

Maspina: nowy cel terapii przeciwnowotworowej

Katarzyna Karwasik-Kajszczyk^{1, 3}, Konrad Futyma¹, Tomasz Kubiakowski¹,
Jacek Wojciorowski¹, Henryk Wiktor^{2, 3}

Białko maspina (Maspin – Mammary serine protease inhibitor) należy do nadrodziny serpin- białek inhibitorów enzymów proteolitycznych. Maspina została wykryta w wielu prawidłowych tkankach (gruczoł sutkowy, jajniki) oraz w różnego rodzaju tkankach nowotworowych (nowotwory głowy i szyi, rak prostaty) i jest uznawana za jeden z genów supresorowych, ze względu na zdolności hamowania wzrostu guza nowotworowego, zmniejszania naciekania komórek rakowych oraz ograniczania powstawania przerzutów. Wiele przeprowadzonych badań sugeruje, że obecność maspiny może hamować migrację i proliferację komórek nowotworowych oraz nasilać proces apoptozy komórek nowotworowych. W licznych badaniach maspina przedstawiana jest jako potencjalny marker nowotworowy i podkreślane są możliwości jej stosowania w terapii przeciwnowotworowej.

Maspin: future target for cancer therapy

Mammary serine protease inhibitor (Maspin) is a member of the superfamily of the serpins - protease inhibitors. Maspin was discovered in many different normal tissues (mammary gland, ovaries) and different kinds of cancer tissues (neck carcinoma, prostate cancer). It is considered to be a tumor suppressor gene. Maspin has the ability to inhibit tumor growth, reduce the infiltration of cancer cells and metastasis. Many studies show that the presence of maspin can inhibit tumor cells migration and proliferation and induce the apoptosis of cancer cells. Several studies have reported, that maspin may be a reliable cancer marker and have shown the possibility of using maspin in future anti-cancer therapy.

Słowa kluczowe: maspina, serpiny, gen supresorowy, onkogeneza, rak piersi

Key words: maspin, the serpins, tumor suppressor gene, oncogenesis, breast cancer

Proces onkogenezy nie może być postrzegany jako prosta zależność przyczynowo-skutkowa. Mechanizm odpowiadający za progresję nowotworu, obejmujący naciekanie tkanek i wytwarzanie przerzutów, przebiega na podłożu rozlicznych zaburzeń i w odpowiedzi na nie. Komórki nowotworowe ulegają różnym procesom, których nie obserwuje się w komórkach zdrowych. Do procesów tych można zaliczyć niekontrolowaną proliferację komórek, protoonkogenezę oraz aktywację lub inaktywację genów supresorowych. Zdolność naciekania tkanek oraz naczyń krwionośnych i limfatycznych lub tworzenia przerzutów jest bezpośrednio związana ze zmianami w ekspresji genów. Czynniki stymulujące proces neowaskularyzacji umożliwiają powstanie sieci naczyń odżywczych, niezbęd-

nych dla powstania i rozrostu guzów nowotworowych. Zablockowanie procesu apoptozy, który w warunkach normalnych prowadzi do eliminacji zmienionych nowotworowo komórek, stanowi kolejny, niezbędny element w rozwoju nowotworu. Różnorodność tych mechanizmów wymaga aktywowania wielu dróg sygnalizowania, które odpowiadają za fenotyp nowotworu. Dzięki badaniom procesów odpowiedzialnych za nowotworzenie, prowadzonych na poziomie molekularnym, udało się wyizolować grupę markerów, które umożliwiają postawienie odpowiedniego rozpoznania. Ekspresja jest zazwyczaj specyficzna dla procesu powstawania guza pierwotnego, ale nie dostarcza danych na temat powstawania przerzutów, zarówno odległych, jak i miejscowych. W chwili obecnej prowadzone są liczne badania *in vitro* i *in vivo* w celu zidentyfikowania markerów specyficznych dla procesu przerzutowania. Za jeden z nich uważa się, charakterystyczny dla sutka, inhibitor proteazy serynowej nazywany maspiną lub serpiną 5. Maspina jest rozpuszczalnym, cytozolemowym białkiem o masie 42 kDa, posiadającym reaktywną C-końcową domenę pętlową serpiny, zlokalizowaną przy końcu -COOH. Domena ta jest homologiem nadrodziny inhibitorów proteazy, nazywanych

¹ Katedra Genetyki Medycznej z Zakładem Genetyki Nowotworów

² Zakład Położnictwa, Ginekologii i Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego Wydziału Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³ Oddział Ginekologii i Położnictwa

