμό όγκων και προκαλεί μια παρατεταμένη ενεργοποίηση της PKC, αποτέλεσε ένα γεγονός-κλειδί στην έρευνα του καρκίνου συνδέοντας τη διεργασία μεταγωγής σήματος με την καρκινογένεση^{17,18}. Με εξαίρεση τις ισομορφές της PKC ζ, ι και λ, οι υπόλοιπες ενεργοποιούνται από το PMA. Με την ενεργοποίησή της, η PKC αποτελεί τον κύριο συμμετοχο σε μια σειρά κυτταρικών λειτουργιών που περιλαμβάνουν την αναστολή της αύξησης, τη διαφοροποίηση και τη γονιδιακή έκφραση. Οι PKC ισομορφές εκφράζονται διαφορετικά σε ποικιλία ιστών και διαμερισματοποιούνται εντός του κυτταροπλάσματος¹⁹.

Η PKC εμπλέκεται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού^{12,14}. Έτσι διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η συνολική δραστηριότητα της PKC αυξάνει σε μια σειρά ανθρώπινων καρκίνων του μαστού σε σύγκριση με

φυσιολογικό ιστό μαζικού αδένου, καθώς και ότι πρωτογενείς όγκοι μαστού εκφράζουν αυξημένα επίπεδα των PKC πρωτεϊνών²⁰. Αρκετές καρκινικές σειρές από ανθρώπινα κύτταρα μαστού αρνητικές ως προς τον οιστρογονικό υποδοχέα εκφράζουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα της PKC σε σύγκριση με τις δετικές ως προς τον οιστρογονικό υποδοχέα κυτταρικές καρκινικές σειρές μαστού. Επίσης, είναι γνωστό ότι ο πρώτος κυτταρικός τύπος συνδέεται με κακή πρόγνωση σε σύγκριση με το δεύτερο κυτταρικό τύπο²¹. Έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον σε δύο κυτταρικές σειρές η PKCδ εμφανίζεται ότι παίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της αύξησης των δετικών ως προς τον οιστρογονικό υποδοχέα κυττάρων από καρκίνο μαστού²². Επιπλέον, προκαταρκτικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της PKCa πιθανόν συνδέεται με την αντίσταση προς την ταμοξιφένη²³. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι τα μέλη της PKC οικογένειας παρουσιάζουν

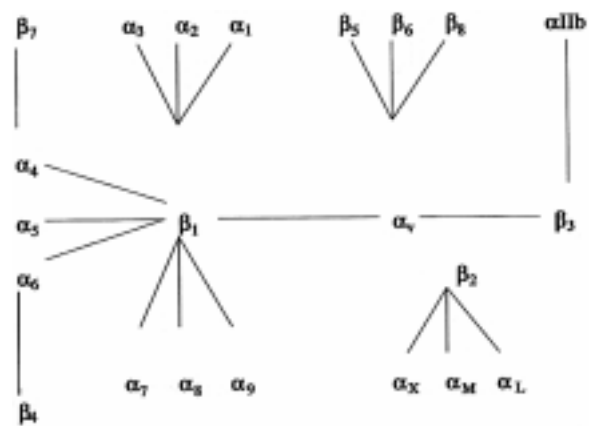
ζουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

