

Role of molecular adhesion factors in the spread of epithelial ovarian cancer

Molekularne czynniki adhezyjne w szerzeniu się nabłonkowego raka jajnika

Роль молекулярных адгезионных факторов в распространении

эпителиального рака яичника

¹ Klinika Perinatologii i Ginekologii, Zabrze. Kierownik: dr hab. n. med. W. Kaźmierczak

² Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej, Bytom.

Kierownik: dr hab. n. med. A. Olejek prof. nadzw. ŚAM

Correspondence to: dr n. med. Bogdan Waksmański, Katedra i Oddział Kliniczny Położnictwa i Ginekologii i Ginekologii

Onkologicznej, ul. Stefana Batorego 15, 41-902 Bytom, tel. 032 281 71 06, e-mail: waksman1@mp.pl

Source of financing: Department own sources

Summary

The process of spread of epithelial ovarian cancer is associated with molecular mechanisms including cellular surface receptors, basal membrane components, intercellular adhesion molecules and cell-derived signals. The key role in cellular adhesion and its motility is played by E-cadherin and catenins. Expression of the cadherin – catenin complex decreases in parallel with progressing clinical stage of ovarian cancer. At the same time, re-expression of this complex is associated with dissemination of the neoplasm over peritoneal surface. Changing expression or dysfunction of receptors for integrins and their association with molecules of extracellular matrix (ECM) is closely correlated with tumour progression and/or its metastatic potential. The lysophosphatidic acid mediates laminin-dependant migration of cells by the autocrine local mechanism. The first step in formation of metastases is degradation of collagen type IV, as well as activation of metalloproteinases and pro-angiogenic factors, whose increased expression is seen in ovarian cancer cells. Adhesion contact kinase (FAK) is crucial for migration of neoplastic cells, inversely dependant on growth factors and integrin receptors. Increased expression of this kinase is associated with statistically significant with higher clinical stage of the tumour, presence of metastases in lymph nodes and distant metastases. The basic prerequisite for formation of metastases is derangement of cell adhesion mechanism, inducing loss of adhesion between cells and between cells and extracellular matrix. This mechanism is crucial in the spread of ovarian cancer throughout the abdominal cavity.

Key words: epithelial ovarian carcinoma, cell adhesion, FAK, cadherins

Streszczenie

Proces szerzenia się nabłonkowego raka jajnika jest związany z mechanizmami molekularnymi obejmującymi receptory powierzchni komórki, składnikami błony podstawnej, międzykomórkowymi cząsteczkami adhezyjnymi oraz sygnałami pochodzącymi od komórki. Podstawową rolę w adhezji komórki i jej ruchliwości pełnią E-cadheryna oraz kateniny. Ekspresja kompleksu kadheryna – kateniny zmniejsza się wraz z postępującym stopniem zaawansowania klinicznego raka jajnika. Jednocześnie występuje reekspresja tego układu w przypadku rozsiewu procesu nowotworowego na powierzchni otrzewnej. Zmieniająca się ekspresja lub nieprawidłowe działanie receptorów integrzyn i ich związków z cząsteczkami macierzy zewnątrzkomórkowej ECM wykazuje ścisłe połączenie z postępowaniem rozwoju guza lub potencjałem przerzutu. Kwas lizofosfatydowy pośredniczy w zależnej od laminin migracji komórek w autokrynnym mechanizmie lokalnym. Pierwszym krokiem w procesie tworzenia przerzutów jest degradacja kolagenu typu IV z działaniem metaloproteinaz oraz czynników proangiogennych, których zwiększona ekspresja jest obserwowana w komórkach raka jajnika. Kinaza kontaktów adhezyjnych FAK pełni podstawową rolę w migracji komórek nowotworowych ujemnie zależnych od czynników wzrostu oraz receptorów integrzyn. Zwiększona ekspresja tej kinazy wiąże się istotnie statystycznie z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego guza, obecnością przerzutów w wę-

złach chłonnych i obecnością odległych przerzutów. Podstawowym wstępnym warunkiem powstania przerzutu jest zaburzenie mechanizmu adhezji komórki, co w konsekwencji indukuje zmiany w przyleganiu między komórkami oraz komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową. Mechanizm ten ma podstawowe znaczenie w szerzeniu się raka jajnika w obrębie jamy brzusznej.

Słowa kluczowe: nabłonkowy rak jajnika, adhezja komórkowa, FAK, kadheryny

Содержание

Процесс распространения эпителиального рака яичника связан с молекулярными механизмами, такими как поверхностные клеточные рецепторы, составные части основной мембраны, между-клеточные адгезионные (прилегающие) частицы и сигналы поступающие из клеток. Ключевую роль в соединении клеток и их передвижении играют Э-кадгерины и катенины. Выразительность совокупности кадгерина катенины уменьшается параллельно с прогрессирующим клиническим развитием рака яичника. Одновременно повторная выразительность рассматриваемой совокупности связана с рассеиванием новообразований на поверхности оболочки брюшины. Измененная выразительность или дисфункция рецепторов для интегрин и их соединения с частицами внеклеточного ложа (ЭКМ) тесно связаны с развитием опухоли и/или ее потенциалом производства метастаз. Лизофосфатидовая кислота принимает участие в зависимом от ламинин передвижении клеток в локальном аутокринном механизме. Первым шагом в формировании метастаз является деградация колагена типа 4, а также активация металлопротеиназы и проангиогенных факторов, увеличенная выразительность которых отмечается в клетках рака яичника. Контактная адгезионная киназа (ФАК) играет ключевую роль в передвижении клеток новообразований, при чем существует обратная зависимость между киназой и факторами роста и рецепторами для интегрин. Увеличенная выразительность упомянутого киназа связана в статистически значимой степени с более высоким уровнем клинической опухоли, наличием метастаз в лимфатических узлах, а также наличием отдаленных метастаз. Основным условием образования метастаз является расстройство адгезионных механизмов, в том числе потеря прилегания между клетками, а также между клетками и внеклеточным ложем. Этот механизм имеет основное значение для распространения рака яичника в брюшной полости.