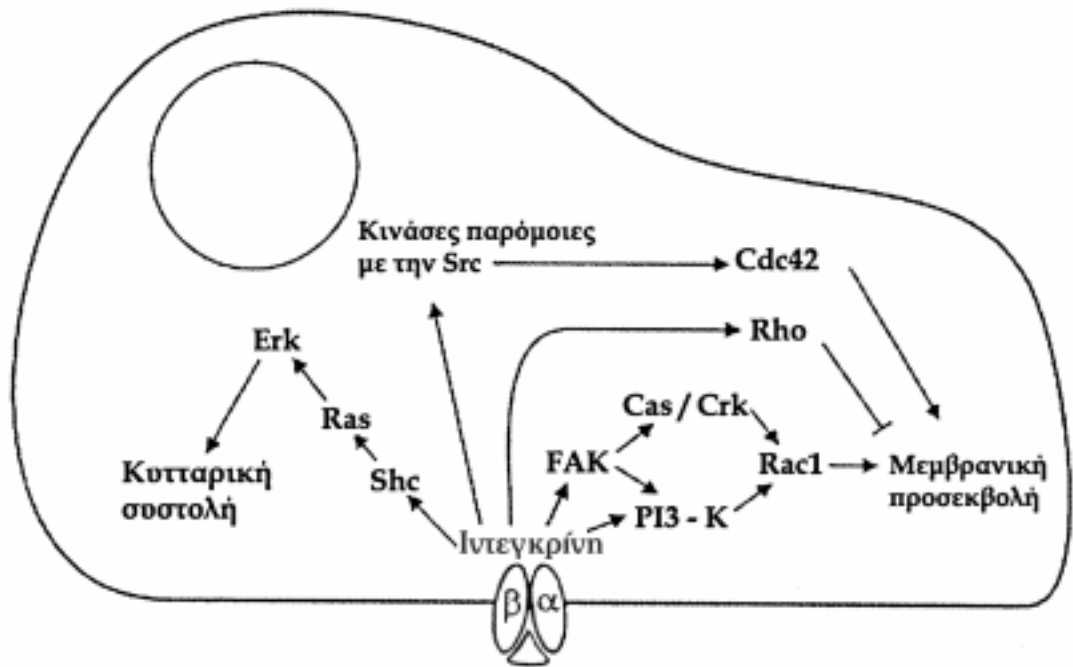
Μερικά πολύ επιθετικά νεοπλασματικά κύτταρα μαστού περιέχουν πολύ μεγάλη ποσότητα της PKC²¹. Η αυξημένη δραστηριότητα της PKC συνδέεται με τον περισσότερο επιθετικό, αρνητικό - για τον υποδοχέα των οιστρογόνων - φαινότυπο^{24,25}. Αντίθετα, η μειορρυθμική δραστηριότητα της PKC έχει δείξει ότι αναστέλλει την αύξηση του πληθυσμού των νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Από μελέτες που έγιναν σε μια μη μεταστατική κυτταρική σειρά από καρκινικά κύτταρα μαστού, την MCF-7, καταδεικνύεται ότι η ένδεση πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου για την PKCα στα παραπάνω κύτταρα, άλλαξε δραματικά το φαινότυπό τους, αυξάνοντας τη μεταστατική τους και ογκογενετική τους ικανότητα μετά την έγχυσή τους σε στελέχη γυμνών ποντικών⁹. Θεωρείται ότι η αυξημένη έκφραση της PKC-α στη MCF-7 καρκινική σειρά προκαλεί αλλαγή της έκφρασης των ιντεγκρινών στα διαμολυσμένα αυτά κύτταρα. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που προκαλούν την αλλαγή του φαινότυπου των MCF-7 κυττάρων και οφείλονται στην υπερέκφραση της PKC-α δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί. Είναι όμως προφανές από τη μελέτη της βιβλιογραφίας ότι η έκφραση των ιντεγκρινών αλλάζει, καθώς τα MCF-7-PKC-α κύτταρα αναπτύσσονται *in vitro* ανεξάρτητα ως προς την προσκόλλησή τους στην επιφάνεια των καλλιεργητικών δοχείων και είναι ικανά να αναπτυχθούν σε εναιώρημα. Αντίθετα, τα κύτταρα μάρτυρες MCF-7V (ένας υποκλώνος των MCF-7 κυττάρων που δεν εκφράζουν PKC-α δραστηριότητα) αναπτύσσονται μόνο μέσω της προσκόλλησής τους στην επιφάνεια των καλλιεργητικών δοχείων¹⁹. Με τη βοήθεια του συστήματος διαλογής κυττάρων ενεργοποιημένο από φθορισμό έχει δείξει ότι τα MCF-7V κύτταρα εκφράζουν τις α3 και α6 υπομονάδες των ιντεγκρινών, αλλά αυτές απουσιάζουν από τα MCF-7-PKC-α κύτταρα. Εφόσον τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τη β1 υπομονάδα των ιντεγκρινών, συμπεραίνεται ότι εκφράζονται κυρίως οι α3β1 και α6β1 ιντεγκρίνες.

ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΕ ΣΥΝΔΕΤΕΣ

Η υπεροικογένεια των ιντεγκρινών αποτελείται από 18α και 8β έως σήμερα γνωστές υπομονάδες που σχηματίζουν 24 ετεροδιμερή (Εικ. 2) για το σχηματισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ιντεγκρινών που λειτουργούν ως υποδοχείς για διάφορους κυτταρικούς συνδέτες και πρωτεΐνες της ΕΘΟ. Οι ιντεγκρίνες είναι εξαρτώμενες από την παρουσία κατιόντων και αποτελούνται από μια μεγάλη αμινο-τελική περιοχή (100 κατάλοιπα για τις α υπομονάδες και περίπου 700 κατάλοιπα για τις β υπομονάδες), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια βραχεία κυτταροπλασματική καρβοξυλική περιοχή. Οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία συνδετών που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες της ΕΘΟ και μόρια της κυτταρικής επιφάνειας^{26,27}. Πολλές από τις ιντεγκρίνες που λειτουργούν ως υποδοχείς αναγνωρίζουν το τριπεπτιδίο αργινίνη-γλυκίνη-ασπαραγινικό οξύ (RGD), το οποίο αποτελεί μια κοινή αλληλουχία σε συστατικά της ΕΘΟ. Η ενδοκυττάρια περιοχή των ιντεγκρινών συνδέεται άμεσα ή έμμεσα με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, συσχετίζοντας έτσι τον κυτταροσκελετό με την ΕΘΟ. Οι σηματοδοτικές οδοί με τη διαμεσολάβηση των ιντεγκρινών προάγουν την κυτταρική μετανάστευση προκαλώντας αλλαγές στην κυτταροσκελετική οργάνωση και αυξάνοντας την κυτταρική συσταλτικότητα (Εικ. 3). Η ενεργοποίηση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase - FAK) παίζει



Εικόνα 2. Συνδυασμοί των υπομονάδων των ιντεγκρινών.



Εικόνα 3. Κύριες σηματοδοτικές οδοί συνδεδεμένες με τις ιντεγκρίνες που επηρεάζουν την κυτταρική μετανάστευση. Η σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών ενεργοποιεί τις Rho GTPάσες, επάγοντας έτσι αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού οι οποίες είναι απαραίτητες για την κυτταρική μετανάστευση. Η πρόσδεση συνδέτη στις ιντεγκρίνες προάγει επίσης την κυτταρική συσταλτικότητα διαμέσου της ενεργοποίησης της Erk κινάσης της τυροσίνης.