Ключевые слова: эпителиальный рак яичника, адгезия (прилегание) клеток, контактная адгезионная киназа, кадгерины

INTRODUCTION

Advanced clinical stage of epithelial ovarian cancer is characterized by spread of tumour throughout the peritoneal cavity⁽¹⁾. These typical features are associated with its biology and have direct influence on course of disease and outcome of therapeutic intervention⁽²⁾. Formation of metastases of ovarian cancer occurs via local invasion, by lymphatic vessels and by hematogenous route. All these processes depend on varying degrees of cell cohesion, invasion and angiogenesis⁽³⁾. Similarly to other neoplasms, ovarian cancer are composed of various cell types, including tumour cells, fibroblasts, normal epithelial cells, endothelial cells and leukocytes. Nevertheless, only a small subpopulation of tumour cells (usually less than 1% of the whole tumour) is able to induce metastases (fig. 1).

Detailed mechanisms of invasion of ovarian cancer cells into the basal membrane have not been fully elucidated yet. This process has certainly a complex molecular basis, most probably encompassing cellular surface receptors, components of basal membrane, inter-cellular adhesion molecules and cell-derived signals.

WSTĘP

Nabłonkowy rak jajnika manifestuje się w zaawansowanym stadium rozsiewem w jamie otrzewnej⁽¹⁾. Te typowe cechy wiążą się z jego biologią i mają bezpośredni wpływ na przebieg choroby oraz wyniki postępowania terapeutycznego⁽²⁾. Przerzutowanie w raku jajnika następuje drogą miejscowego szerzenia, drogami chłonnymi oraz drogą krwiopochodną. Wszystkie te procesy zależą od różnego stopnia spadku spójności komórek, inwazji i angiogenezy⁽³⁾. Podobnie jak inne nowotwory, raki jajnika składają się z rozmaitych typów komórek. Zawierają komórki guza, fibroblasty, normalne komórki nabłonkowe, komórki endotelialne i leukocyty. Jednakże tylko mała subpopulacja komórek guza (zwykle poniżej 1,0% całego guza) indukuje przerzuty (rys. 1). Dokładne mechanizmy, poprzez które komórki raka jajnika dokonują inwazji błony podstawnej, nie zostały do tej pory w pełni wyjaśnione. Proces ten ma niewątpliwie złożoną molekularną podstawę, w którą z dużym prawdopodobieństwem włączają się wielokrotnie receptory powierzchni komórki, składniki błony podstawnej, mię-

ADHESION MOLECULES

One of possible mechanisms of alteration of properties of basal membrane by ovarian cancer cells relies on its proteolytic degradation. Cancer cells may also decrease synthesis and/or increase secretion of extracellular matrix molecules (ECM)⁽⁴⁾. A topic of analyses is behaviour of ovarian cancer cells towards normal cells of ovarian epithelium, in view of altered response of cell to ECMs. Elucidation of these mechanisms, based on changes in adhesion molecules and/or their receptors mediating regulation of expression of ECMs by ovarian cancer cells, may contribute to our better understanding of phenomena associated with invasion and metastatic spread of the tumour⁽⁵⁾.

Several families of adhesion molecules have been described, which appear to play a crucial role in the development of ovarian cancer⁽⁶⁾. Cell adhesion molecules (CAMs) are glycoproteins commonly present on the external surface of cell membrane, ensuring adhesion and contact between adjacent cells and contact of cells with ECMs⁽⁷⁾. These molecules have been subdivided in 5 classes: integrins, selectins, cadherins, immunoglobulin-like molecules and CD44 molecule isoforms. Adhesion molecules exist both as trans-membranous protein form (mCAM) and as soluble molecules (sCAM). Adhesion molecules play a significant role in the complex process of tumour development⁽⁸⁾.

Due to the complexity of neoplastic disease, it is quite probable, that other molecules, also involved in processes of adhesion, migration, invasion, growth, proliferation and apoptosis, may become involved in the process. It was demonstrated, that CD44 and $\beta 1$ subunit of integrin play are crucial for the process of adhesion and migration of ovarian cancer cells into the mesothelium and into the pericellular matrix⁽⁹⁾. Next, ovarian cancer cells may migrate across the layer of mesothelial cells, penetrating the basal membrane, invading tissues and forming metastases. It was observed, that when ovarian cancer cells are unable to interact between themselves or with normal mesothelial cells and ECMs, then the spread of ovarian cancer cells is impossible in the *in vivo* setting⁽⁶⁾.

Further studies will try to elucidate correlations of adhesion between cancer cell and impact of various molecules and their ligands in the course of neoplastic disease. In the case of their identification, it should be possible to point out factors, which might inhibit their activity and thus play the role of therapeutic agents⁽¹⁰⁾.

THE FAMILY OF CADHERINS

Cadherin E and catenins play a key role in cell adhesion and cell mobility. Classic cadherins N, E and P, form the so-called adherence junctions and fulfill different func-

dzykomórkowe cząsteczki adhezyjne oraz sygnały pochodzące od komórki.

CZĄSTECZKI ADHEZYJNE

Jedną z możliwych dróg, którą komórki raka jajnika mogą zmienić własności błony podstawnej, polega na proteolitycznej degradacji błony. Alternatywnie komórki raka jajnika mogą zmniejszyć syntezę i/lub zwiększyć wydzielanie cząsteczek macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (*extracellular matrix molecules*)⁽⁴⁾. Przedmiotem analiz jest zachowanie się komórek nowotworu jajnika w odniesieniu do komórek prawidłowego nabłonka jajnika, w aspekcie zmienionej odpowiedzi komórki na cząsteczki ECM. Wyjaśnienie tych mechanizmów, których podłoże tkwi w zmianach w cząsteczkach przylegania i/lub ich receptorach, przez które komórki raka jajnika regulują ekspresję cząsteczek ECM, pomoże w zrozumieniu inwazji i przerzutowania guza⁽⁵⁾.

Opisano wiele rodzin cząsteczek adhezyjnych, które, jak się wydaje, mają kluczowe znaczenie w rozwoju raka jajnika⁽⁶⁾. Cząsteczki adhezji komórkowej CAMs (*cell adhesion molecules*) są to glikoproteiny powszechnie występujące na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej, które zapewniają przyleganie i kontakt sąsiednich komórek między sobą oraz kontakt komórki z proteinami macierzy zewnątrzkomórkowej⁽⁷⁾. Cząsteczki te zakwalifikowano do pięciu klas: integryn, selektyn, kadheryn, cząsteczek immunoglobulinopodobnych i izoform cząsteczki CD44. Cząsteczki adhezyjne występują zarówno jako transbłonowa proteina (mCAM), jak i pod postacią cząsteczek rozpuszczalnych (sCAM). Spełniają one istotną rolę w złożonym procesie rozwoju nowotworów⁽⁸⁾.

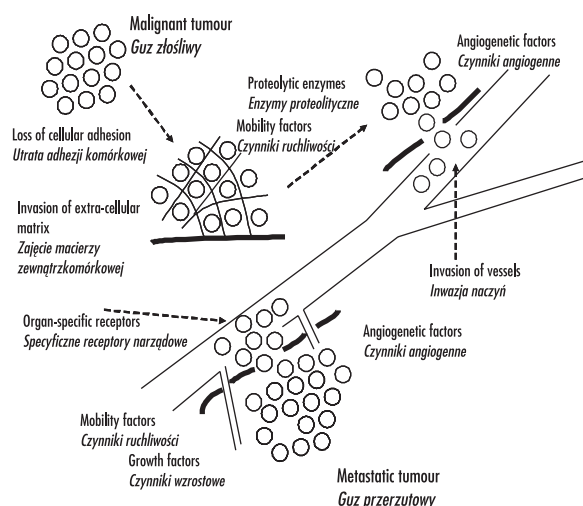


Fig. 1. Multistage process of metastasis of epithelial ovarian cancer (acc. to Beavon⁽¹³⁾, own modification)

Rys. 1. Wielostopniowy proces metastazy nabłonkowego raka jajnika (według Beavon⁽¹³⁾ w modyfikacji własnej)

tions in intercellular adhesion⁽⁸⁾. There are relatively few reports concerning changes in these molecules associated with tumour progression. In the study discussed below, Imai et al.⁽¹¹⁾ analyzed immunohistochemically the expression of cadherin E and catenins α , β and γ in 77 cases of ovarian cancer. Expression of these molecules has been compared by juxtaposing them in 26 pairs of primary and metastatic ovarian cancer. Positive expression of cadherin E was found in 75 out of 77 patients (97%), that of α -catenin in 63 cases (82%), β -catenin in 71 cases (92%) and γ -catenin in 57 cases (74%). Significant decrease of expression of cadherin E and of catenins α , β and γ has been observed particularly in the 3rd and 4th clinical stages. Results obtained suggest, that expression of the cadherin – catenin complex decreases with progressing clinical stage of ovarian cancer. Furthermore it was observed, that expression of this complex increases in the case of peritoneal dissemination of the neoplasm, indicating its re-expression associated with tumour invasion of peritoneal surface. Based on an analysis of their 154 cases of epithelial ovarian tumours, Faleiro-Rodriguez et al.⁽¹²⁾ noticed, that in far-advanced ovarian cancer the expression of cadherin E significantly correlates with histological grade of tumour ($p=0.001$). On the other hand, expression of catenin β significantly correlates with histological type ($p=0.005$) and tumour differentiation ($p=0.025$). It was demonstrated, that aggressive behavioural profile of serous ovarian cancer is associated with decreased expression of immunohistochemical pattern of catenin β . It is also reflected in loss of differentiation and serous features of the tumour⁽¹²⁾. It would thus appear, that loss of intracellular contacts resulting from decreased amount of cadherins, creates favorable conditions for invasion of tumour cells, enabling their migration. Beavon⁽¹³⁾ points out close correlation of cadherins E with hypoxia of tumour cells, as the trigger factor initiating activation of this process. Trying to elucidate the prognostic role of cadherin E and catenins β and γ , as well as their correlation with CD44 in epithelial ovarian cancer, Voutilainen et al.⁽¹⁴⁾ analyzed 305 cases of primary ovarian cancer and 44 cases of metastases thereof. They noticed a good correlation between nuclear catenin β and CD44, indicating that catenin β may regulate the process of transcription of CD44 in epithelial ovarian cancer cells. The system cadherin E – catenins is undoubtedly associated with prognosis, but it appears that classic clinical-pathological factors have greater prognostic value and correlate better with survival^(1,14).

LOCAL MECHANISMS

Ovarian cancer cells are naturally predisposed to invasive spread throughout the peritoneal cavity. Ovarian cancer cells feature high levels of β_1 -integrins, which are responsible for adhesion and migration of ovarian cancer cells. Laminins promote both cellular proliferation

Z uwagi na złożoność choroby nowotworowej prawdopodobne jest, że także inne cząsteczki, które są zaangażowane w adhezję, migrację, inwazję, wzrost, proliferację i apoptozę, mogą być włączone w ten proces. Udowodniono, że CD44 i $\beta 1$ podjednostka integryny odgrywa podstawową rolę w adhezji i migracji komórek raka jajnika w mezotelium i macierzy okołokomórkowej⁽⁹⁾. Następnie komórki raka jajnika mogą migrować przez warstwę komórek mezotelium i penetrują błonę podstawną oraz dokonują inwazji tkanek dając przerzut. Zaobserwowano, że kiedy komórki raka jajnika nie mogą oddziaływać na siebie wzajemnie lub z komórkami mezotelium oraz ECM, rozprzestrzenianie komórek nowotworowych w warunkach *in vivo* jest niemożliwe⁽⁶⁾.

Dalsze badanie zmierzają w stronę prób wyjaśnienia relacji pomiędzy przyleganiem komórek rakowych a działaniem rozmaitych cząsteczek i ich ligand w postępie choroby nowotworowej. W przypadku ich identyfikacji powinno być możliwe wyizolowanie czynników mogących zahamować ich działanie i pełniących tym samym funkcję leku⁽¹⁰⁾.