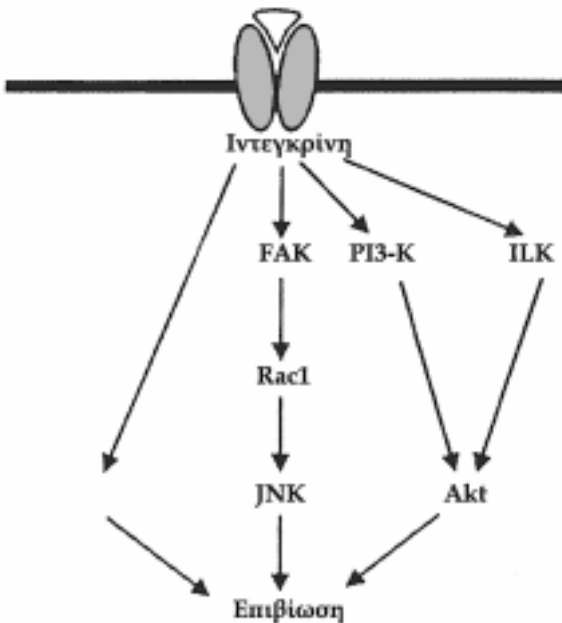
πρωτεύοντα ρόλο στις διάφορες σηματοδοτικές οδούς των ιντεγκρινών, που επηρεάζουν την κυτταρική μετανάστευση. Η FAK είναι μια κινάση της τυροσίνης μη υποδοχέας που έμμεσα και ίσως και άμεσα συνδέεται με τις ιντεγκρίνες στις περιοχές εστιακής επαφής. Η πρόσδεση του συνδέτη στις ιντεγκρίνες οδηγεί στη φωσφορυλίωση της FAK σε επτά τουλάχιστον διαφορετικές θέσεις τυροσίνης *in vivo*, επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση της FAK με την ογκοπρωτεΐνη Src, την πρωτεΐνη Grb2 και την κινάση της 3-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI3-K). Η FAK επίσης προάγει τη φωσφορυλίωση των συνδεδεμένων με αυτήν πρωτεϊνών, όπως είναι η Cas και η παξιλίνη. Πρόσφατα ο Chen et al²⁸ βρήκε ότι η κυτταροπλασματική κινάση Erk, η οποία εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε μεταναστευτικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μεταστατικών κυτταρικών σειρών, ενεργοποιείται μέσω της σηματοδοτικής οδού των ιντεγκρινών. Η ενεργοποίηση και αυτοφωσφορυλίωση της FAK, με τη διαμεσολάβηση των ιντεγκρινών, οδηγεί στην αλληλεπίδραση της FAK με την περιοχική ομολογία πλεξτρίνης

(pleckstrin homology domain) της Erk και την επακόλουθη ενεργοποίηση και φωσφορυλίωση της Erk. Η Erk παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, εφόσον οι αλλαγές στην έκφρασή της σχετίζονται άμεσα με αλλαγές ως προς τη μεταναστευτικότητα των κυττάρων. Επίσης η στοχευμένη μέσω της ιντεγκρίνης ενεργοποίηση της Erk συνεισφέρει στην κυτταρική μετανάστευση διαμέσου της φωσφορυλίωσης της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (Myosin Light Chain Kinase - MLCK), γεγονός που οδηγεί στην κυτταρική συσταλτικότητα²⁹.

ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η απόπτωση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής των φυσιολογικών κυττάρων και εξαλείφει τα κύτταρα μετά την επίδραση ορισμένων τοξικών προσβολών ή μετά την αποκόλλησή τους από την ΕΘΟ, όπως συχνά συμβαίνει στα επιδήλια. Ο τελευταίος αυτός τύπος της απόπτωσης είναι γνωστός στη διεθνή βιβλιογραφία ως "anoikis". Η ελάττωση του ρυθμού της από-

πτωσης συνεισφέρει στην ογκογένεση εξαιτίας του γεγονότος ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα "δραπετεύουν" από τη φυσιολογική απομάκρυνσή τους. Η σηματοδότηση των ιντεγκρινών τροποποιεί την αποπτωτική επαγωγή, προκαλώντας στις περισσότερες περιπτώσεις αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης, αλλά μερικές φορές και στην ελάττωσή της. Οι ιντεγκρίνες επάγουν την επιβίωση μέσω της ενεργοποίησης της PI3-K, της Erk, της συνδεδεμένης με την ιντεγκρίνη κινάσης (Integrin -Linked Kinase - ILK) και της κινάσης συνδεδεμένης στο αμινοτελικό άκρο της Jun (Jun NH2-terminal kinase - JNK) (Εικ. 4). Η ενεργοποίηση της PI3-K με τη διαμεσολάβηση των ιντεγκρινών πυροδοτεί αρκετούς αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς. Η ενεργοποιημένη PI3-K παράγει $PI(3,4,5)P_3$ και $PI(3,4)P_2$, οι οποίες επάγουν την επανατοποθέτηση της Akt στην κυτταρική μεμβράνη και στη φωσφορυλίωσή της. Η αναστολή της λειτουργίας της $\beta 1$ ιντεγκρίνης στο μαζικό αδένια *in vivo*, χρησιμοποιώντας ένα



Εικόνα 4. Έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης από τις ιντεγκρίνες. Η ενεργοποίηση της κινάσης Akt διαμέσου της PI3 κινάσης ή της συνδεδεμένης με την ιντεγκρίνη κινάσης (ILK), πυροδοτεί αρκετούς αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς που έχουν σχέση με την κυτταρική προσκόλληση μέσω των ιντεγκρινών. Παρομοίως, η ενεργοποίηση της Erk και JNK συνεισφέρει στην κυτταρική επιβίωση.