RODZINA KADHERYN

E-kadheryna oraz kateniny odgrywają kluczową rolę w adhezji komórki i jej ruchliwości. Klasyczne kadheryny N-, E-, i P- tworzą tzw. połączenia przylegające (*adherence junctions*) i pełnią różne funkcje w adhezji między komórkami⁽⁸⁾. Niewiele jest doniesień na temat zmian tych cząsteczek w miarę postępu raka jajnika. W omawianym poniżej badaniu Imai T. i wsp.⁽¹¹⁾ analizowali immunohistochemicznie ekspresję E-kadheryny oraz α -, β - i γ -katenuin w 77 przypadkach raka jajnika. Porównano ekspresję tych cząstek poprzez zestawienie ich w 26 parach pierwotnego i przerzutowego raka jajnika. Na 77 badanych pierwotnych guzów stwierdzono pozytywną ekspresję E-kadheryny w 75 (97%) przypadkach oraz α -katenuiny w 63 (82%), β -katenuiny w 71 (92%) i γ -katenuiny w 57 (74%) przypadkach. Znaczący spadek ekspresji E-kadheryny oraz α -, β - i γ -katenuin zaobserwowano szczególnie w III i IV stadium zaawansowania klinicznego. Uzyskane wyniki sugerują, że ekspresja kompleksu kadheryna – kateniny obniża się wraz z postępującym stopniem klinicznym raka jajnika. Równocześnie zauważono, iż ekspresja tego układu zwiększa się w przypadku rozsiewu procesu nowotworowego w otrzewnej, co wskazuje na jego reekspresję w miarę inwazji procesu nowotworowego na powierzchni otrzewnej. Faleiro-Rodrigues i wsp.⁽¹²⁾ stwierdzili, analizując 154 przypadki nabłonkowych guzów jajnika, że zaawansowanych w guzach jajnika ekspresja E-kadheryny odpowiada istotnie statystycznie stopniowi histologicznemu ($p=0,001$), natomiast ekspresja β -katenuiny jest istotnie związana z typem histologicznym ($p=0,005$) oraz zróżnicowaniem guza ($p=0,025$). Udowodniono, że zachowanie agresywnego profilu surowiczego raka jajnika wiąże się ze

and migration⁽¹⁵⁾. In ovarian cancer patients, the level of lysophosphatidic acid (LPA) is elevated both in blood and in peritoneal fluid. LPA stimulates proliferation of ovarian cancer cells and probably is an autocrine growth factor. LPA is in fact a group of bioactive lysophospholipids, which participate in many cellular processes and systems. Three LPA receptors have been identified, whereby LPA activates three main classes of proteins G: Gi, Gq and G12/13. LPA stimulates proliferation of ovarian cancer cells and protects them against apoptosis. Furthermore, LPA induces the production of pro-angiogenic factors, e.g. interleukin 8 (IL-8) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian cancer cells⁽¹⁶⁾. Nevertheless, signal pathways and mechanisms of LPA-dependant migration of neoplastic cells still remain poorly understood. It is suggested, that there might exist a new autocrine feed-back loop, whereby LPA would promote migration of ovarian cancer cells, this being an important step towards formation of metastases and peritoneal invasion. It appears, that laminins (and not other proteins of the extracellular matrix) initiate the production of LPA in ovarian cancer cells. Antibodies neutralizing β_1 -integrins and inhibitor of the calcium-dependent phospholipase A2, the haloenol lactone suicide substrate (HELSS) block both production of LPA and haptotactic activity of laminins. Addition of exogenous LPA restores laminin-dependent migration ability of ovarian cancer cells. Next, specific LPA receptor (LPA₃) turned out to be indispensable in the mechanism of chemotactic activity of LPA. On the other hand, LPA₂ is necessary for cellular migration and activation of phosphatidylinositol-3 kinase-dependent (PI3K). In conclusion, it appears that LPA mediates laminin-dependent migration of neoplastic cells⁽¹⁵⁾.

GENES AND FORMATION OF METASTASES

Since cells separate from the primary tumour, then they must invade the main stroma in order to form metastases. Degradation of basic component of blood vessels, particularly that of collagen type IV, is the key step towards formation of metastases. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 usually are associated with greater invasivity of ovarian cancer. Enhanced expression of these metalloproteinases is seen in the presence of cancer cells in the peritoneal fluid, primary focus or metastatic cancer, while low values thereof is seen in normal ovarian epithelial cells⁽¹⁷⁾. Secretion of MMP is also influenced by stress hormones, e.g. cortisone, norepinephrine and epinephrine, thus explaining an influence of behavioural factors on the progression of neoplastic disease and patients' survival⁽¹⁸⁾. Claudins are proteins, which belong to a large family of proteins responsible for structural and functional integrity of membranes. Claudin 3 and Claudin 4 are over-expressed in ovarian

zmniejszeniem ekspresji wzoru immunohistochemicznego β -kateniny. Ma to także swój wyraz w utracie zróżnicowania guza i surowiczym charakterze raka⁽¹²⁾. Wydaje się więc, że utrata wewnątrzkomórkowych kontaktów, będąca efektem zmniejszenia ilości kadheryn, wytwarza korzystne warunki dla inwazji komórek nowotworowych, umożliwiając im migrację. Beavon⁽¹³⁾ wskazuje na ścisły związek E-kadheryn z procesem hipoksji komórek guza jako czynnik inicjujący aktywację tego układu. Aby wyjaśnić prognostyczną rolę E-kadheryny, β - i γ -kateniny oraz ich powiązanie z CD44 w nabłonkowym raku jajnika, Voutilainen i wsp.⁽¹⁴⁾ przeanalizowali 305 przypadków pierwotnego raka jajnika oraz ich 44 przerzuty. Wykazano w tym badaniu dobrą korelację między jądrową β -kateniną a CD44, wskazując, że β -katenina może regulować transkrypcję CD44 w komórkach nabłonkowego raka jajnika. System E-kadheryna – kateniny ma niewątpliwie wiąże się z rokowaniem, ale wydaje się, że klasyczne czynniki kliniczno-patologiczne mają większą wartość predykcyjną i związek z przeżyciem⁽¹⁴⁾.

MECHANIZMY LOKALNE

Komórki guza jajnika posiadają z natury silną zdolność do inwazyjnego rozsiewania się w obrębie otrzewnej. Wykazują wysokie poziomy β_1 -integryn, które funkcjonalnie odpowiadają za ich przyleganie i migrację. Lamininy promują zarówno proliferację, jak i migrację komórek raka jajnika⁽¹⁵⁾. Stężenie kwasu lizofosfatydowego LPA (*lysophosphatidic acid*) jest zwiększone we krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek z nowotworem jajnika. LPA stymuluje proliferację komórek raka jajnika i prawdopodobnie jest autokrynnym czynnikiem wzrostu. LPA jest grupą bioaktywnych lizofosfolipidów, które uczestniczą w rozmaitych procesach systemów komórkowych. Zidentyfikowano 3 receptory dla LPA, którymi aktywuje on trzy główne klasy białek G: Gi, Gq i G12/13. LPA pobudza rozmnażanie komórek raka jajnika i chroni je przed apoptozą. Dodatkowo indukuje produkcję czynników proangiogennych, takich jak interleukiny 8 (IL-8) i VEGF (*vascular endothelial growth factor*) w komórkach nowotworu⁽¹⁶⁾. Jednakże ścieżki sygnałowe oraz mechanizmy zależnej od LPA migracji komórki nowotworowej są nadal niejasne. Sugeruje się istnienie nowego autokrynnego układu sprzężenia zwrotnego, w którym LPA promuje migrację komórek raka jajnika, co jest istotnym wstępem do przerzutowania i naciekania otrzewnej. Wydaje się więc, że lamininy, a nie inne białka macierzy zewnątrzkomórkowej, wyzwalają produkcję LPA w komórkach tego nowotworu. Neutralizujące przeciwciała anty- β_1 -integryny i inhibitor zależnej od wapnia fosfolipazy A2, HELSS (*haloenol lactone suicide substrate*), blokują zarówno produkcję LPA, jak i działanie laminin. Dodanie egzogenego LPA przywraca migracyjną zdolność komórek raka jajnika zależną od laminin. Następnie LPA₃, specyficzny receptor LPA, okazuje się być niezbęd-

cancer. This enhanced expression correlates well with elevated level of MMP-2. We may thus suppose, that claudins may promote tumour growth, as well as enhance invasiveness and survival of tumour cells⁽¹⁹⁾. VEGF shows an increased expression in primary and metastatic ovarian cancer. Studies of influence of VEGF on MMP-dependent invasion and migration of neoplastic cells in matrix demonstrated, that VEGF may regulate invasion and migration in epithelial ovarian cancer by VEGF receptors (VEGFR) 1 and 2, which also mediate secretion and activation of metalloproteinases 2, 7 and 9⁽²⁰⁾. In spite of much effort aiming at improvement of early detection and management of ovarian cancer, metastatic recurrence still remains the main challenge of chemotherapy. The axis endothelin A receptor – endothelin-1 (ETAR-ET1) play a key role in ovarian cancer by promoting carcinogenesis. This axis is also fundamental in autocrine pathways of epithelial-mesenchymal translocations in ovarian cancer cells associated with fibroblastic activity and development of invasive phenotype of tumour. The ETAR-ET1 axis is down-regulated by E-cadherin, resulting in an increased level of β -catenins, Snail and other mesenchymal markers, thus abolishing the suppression of promoters by E-cadherin. On the other hand, activation of the endothelin A receptor (ETAR) by endothelin-1 results in (1) blockade of a pathway modifying subsequent activity of integrin-dependent glycogen synthetase kinase-3 β (GSK-3 β), integrin-linked kinase (ILK) and (2) stabilization of N-cadherin and β -catenins and regulation of EMT-dependent transcription programs. Blocking by specific antagonist or reduction of RNA encoding ETAR results in inhibition of autocrine-mediated cellular invasion, this being an interesting target for therapeutic intervention⁽⁴⁾.

Decreased expression of E-cadherin with simultaneous increase of activity of collagenase IV enhances separation of cells and invasion. Therefore, the correlation E-cadherin: collagenase IV is a highly significant prognostic factor for survival in ovarian cancer, as was demonstrated by Herrera et al.⁽³⁾, when studying the expression of genes implicated in the process of formation of metastases, e.g. VEGF/VPF (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), E-cadherin, collagenase IV, MMP-2, MMP-9 and interleukin-8 (IL-8). The role of cadherins in the process of transformation of cortical ovarian epithelium from benign to malignant was confirmed by studies of expression of gene transcription performed using the technique of oligonucleotide micromatrix. Expression of the N-cadherin and cadherin-11 genes appears to predominate in normal ovarian epithelium, is significantly elevated in normal epithelium and in borderline low-potential tumours as compared with adenocarcinomas. Finding a moderate level of expression of cadherins in a group of patients

nym w mechanizmie chemotaktycznej aktywności LPA. Z kolei cytozolowy LPA₃ jest konieczny dla migracji komórki i aktywacji PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase-dependent*). Wydaje się, że LPA pośredniczy w zależnej od laminin migracji komórki nowotworowej⁽¹⁵⁾.

GENY A TWORZENIE PRZERZUTÓW

Skoro komórki odłączają się od pierwotnego guza, to muszą dokonać inwazji głównego zrębu, aby mogło dojść do powstania przerzutu. Degradacja podstawowego komponentu naczyń krwionośnych, a zwłaszcza kolagenu typu IV, jest podstawowym krokiem w procesie tworzenia przerzutów. Metaloproteinazy macierzy MMP-2 i MMP-9 (*matrix metalloproteinase*) zwykle łączone są z większą inwazyjnością raka jajnika. Ich zwiększona ekspresja występuje w przypadku komórek raka pochodzących z płynu otrzewnowego, pierwotnego ogniska lub guza przerzutowego, natomiast niskie wartości ich obserwuje się w komórkach nabłonka prawidłowego jajnika⁽¹⁷⁾. Na wydzielanie MMP mają także wpływ hormony stresu, takie jak kortyzon, norepinefryna i epinefryna, co ma związek z wpływem czynników behawioralnych na progresję choroby nowotworowej i przeżycie pacjentów⁽¹⁸⁾. Klaudyny są to białka tworzące dużą rodzinę protein odpowiedzialnych za integralność błony i jej funkcję. Klaudyna-3 oraz klaudyna-4 wykazują wysoką ekspresję w raku jajnika. I ta zwiększona ekspresja dobrze koreluje z podwyższonym stężeniem MMP-2. Należy przypuszczać, że klaudyny mogą promować wzrost guza oraz zwiększając inwazję i przeżycie komórek guza⁽¹⁹⁾. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wykazuje zwiększoną ekspresję w pierwotnym i przerzutowym guzie jajnika. Badając wpływ VEGF na inwazję i migrację komórek nowotworowych w macierzy zależnej od metaloproteinaz, stwierdzono, że może on regulować inwazję i migrację w nabłonkowym raku jajnika poprzez VEGFR-1 lub VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor*), który jest mediatorem sekrecji i aktywacji metaloproteinaz 2, 7 i 9⁽²⁰⁾.