αρνητικό επικρατή υποδοχέα, οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο και σε ελαττωμένη φωσφορυλίωση της Akt και των υποστρωμάτων της Akt, όπως ο Bad και ο forkhead μεταγραφικός παράγοντας FKHR. Η φωσφορυλίωση της FAK είναι φυσιολογική σε αυτές τις περιπτώσεις³⁰ καταδεικνύοντας ότι η διαμέσου της ιντεγκρίνης ενεργοποίηση της PI3-K σε αυτόν τον ιστό είναι ανεξάρτητη της FAK, αν και πιθανόν να επηρεάζεται από τη σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων. Το τελευταίο έχει περιγραφεί σε καλλιέργειες κυττάρων από μαζικό αδένια. Υπάρχουν κάποιες εργασίες που υποδηλώνουν ότι η κινάση σερίνης/θρεονίνης ILK ενεργοποιείται μετά την πρόσδεσή της στην ιντεγκρίνη, όπου κατόπιν η ILK συνδέεται άμεσα και φωσφορυλιώνει την Akt³¹. Ωστόσο, η αντιαποπτωτικές λειτουργίες των ιντεγκρινών εξαρτώνται και από άλλες σηματοδοτικές οδούς. Η σηματοδότηση των ιντεγκρινών αυξάνει τη δράση των αυξητικών παραγόντων ως προς την κυτταρική επιβίωση διευκολύνοντας καθοδικές σηματοδοτικές διεργασίες, όπως έχει αποδειχθεί για την ιντεγκρίνη $\alpha 5\beta 1$ στα ολιγοδενδροκύτταρα και για την $\alpha 5\beta 1$ στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα μαζικού αδένια³². Από την άλλη πλευρά, η σηματοδότηση μέσω του c-erbB2 αυξητικού παράγοντα στα επιθηλιακά κύτταρα μαζικού αδένια ελαττώνει τη συγγένεια της $\alpha 2\beta 1$ ιντεγκρίνης, προκαλεί την ελάττωση της κυτταρικής επιβίωσης που οφείλεται στην ιντεγκρίνη και καταλήγει στην απόπτωση των κυττάρων, όταν αυτά αναπτύσσονται *in vitro* σε υπόστρωμα κολλαγόνου³³.

ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

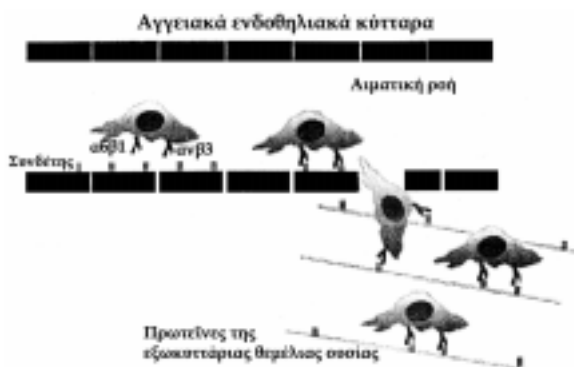
Τα νεοπλασματικά κύτταρα που αποκολλώνται από τον πρωτοπαθή όγκο εισέρχονται στο αγγειακό σύστημα διαμέσου της δια-ενδοθηλιακής μετανάστευσης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της στενής προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων, μια διαδικασία στην οποία πρωταρχικό ρόλο παίζουν οι ιντεγκρίνες. Οι ισομορφές των ιντεγκρινών που χρησιμοποιούνται διαφέρουν σε κάθε νεοπλασματικό κυτταρικό τύπο, αλλά και διαφορετικοί όγκοι συχνά μπορεί να εκφράζουν τις ίδιες ισομορφές. Οι ιντεγκρίνες $\alpha 6\beta 1$ και $\alpha \nu\beta 3$ εκφράζονται κυρίως σε επιθητικά

καρκινικά κύτταρα και είναι αυτές οι ιντεγκρίνες που πιθανόν συμμετέχουν στην αρχική πρόσδεση των νεοπλασματικών κυττάρων σε συνδέτες που εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (Εικ. 5). Σύμφωνα με τους Liapis et al³⁴ αυξάνεται η έκφραση της ανβ3 ιντεγκρίνης σε μεταστατικούς όγκους και σε μεταστάσεις σε απομακρυσμένες θέσεις. Ωστόσο, δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί ο μηχανισμός με τον οποίο η ανβ3 ιντεγκρίνη συμμετέχει στην εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Σύμφωνα με τους Felding-Habermann et al³⁵ η αλληλεπίδραση των κυκλοφορούντων νεοπλασματικών κυττάρων με τα αιμοπετάλια, αντιπροσωπεύει ένα πιθανό μηχανισμό για την παγίδευση των νεοπλασματικών κυττάρων εντός των αγγείων και την προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ανάπτυξη των μεταστάσεων σε μερικά όργανα καθορίζεται από την εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ιντεγκρίνης-συνδέτη. Αυτό εξηγεί το γεγονός ότι δημιουργούνται ειδικά μεταστάσεις σε ορισμένα όργανα, καθώς δεν εκφράζονται από όλα τα όργανα οι κατάλληλοι συνδέτες που θα αλληλεπιδράσουν με τις ειδικές γι' αυτούς ιντεγκρίνες των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι επικώριοι λεμφαδένες απο-