Mimo znacznych wysiłków, by poprawić wczesne wykrywanie oraz postępowanie w raku jajnika, nawroty przerzutowe wciąż pozostają głównym wyzwaniem w chemioterapii. Oś receptoru endoteliny A (ET(A)R) – endotelina-1 (ET-1) poprzez promowanie karcynogenezy odgrywa kluczową rolę w raku jajnika. Oś ta ma także podstawowe znaczenie w autokrynych ścieżkach przemieszczeń nabłonkowo-mezenchymalnych w komórkach guza jajnika, związanych z działaniem fibroblastów i powstaniem inwazyjnego fenotypu nowotworu. Oś receptoru endoteliny A – endotelina-1 jest odwrotnie regulowana przez E-cadherinę, co powoduje zwiększenie stężenia β -katenin, Snailu, czynnika transkrypcyjnego oraz innych markerów mezenchymalnych, znosząc tym samym supresję promotorów E-cadheriny. Z kolei aktywacja receptora endoteliny A przez endotelinę-1 wywołuje po pierwsze

with borderline tumours and adenomas, as compared with a group of adenocarcinomas confirms filogenetic role of adhesion molecules in malignant transformation of tumours⁽²¹⁾. As cadherins are calcium-dependent adhesion molecules, increased dietary calcium intake may contribute to reduce the risk of development of ovarian cancer. This fact is also interesting because calcium transport and calcium channel may influence the product of this gene. In this way, function of cadherin may be modulated by altered availability of calcium, what further may have an impact on potential malignant transformation of the tumour. However, a large cohort-based study published in 2006, including 2132 ovarian cancer cases, did not confirm a correlation of ovarian cancer and dietary calcium intake⁽²²⁾.

FOCAL ADHESION KINASE (FAK) – THE KEY TO CELLULAR ADHESION

The principal issue concerning biology of normal and neoplastic cells is an answer to the question, how membrane receptors pass on an extracellular signal to cellular interior in order to modulate cellular adhesion and thus its mobility. Focal adhesion kinase (FAK) is this fundamental component, which, being subjected to the influence of many stimuli and functions, has the properties of a biological sensor or integrator controlling cell mobility. Multi-directional and variegated molecular connections of FAK may influence the cytoskeleton, structure of cell adhesion sites and membranous outgrowths regulating cell movement⁽²³⁾.

Protein kinase FAK has been identified as a substrate of viral Src and as a highly phosphorylated tyrosine protein is present at sites of focal cellular adhesion. Since then, FAK play a key role in migration of both normal and neoplastic cells, negatively-dependent on growth factors and integrin receptors. Appearance of the signal complex FAK-Src is the first necessary and initial step resulting in maximal activation of FAK, cellular migration and formation of metastases⁽²³⁾. This kinase, in order to be able to activate inter-molecular and intra-molecular mechanisms of cell movement, requires promotion on the side of various Src-similar contact proteins SH2 and SH3. These proteins enable FAK to initiate several pathways, such as the MAPK cascade (mitogen-activated protein kinase) or small GTP-ases, such as Rac and Rho. Phosphorylation from the C-ended domain of FAK may control location of focal contact besides binding with paxillin, a protein responsible for cytoskeleton binding⁽²⁴⁾.

Functionally, FAK is a signal protein increasing and accelerating maturation of sites of adhesion. Activity of FAK-Src kinase contributes to these events by promoting phosphorylation with phosphatidil-inositol-lipids. FAK-Src has also a role in the distribution of local adhesion, partly by activation of intracellular proteases, e.g.

zahamowanie ścieżki, w której modyfikuje się działanie kinazy-3 beta-syntetazy glikogenu (GSK-3 β) kinazą zależną od integryny ILK (*integrin-linked kinase*), a po drugiej stabilizację Nasilu oraz β -katenin, a także regulację programów transkrypcyjnych zależnych od EMT. Blokiwanie specyficznym antagonistą lub redukcja RNA receptora endoteliny A hamuje komórkową inwazję na drodze autokrynnej, co może być interesującym miejscem działania terapeutycznego⁽⁴⁾.

Spadek ekspresji E-kadheryny z jednoczesnym wzrostem aktywności kolagenazy IV wzmagają oddzielenie komórek i inwazję. Dlatego stosunek E-kadheryny i kolagenazy IV jest znaczącym wskaźnikiem prognozującym przeżycie w raku jajnika, co udowodnili Herrera i wsp.⁽³⁾, badając ekspresję niektórych genów zaangażowanych w proces tworzenia przerzutów, takich jak: VEGF/VPF (*vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), E-kadheryny, kolagenazy typu IV, metaloproteinazy macierzy MMP-2 i MMP-9 i interleukiny 8 (IL-8). Potwierdzeniem udziału kadheryn w procesie przemiany nabłonka powierzchni jajnika ze zmiany łagodnej w złośliwą są badania ekspresji transkryptów genów wykonane techniką mikromacierzy oligonukleotydowej. Ekspresja genu N-kadheryny oraz kadheryny-11 wydaje się być dominująca w prawidłowym nabłonku jajnika, znacząco wyższa w normalnym nabłonku oraz w guzach granicznych o niskim potencjale w porównaniu z gruczolakorakami. Stwierdzenie średnich wartości ekspresji kadheryn w grupie pacjentek z guzami granicznymi i gruczolakami w porównaniu z grupą gruczolakoraka potwierdza filogenetyczny udział cząstek adhezyjnych w przemianie złośliwej guza⁽²¹⁾. Ponieważ kadheryny są cząsteczkami adhezyjnymi zależnymi od wapnia, być może zwiększenie ilości tego pierwiastka w diecie może wpłynąć na obniżenie ryzyka rozwoju raka jajnika. Fakt ten jest także interesujący z tego względu, że transport wapnia oraz kanał wapniowy mogą wpływać na produkt genu. W ten sposób może być modulowana funkcjonalność kadheryny poprzez zmianę dostępności wapnia, co może mieć wpływ na potencjalną przemianę złośliwą guza. Jednakże duże kohortowe badanie opublikowane w 2006, roku obejmujące 2132 raków, jajnika nie potwierdza związku między wystąpieniem tego nowotworu, a zawartością wapnia w diecie⁽²²⁾.