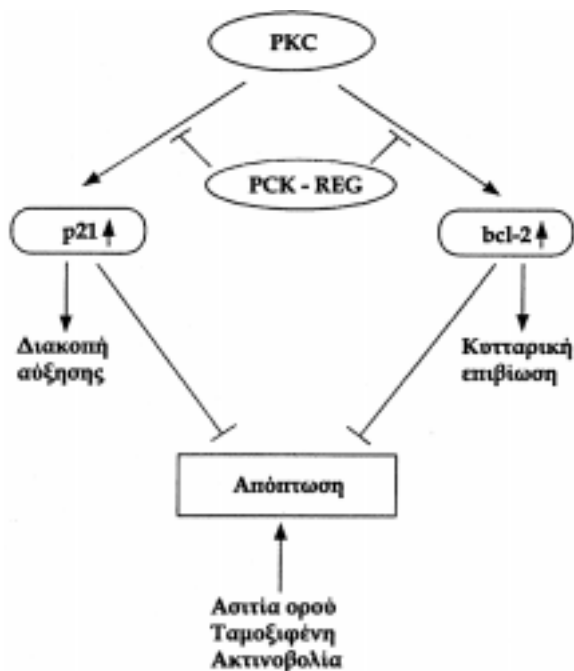
τελούν την αρχική δέση μετάστασης των νεοπλασματικών κυττάρων μαστού. Η πρόσδεση στη βιτρονεκτίνη των λεμφαδένων επιτελείται με τη διαμεσολάβηση των ανβ3 και ανβ5 ιντεγκρινών-υποδοχέων των καρκινικών κυττάρων^{36,37}. Οι μελέτες σε ανδρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού δείχνουν ότι αυτές εκφράζουν τις πρωτεΐνες της δεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού, όπως οστεοποντίνη, οστεονεκτίνη και οστική σιαλοπρωτεΐνη^{38,39} καθώς και ότι η οστεοποντίνη αποτελεί το συνδέτη για τις ιντεγκρίνες ανβ1, ανβ3 και ανβ520. Τα παραπάνω καταδεικνύουν ότι σημαντικό ρόλο στη παθογένεση της μετάστασης στα οστά παίζουν οι αν ιντεγκρίνες.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΚΚ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΠΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΜΑΣΤΟΥ

Οι ακριβείς ρόλοι των εξειδικευμένων ισομορφών της ΡΚΚ στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση ανδρώπινων κυττάρων από καρκίνο του μαστού δεν έχουν πλήρως αποσαφηνισθεί, κυρίως γιατί τα κύτταρα αυτά περιέχουν πολλαπλές ισομορφές της ΡΚΚ και έτσι είναι δύσκολο να διακρίνουμε τους συγκεκριμένους ρόλους των ισομορφών αυτών. Με σκοπό την κατανόηση του ρόλου των διαφόρων ισομορφών, έχουν αναπτυχθεί καρκινικές σειρές από όγκους μαστού, όπως η MCF-7, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης που κωδικοποιεί μόνο τη ρυθμιστική περιοχή είτε της ΡΚΚ-α είτε της -ε ή της -ζ ισομορφής. Εφόσον η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον παραπάνω φορέα έκφρασης στερείται καταλυτικής δραστηριότητας, εξασκεί αρνητική επικρατή επίδραση στην αντίστοιχη ενδογενή ισομορφή. Οι γονιδιακές αυτές κατασκευές (που ονομάζονται REG) χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή και το χαρακτηρισμό παραγώγων των MCF-7 κυτταρικών σειρών. Οι κυτταρικές αυτές σειρές σταθερά υπερεκφράζουν την αρνητικά επικρατή μεταλλαγή μορφή των ΡΚΚ -α, -ε ή -ζ ισομορφών. Έχει βρεθεί ότι η MCF-7/ΡΚΚ-α-REG κυτταρική σειρά παρουσίασε έντονη ελάττωση των επιπέδων των πρωτεϊνών p21^{CIP1} και bcl-2 (Εικ. 6)¹³. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών καταδεικνύουν ότι η ΡΚΚ-α στα MCF-7 κύτταρα παίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της απόπτω-



Εικόνα 5. Μετάσταση μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Τα καρκινικά κύτταρα που έχουν περάσει στην κυκλοφορία, συνδέονται μέσω ειδικών συνδετών στα ενδοθηλιακά κύτταρα διαμέσου των ανβ3 και αββ1 ιντεγκρινών τους. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η διέλευση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου και η πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες της ΕΘΟ. Η ιντεγκρίνη αββ1 προσκολλάται στη λαμινίνη της ΕΘΟ και η ιντεγκρίνη ανβ3 προσκολλάται στη βιτρονεκτίνη της ΕΘΟ των λεμφαδένων και στην οστεοποντίνη της ΕΘΟ των οστών.



Εικόνα 6. Προτεινόμενο μοντέλο του εξειδικευμένου ρόλου των PKC ισομορφών στα MCF-7 κύτταρα. Η PKC-α αυξάνει την έκφραση των p21^{CIP1} και bcl-2, προστατεύοντας έτσι τα MCF-7 κύτταρα από την απόπτωση. Η αύξηση της έκφρασης της ρυθμιστικής περιοχής της PKC-α στα MCF-7^{CIP1} κύτταρα, αναστέλλει τις εξαρτώμενες από την PKC οδούς και μειορρυθμίζει τις p21 και bcl-2. Αυτό οδηγεί σε ανώμαλη είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιεί αποπτωτικές διεργασίες. Παρόμοια, αλλά όχι τόσο έντονη, δράση εμφανίζει η PKC-ε ισομορφή, αλλά όχι η PKC-ζ.

σης διαμέσου της αύξησης της έκφρασης των p21^{CIP1} και bcl-2, προστατεύοντας έτσι τα MCF-7 κύτταρα από την απόπτωση.

Η ανεξάρτητη της προσκόλλησης σε συστατικά της ΕΘΟ κυτταρική αύξηση, αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο των εξαλλαγμένων κυττάρων. Σε μια μελέτη έχει αποδειχθεί ότι όταν τα κύτταρα από ανδρώπινο μελάνωμα αναπτύσσονται *in vitro* συνδεδεμένα σε τρισδιάστατο υπόστρωμα κολλαγόνου διαμέσου της ανβ3 ιντεγκρίνης, τα κύτταρα αυτά δεν υφίστανται απόπτωση⁴⁰. Σε μερικά κύτταρα, η απόπτωση αναστέλλεται μετά την ενεργοποίηση της PKC-α από εστέρες της φορβόλης, ενώ σε άλλα κύτταρα η ενεργοποίηση της PKC πυροδοτεί τον κυτταρικό θάνατο^{41,42}. Η αύξηση της έκφρασης της ανβ3 ιντεγκρίνης σε MCF-7-PKC-α μέσω ενός μηχανισμού αύξησης της

έκφρασης της PKC-α οδήγησε τα κύτταρα αυτά σε αύξηση ανεξάρτητη από την προσκόλληση τους σε υπόστρωμα ΕΘΟ, αλλά παρουσίασαν επαγωγή της απόπτωσης μετά την παρατεταμένη έκθεσή τους σε εστέρες της φορβόλης. Έχει προταθεί ότι οι αλλαγές της έκφρασης των PKC ισομορφών υπό την επίδραση των εστέρων της φορβόλης πιθανόν να προκαλούν την έναρξη της διεργασίας της απόπτωσης⁴³.

Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της PKC-α στην MCF-7 καρκινική σειρά κυττάρων μαστού προκαλεί αυξημένη έκφραση του *jun* γονιδίου, που αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που ελέγχει την κυτταρική αύξηση⁴³. Η έκφραση του παραπάνω γονιδίου προκαλεί αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού της παραπάνω κυτταρικής σειράς *in vitro*. Αντίθετα, τα ανεξάρτητα από τα οιστρογόνα MCF-7 κύτταρα με υπερέκφραση της PKC-α υφίστανται απόπτωση όταν εκτίθενται στο PMA. Τα κύτταρα αυτά έχει βρεθεί ότι σε απάντηση ως προς το PMA εκφράζουν επίσης το γονίδιο *gadd45*, το οποίο αποτελεί ένα γονίδιο διακοπής της αύξησης (growth arrest gene). Αυτό υποδηλώνει ότι το *gadd45* συμμετέχει σε σηματοδοτικές ακολουθίες που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο των MCF-7 κυττάρων⁴⁴. Όλες αυτές οι μελέτες καταδεικνύουν ότι οι αλλαγές της PKC οδού επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη διεργασία της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Επομένως, οι αναστολείς της PKC-α πιθανόν να αυξάνουν τη δραστηριότητα των κυτταροτοξικών παραγόντων για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

PKC-ΣΤΟΧΟΣ ΓΙΑ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Οι διάφορες στρατηγικές για τον έλεγχο του καρκίνου στοχεύουν αρκετά από τα διαδοχικά βήματα που οδηγούν στην αύξηση των όγκων και στη μετάσταση. Διάφορες αντι-αγγειογενετικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη χρησιμοποιώντας διάφορες συνδυαστικές ουσίες όπως AGM-1470, CAI, PF4 και DS-4152⁴⁵⁻⁴⁸, οι οποίες αναστέλλουν τον αγγειακό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική προσκόλληση ή την κινητικότητα των κυττάρων. Η χρήση αντισωμάτων (που αναστέλλουν τη λειτουργία των υποδοχέων) καθώς και ολιγονουκλεοτιδίων με αλληλουχία αντίθετης φοράς (antisense) (για την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης) ενα-