FAK – KLUCZ ADHEZJI KOMÓRKOWEJ

Głównym zagadnieniem dotyczącym biologii komórki prawidłowej, jak również nowotworowo zmienionej jest odpowiedź na pytanie, jak receptory błonowe przekazują zewnątrzkomórkowy sygnał do wnętrza komórki, by modulować jej adhezję i tym samym ruchliwość. Kinaza kontaktów adhezyjnych FAK (*focal adhesion kinase*) jest tym zasadniczym składnikiem, który, poprzez liczne bodźce i funkcje, ma cechę czujnika biologiczne-

calpain and extracellular MMPs. Recent studies associate FAK-Src with catherin-dependent signal pathways conditioning cell-cell contact⁽²⁵⁾.

In migrating cells, coordinated alteration of actins and microtubular structures is regulated, apart of FAK, also by a family of small proteins Rho. FAK is involved in phosphorylation of GAP (GTPase-activating proteins) and GEFs (guanine nucleotide-exchange factors) for Rho and N-WASP (neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein) in order to gain control over cross-links with actin. The FAK receptor, the so-called "receptor-proximal position" enhances the activity of FAK as an integrator of biochemical signals and mechanical forces, which are involved in cellular movement⁽²⁶⁾. An exceptional position of FAK indicates its ability to dynamically regulate of cellular cytoskeleton and thereby to influence its mobility.

At this point, the question arises: how do the above mentioned mechanisms act in ovarian cancer cells?

To-date, few studies have been published providing data on functional role of FAK in ovarian migration associated with cancer and invasion. Most studies concern ovarian cancer cell lines, but these studies focus mainly on detection of FAK modulators in the *in vitro* setting. On the other hand, immunohistochemical studies by Sood et al.⁽¹⁹⁾ showed low expression of FAK in cells of both normal ovarian epithelium and in epithelium originating from benign tumours. In a group of patients with invasive form of ovarian cancer, FAK over-expression was noticed in 68% of cases. Enhanced expression of this kinase is significantly correlated with higher clinical stage, presence of lymph node metastases and distant metastases ($p < 0.05$). FAK over-expression is also associated with poor overall survival of patients with advanced ovarian cancer. Multivariate analysis revealed, that FAK over-expression and presence of tumour over 1 cm in diameter is an independent prognostic factor. Authors of this paper conclude, that based on their studies it appears, that in most invasive forms of ovarian cancer, FAK plays a key role in cellular migration and invasion. Therefore, FAK and associated therewith signal pathways may become an important therapeutic target in the treatment of malignant ovarian tumours⁽¹⁹⁾.

CONCLUSIONS

Based on a review of available literature we may state, that the process of formation of metastases of epithelial ovarian cancer may be regulated by several gene products^(1,5,8,13,26). These products include:

1. receptors of the cell – cell and cell – ECM types,
2. proteolytic enzymes facilitating invasion of basal membrane, vessel walls and organs,
3. mobility factors, enabling migration to tissues,
4. receptors mediating invasion to a specific organ,

go albo integratora kontrolującego komórkową ruchliwość. Wielokierunkowe i zróżnicowane połączenia molekularne poprzez FAK mogą wpływać na cytoskielet, struktury miejsc adhezji komórki i wypustki błony regulujące ruch komórki⁽²³⁾.

Kinaza białkowa FAK została zidentyfikowana jako substrat dla wirusowego Src i jako wysoce ufosforylowane białko tyrozynowe obecne jest w miejscach ogniskowego przylegania komórki. Od tej pory FAK odgrywa kluczową rolę w migracji komórek normalnych oraz nowotworowych ujemnie zależnych od czynników wzrostu oraz receptorów integryn. Powstanie sygnałowego kompleksu FAK-Src jest pierwszym inicjującym oraz koniecznym krokiem do maksymalnej aktywacji FAK i migracji komórki oraz przerzutowania⁽²³⁾. Kinaza ta, aby mogła uruchomić międzymolekularne oraz wewnątrz-molekularne mechanizmy ruchu komórki, wymaga promocji ze strony różnych białek kontaktowych Src-podobnych, SH2 oraz SH3. Te białka pozwalają FAK na uaktywnienie kilku szlaków, takich jak kaskada MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) czy też małych GTPaz, jak Rac i Rho. Fosforylacja z C-końcowej domeny FAK może kontrolować lokalizację ogniskowego kontaktu obok wiązania z paksyliną, białkiem odpowiedzialnym za wiązanie cytoskieletu⁽²⁴⁾.

FAK funkcjonalnie jest sygnałowym białkiem zwiększającym i przyspieszającym dojrzewanie miejscowego przylegania. Działanie kinazy FAK-Src przyczynia się do tych procesów promowaniem poprzez fosforylację z fosfatydyloinozitololipidami. FAK-Src pełni również funkcję w rozkładzie miejscowego przylegania częściowo przez uruchamianie wewnątrzkomórkowych proteaz, takich jak kalpaina i zewnątrzkomórkowe metaloproteinazy. Nowe badania łączą również FAK-Src ze ścieżkami sygnałowymi warunkującymi kontakt komórka – komórka zależnymi od kadheryn⁽²⁵⁾.

W migrujących komórkach skoordynowane zmiany aktywności i struktur mikrotubularnych są regulowane obok FAK przez rodzinę małych białek Rho. FAK angażuje się w fosforylację GAP (*GTPase-activating proteins*) i GEFs (*guanine nucleotide-exchange factors*) dla Rho oraz N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*), aby móc uzyskać kontrolę nad połączeniami krzyżowymi z aktyniną. Receptor FAK, tzw. *receptor-proximal position*, ułatwia działanie kinazy kontaktów adhezyjnych jako integratora biochemicznych sygnałów oraz mechanicznych sił, które są zaangażowane w ruch komórki⁽²⁶⁾. Wyjątkowa pozycja FAK wskazuje na jego możliwości dynamicznego regulowania cytoskieletu komórki i tym samym wpływu na jej ruchliwość.

Pojawia się w tym miejscu pytanie, jak wymienione powyżej mechanizmy działają w komórkach raka jajnika? Do tej pory opublikowano stosunkowo mało danych poświęconych funkcjonalnej roli FAK w jajnikowej migracji związanej z rakiem oraz inwazji. Większość badań dotyczy wprawdzie jajnikowych rakowych linii komór-

5. growth factors necessary for maintenance of microcolonies in the secondary tumour,
6. angiogenetic factors promoting neovascularisation of metastases, providing adequate nutrition, removal of metabolic waste-products and further spread by hematogenous route (figure 1).

The basic prerequisite for formation of a metastasis is disturbance of the mechanism of cellular adhesion, resulting in alteration of cell – cell and cell – ECM adhesion. This mechanism is crucial in the spread of ovarian cancer throughout the abdominal cavity.

BIBLIOGRAPHY:

PISMIENICTWO:

1. Chi D.S., Liao J.B., Leon L.F. i wsp.: Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2001; 82: 532-537.
2. Auersperg N., Wong A.S., Choi K.C. i wsp.: Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr. Rev.* 2001; 22: 255-288.
3. Herrera C.A., Xu L., Bucana C.D. i wsp.: Expression of metastasis-related genes in human epithelial ovarian tumours. *Int. J. Oncol.* 2002; 20: 5-13.
4. Rosano L., Spinella F., Di Castro V. i wsp.: Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 11649-11657.
5. Ahmed N., Riley C., Rice G., Quinn M.: Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* 2005; 22: 391-402.
6. Skubitz A.P.: Adhesion molecules. *Cancer Treat. Res.* 2002; 107: 305-329.
7. Heinzelmann-Schwarz V.A., Gardiner-Garden M., Henshall S.M. i wsp.: Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 4427-4436.
8. Okegawa T., Pong R.C., Li Y., Hsieh J.T.: The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim. Pol.* 2004; 51: 445-457.
9. Schiffenbauer Y.S., Meir G., Mao M. i wsp.: Gonadotropin stimulation of MLS human epithelial ovarian carcinoma cells augments cell adhesion mediated by CD44 and by alpha (v)-integrin. *Gynecol. Oncol.* 2002; 84: 296-302.
10. Schlereth B., Fichtner I., Lorenczewski G. i wsp.: Eradication of tumours from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. *Cancer Res.* 2005; 65: 2882-2889.
11. Imai T., Horiuchi A., Shiozawa T. i wsp.: Elevated expression of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenins in metastatic lesions compared with primary epithelial ovarian carcinomas. *Hum. Pathol.* 2004; 35: 1469-1476.
12. Faleiro-Rodrigues C., Macedo-Pinto I.M., Maia S.S. i wsp.: Biological relevance of E-cadherin-catenin complex proteins in primary epithelial ovarian tumours. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2005; 60: 75-83.

Dalszy ciąg piśmiennictwa znajduje się na stronie 185.

kowych, ale skupiają one się głównie na poszukiwaniu modulatorów FAK w warunkach *in vitro*. Natomiast immunohistochemiczne wyniki badań Sood i wsp.⁽¹⁹⁾ wykazały niewielką ekspresję FAK w komórkach nabłonka jajnika prawidłowego i pochodzącego z guzów łagodnych. W grupie pacjentek z inwazyjną postacią raka jajnika w 68% przypadków zaobserwowano nadekspresję FAK. Zwiększona ekspresja tej kinazy wiąże się istotnie statystycznie z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego guza, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i obecnością odległej metastazy ($p < 0,05$). Nadekspresja FAK ma również związek z krótszym ogólnym przeżyciem chorych z zaawansowanym rakiem jajnika. Drogą analizy wieloczynnikowej ustalono, że nadekspresja FAK oraz obecność guza o średnicy > 1 cm są niezależnymi wskaźnikami prognostycznymi. Autorzy wspomnianej pracy w konkluzji wskazują, że na podstawie ich badań można sądzić, iż FAK w najbardziej inwazyjnym raku jajnika odgrywa kluczową rolę w migracji i inwazji komórkowej. Z tego względu FAK oraz związane z nim ścieżki sygnałowe mogą być ważnym leczniczym celem w nowotworach złośliwych jajnika⁽¹⁹⁾.

WNIOSKI

Na podstawie przeglądu dostępnej literatury można stwierdzić, że proces przerzutowania nabłonkowego raka jajnika może być regulowany poprzez rozmaite produkty genów^(1,5,8,13,26). Produkty te zawierają między innymi:

1. receptory typu komórka – komórka i komórka – macierz zewnątrzkomórkowa,
2. enzymy proteolityczne ułatwiające inwazję błony podstawnej, łożyska naczyniowego oraz narządów,
3. czynniki ruchliwości, które pozwalają na migrację do tkanek,
4. receptory pośredniczące w inwazji do określonego narządu,
5. czynniki wzrostu konieczne dla utrzymania mikrokolonii we wtórnym guzie,
6. czynniki angiogenne wywołujące neowaskularyzację przerzutu, pozwalające następnie na odpowiednie odżywienie, usunięcie produktów metabolicznych oraz rozsiew drogą krwiopochodną dalszych komórek przerzutowych (rys. 1).

Podstawowym wstępnym warunkiem powstania przerzutu jest zaburzenie mechanizmu adhezji komórki, co w konsekwencji indukuje zmiany w przyleganiu między komórkami i komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową. Mechanizm ten ma podstawowe znaczenie w szerzeniu się raka jajnika w obrębie jamy brzusznej.