ντίον των αυξητικών παραγόντων ενδοθηλιακής προέλευσης βρίσκεται υπό έρευνα⁴⁷. Τα ευρήματα αρκετών μελετών που διενεργούνται στο Guthrie Research Institute δημιουργούν πολύ ενδιαφέρουσες νέες δυνατότητες για τη ρύθμιση της έκφρασης των ιντεγκρινών σε όγκους με τη διαμεσολάβηση θεραπευτικών στρατηγικών που έχουν ως στόχο συγκεκριμένες ισομορφές της PKC. Η χρήση θεραπευτικών παραγόντων, όπως της βρουοστατίνης-1 (bryostatatin-1) εναντίον των πρωτεϊνικών κινασών, βρίσκεται υπό κλινική δοκιμασία δίνοντας έμφαση στο ζωτικό ρόλο των πρωτεϊνικών κινασών ως προς της επαγωγική τους δράση στην ογκογένεση. Σε μελέτες κυτταρικών καλλιέργειών, λειτουργικά η βρουοστατίνη-1 φαίνεται να εμφανίζει μια διφασική κυτταρική απάντηση. Χαμηλές δόσεις της βρουοστατίνης-1 προκαλούν την απόπτωση των MCF-7-PKC-α κυττάρων, αλλά υψηλές δόσεις αντιστρέφουν την ανασταλτική δράση ως προς την κυτταρική αύξηση των εστέρων της φορβόλης και επάγουν την κυτταρική επιβίωση⁴⁴. Για τούτο η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα καρκινικά κύτταρα μαστού "δραπετεύουν" από τον κυτταρικό θάνατο, ακόμη και υπό την παρουσία θεραπευτικών παραγόντων, θα συμβάλει σημαντικά στο σχεδιασμό των νέων αυτών φαρμάκων. Οι δύο κυτταρικές σειρές MCF-7V και MCF-7-PKC-α προσφέρουν ένα εξαιρετικό σύστημα - μοντέλο για τον προσανατολισμό των μελετών προς την κατεύθυνση του ρόλου των ιντεγκρινών και της ρύθμισής τους από την PKC στον καρκίνο του μαστού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αρχική μας άποψη για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της PKC έχει μετεξελιχθεί τα τελευταία χρόνια με την ανακάλυψη νέων μηχανισμών ρύθμισης που έχουν σχέση με τη φωσφορυλίωση της PKC και την αλληλεπίδρασή της με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Εξάλλου, οι διάφορες ισομορφές της PKC φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στα φαινόμενα της κυτταρικής προσκόλλησης και μετάστασης. Από την άλλη μεριά, υπάρχει πληθώρα πειραματικών αποτελεσμάτων που επικυρώνουν τη σπουδαιότητα των ιντεγκρινών στην ανάπτυξη όγκων και στα φαινόμενα της μετάστασης. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι οι ιντεγκρίνες ενέχονται στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων έναντι της απόπτωσης που

οφείλεται σε χημειοθεραπευτικές ουσίες. Οι ιντεγκρίνες αποτελούν ελκυστικούς στόχους για αντινεοπλασματικά φάρμακα, αλλά η ποικιλομορφία τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους δυσχεραίνει τη μελέτη τους.

Μελλοντικά, θα πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο η σχέση μεταξύ PKC και ιντεγκρινών, η σχέση τους με άλλες σηματοδοτικές οδούς, καθώς και η αντίσταση καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση κάτω από την επίδραση αντινεοπλασματικών φαρμάκων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Parkin DM, Stjernsward J, Muir CS. Estimates of worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull World Health Organ* 62:163-182, 1984.
2. Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LAG, Rosenberg HM, Feigal EG, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends *J Natl Cancer Inst* 93:824-842, 2001.
3. Henderson BE, Pike MC, Bernstein L, Ross RK. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF (ed) *Cancer epidemiology and prevention*. 2nd ed, Oxford: Oxford University Press; 1996:1022-1039.
4. Probst Hensch NM, Pike MC, McKean-Cordin R, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. Ethnic differences in post-menopausal plasma estrogen levels: high estrone levels in Japanese-American women despite low weight. *Br J Cancer* 82:1867-1870, 2000.
5. Ferlay J, Bray F, Sankila R, Parkin DM. EU-CAN: Cancer incidence, mortality, and prevalence in the European Union 1996. version 3.1. IARC Cancer Base No 4. Lyon: IARC Press; 1996.
6. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 355:1822-1830, 2000.
7. EBCT. Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomized trials. *Lancet* 351:1451-1467, 1998a.
8. EBCT. Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomized trials. *Lancet* 352:930-942, 1998b.
9. Rosfjord EC, Maemura M, Johnson MD, Torri JA, Akiyama SK, Woods VL, Dickson RB. Activation of protein kinase C by phorbol esters modulates $\alpha_2\beta_1$ integrin on MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 248:260-271, 1999.
10. Dekker LV, Parker PP. The protein kinase C and protein kinase C related gene families.

- Curr Opin Struct Biol 5:396-402, 1995.
11. Blobel GC, Obeid LM, Hamun YA. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 13: 411-431, 1994.
 12. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:28495-28498, 1995.
 13. Soh J-W, Lee Y-S, Weinstein IB. Effects of regulatory domains of specific isoforms of protein kinase C on growth control and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Exp Ther Onc* 3:115-125, 2003
 14. Davidson NE, Kennedy MJ. Protein kinase C and breast cancer. *Cancer Treat Res* 83:91-105, 1996.
 15. Gupta KP, Ward NE, Gravitt KR, Bergman PJ, O'Brian CA. Partial reversal of multidrug resistance in human breast cancer cell by an N-myristoylated protein kinase C-alpha pseudosubstrate peptide. *J Biol Chem* 271: 2102-2111, 1996.
 16. Bergram PJ, Gravitt KR, O'Brian CA. An N-myristoylated protein kinase C-alpha pseudosubstrate peptide that function as a multidrug resistance reversal agent in human breast cancer cell is not P-glycoprotein substrate. *Cancer Chemother Pharmacol* 40: 453-456, 1997.
 17. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257:7847-7851, 1982.
 18. Leach KL, James ML, Blumberg PM. Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc Nat Acad Sci USA* 80:4208-4212, 1983.
 19. Noti JD, Johnson AK, Kirk Q. Cancer metastasis and the role of protein kinase C and integrins. *The Guthrie Journal* 69:31-39, 2000.
 20. Lim IK, Lee DJ, Lee KH, Yun TK. High activities of protein kinase C and M fresh human stomach and breast tumors. *Yonsei Med J* 28:255-260, 1987
 21. Fabbro D, Kung W, Costa SD, Borner C, Regennass U, Eppenberger U. Involvement of protein kinase C in the growth regulation of human breast cancer cell. *Cancer Treat Res* 61: 22-48, 1992.
 22. Shanmugam M, Krett NL, Maizels ET, Murad FM, Rosen ST, Hunzicker-Dunn M. A role for protein kinase C delta in the differential sensitivity of MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells to phorbol ester-induced growth arrest and p21 (WAF1/CIP1) induction. *Cancer Lett* 172:43-53. 2001.
 23. Chisamore MJ, Ahmed Y, Bentrem DJ, Jordan VC, Tonetti DA. Novel antitumor effect of estradiol in athymic mice injected with a T47D breast cancer cell line overexpressing protein kinase C alpha. *Clin Cancer Res* 7:3156-3165, 2001
 24. Regazzi R, Fabbro D, Costa SD, Borner C, Eppenberger U. Effect of tumor promoter on growth and on cellular redistribution of phospholipid/Ca²⁺-dependent protein kinase in human breast cancer cell. *Int J Cancer* 37:731-737, 1986.
 25. Borner C, Wyss R, Regazzi R, Eppenberger U, Fabbro D. Immunological quantitation of phospholipid/Ca²⁺-dependent protein kinase of human mammary carcinoma cells: inverse relationships to estrogen receptors. *Int J Cancer* 40:344-348, 1987.
 26. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497, 1987.
 27. Arcangelis AD. Integrins and ECM function, role in vertebrate development. *Trends Genet* 16:389-395, 2000.
 28. Chen R, Kim O, Li M, Xiong X, Guan JL, Kung HJ, Chen H, Shimizu Y, Qiu Y. Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinases through the FERM domain. *Nat Cell Biol* 3:439-444, 2001.
 29. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137:481-492, 1997.
 30. Faraldo MM, Deugnier MA, Thiery JP, Glukhova MA. Growth defect induced by perturbation of β 1-integrin function in the mammary gland epithelium result from a lack of MAPK activation via the Shc and Akt pathways. *EMBO Rep* 2:431-437, 2001.
 31. Persad S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinases: critical roles for kinases activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem* 276:27462-27469, 2002.
 32. Lee JW, Juliano RL. A56 integrin protects intestinal epithelial cell from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 11:1973-1987, 2000.
 33. Baekstrom D, Lu PJ, Taylor Papadimitriou J. Activation of the α 6 β 1 integrin prevents c-erbB2-induce scattering and apoptosis of human mammary epithelial cell in collagen. *Oncogen* 19: 4592-4603, 2000.
 34. Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrins α v β 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diag Mol Pathol* 5:127-135, 1996.
 35. Felding-Hagermann B, Habermann R, Saldívar E, Ruggeri ZM. Role of β 3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets

- under flow. *J Biol Chem* 271:5892-5900, 1996.
36. Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresch DA, Brodet P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrins $\alpha v \beta 3$ to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* 90:1406-13, 1992.
37. Wyner EA, Orlando RA, Cheresch DA. Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J Cell Biol* 113:919-29, 1991.
38. Bellahcene A, Castronovo V. Expression of bone matrix protein in human breast cancer: potential role in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bull Cancer* 84:17-24, 1997.
39. Bellahcene A, Castronovo V. Increase expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix protein, in human breast cancer. *Am J Pathol* 146:95-100, 1995.
40. Montgomery AM, Reissfeld RA, Cheresch DA. Integrin $\alpha v \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8856-8860, 1994.
41. McConkey D, Hartzell P, Jondal M, Orrenius S. Inhibition of DNA fragmentation thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J Biol Chem* 264:13399-13402, 1989.
42. Ishi H, Gobe G. Epstein-Barr virus infection associated with increased apoptosis in untreated and phorbol ester-treated human Burkitt's lymphoma (AW-Ramos) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 192:1415-1423, 1993
43. Ways DK, Kukoly CA, deVente J, Hooker JL, Bryant WO, Posekany KJ, Fletcher DJ, Cook PP, Parker PJ. MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C- α exhibit altered expression of other protein kinase C phenotype. *J Clin Invest* 95:1906-1915, 1995.
44. deVente JE, Kukoly CA, Bryant WO, Posekany KJ, Chen J, Flecher DJ, Parker PJ, Pettit GJ, Lozano G, Cook PP, Ways DK. Phorbol esters induce death in MCF-7 breast cancer cell with altered expression of protein kinase C isoforms. Role for p53 independent induction of gadd-45 in initiating death. *J Clin Invest* 96:1874-1886, 1995.
45. Ingber D, Fujita M, Kishimoto S, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348:555-557, 1990.
46. Koch E, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA. Angiogenesis: role of calcium mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1307-1311, 1995.
47. Folkman J, Inber D. Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 3:89-96, 1992.
48. Tanaka NG, Sakamoto N, Inoue K, Korenaga H, Kadoya S, Ogawa H, Osada Y. Antitumor effects of an antiangiogenic polysaccharide from an *Arthrobacter* species with or without a steroid. *Cancer Res* 49:6727-6730, 1989.

Corresponding author:

Mirsini Kouloukoussa
University of Athens, Medical School
Laboratory of Histology and Embryology
M. Asias 75, Goudi, Athens 115 27
Tel.. 210-746-2351, email: mkoulouk@med.uoa.gr

Υπεύθυνη αλληλογραφίας:

Μυρσίνη Κουλούκουσα
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή
Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας
Μ. Ασίας 75, Γουδί, Αθήνα 115 27
Τηλ. 210-746-2351, email: mkoulouk@med.uoa.gr