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego w Lublinie

ogólnie serpinami. Zaliczamy do nich serpinę końską, ludzki inhibitor elastazy monocytu-neutrofilowej, ludzki inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i typu 2 (PAI-2), ludzki antygen raka płaskokomórkowego, owalbuminę kurzą i alfa-1-chymotrypsynę [1]. Maspina jest Arg-serpiną, która hamuje działanie proteaz trypsynopodobnych. Uważana jest za gen supresorowy klasy II, który zlokalizowany jest na chromosomie 18q21.1. Maspina została po raz pierwszy opisana przez Zou i wsp. w 1994 r. Zidentyfikowano ją na drodze hybrydyzacji subtrakcyjnej cDNA ze zdrowych i zmienionych nowotworowo komórek piersi. Przeprowadzono liczne badania w celu wyjaśnienia i opisanie funkcji maspiny. Stwierdzono jej obecność w wielu różnych zdrowych tkankach w obrębie gruczołu piersiowego, ślinianek, gruczołu krokowego, łożyska, jajników, jelita cienkiego oraz w różnych typach tkanek nowotworowych, jak np. nowotwory głowy i szyi oraz raki trzustki i jajnika. Większość publikacji poświęcono maspinie i jej ekspresji w obrębie tkanek gruczołu piersiowego. Białko występuje w dużych ilościach w tkance nabłonkowej. Ekspresja maspiny jest znamienna w zdrowych tkankach i ulega obniżeniu lub regulacji ze sprzężeniem zwrotnym ujemnym wraz z rozwojem nowotworu w obrębie danej tkanki. Działanie maspiny było przedmiotem wielu doniesień. W pierwszej pracy dotyczącej maspiny, opublikowanej przez Zou i wsp. [1], wspomniano, że transfekcja genu maspiny do komórek raka piersi MDA-MB-435 nie zmieniała zdolności do proliferacji tych komórek w warunkach *in vitro*, ale obniżała ich zdolność do indukowania procesów nowotworzenia i do przerzutowania w organizmach myszy pozbawionych odporności (tzw. „gołych myszy”, ang. *nude mice*). Liczne badania dostarczyły dowodów na to, że maspina odgrywa znaczącą rolę w ograniczaniu wzrostu guza, kontrolowaniu naciekania, a także migracji komórek nowotworowych i proliferacji, tak w tkankach ludzkich, jak i na modelu mysim. Jej ekspresja koreluje ze stopniem zaawansowania choroby i progresją guza. Funkcje supresorowe maspiny w stosunku do guza nowotworowego wynikają z wielu mechanizmów. Saper i wsp. [2] potwierdzili niższą ekspresję maspiny w przypadku naciekających nowotworów piersi. Co więcej, wykazali, że cięcia enzymatyczne w obrębie aktywnego centrum wytłumiają hamujące zdolności maspiny. Zhank i wsp. [3] wykazali, że jeśli w tkance gruczołu piersiowego obecna jest maspina, to na skutek hamowania procesu angiogenezy, zmniejszony jest rozrost guzów i upośledzone ich przerzutowanie. Maspina ogranicza odpowiedź komórek śródbłonna na czynniki stymulujące, takie jak TGF i VEGF oraz obniża zdolność wytwarzania nowych naczyń w obrębie guza nowotworowego. Kolejnym mechanizmem maspiny hamującym angiogenezę jest blokowanie migracji komórek śródbłonna w warunkach *in vitro* i *in vivo*, przedstawione w procesie blokowania neowaskularyzacji rogówki u szczura. Mechanizm ten wynika z obecności reaktywnej pętli serpiny. Efekt hamowania angiogenezy opiera się również na przyleganiu (adherencji) komórek powierzchniowych i macierzy zewnątrzkomórkowej. Maspina wiąże kolagen typu I i II i prezentowana jest na

powierzchni komórek dzięki samym komórkom macierzy [4]. Może również uszkadzać przebieg procesu angiogenezy, zależnej od VEGF, na drodze regulacji zależnej od S-transferazy glutationu (GST), w obronie komórek przed stresem oksydacyjnym [5]. Maspina pozostaje pod kontrolą (białka) p53, które aktywuje promotor maspiny. Białko p53 jest bezpośrednio związane z sekwencją PBS. W komórkach charakteryzujących się ekspresją białka p53, po zadziałaniu czynników cytotoksycznych lub mutagennych, obserwuje się ekspresję maspiny [6]. Zhang i wsp. [7] porównywali ekspresję maspiny z zastosowaniem technik mikromacierzy w tkankach zdrowych i zmienionych nowotworowo i również wykazali, że ekspresja maspiny koreluje odwrotnie z ekspresją białka p53. Sugeruje to, że gen maspiny jest w istocie właściwym punktem działania białka p53. Domann i wsp. [8] odkryli, że fragment promotorowy genu maspiny ulega w nowotworach wytłumieniu na drodze hipermetylacji i kondensacji chromatyny. Mechanizmy molekularne maspiny stanowią nadal przedmiot badań. Pemberton i wsp. [9] wykazali, że maspina różni się strukturalnie od innych serpin i przypomina budową strukturę angiotensynogenu. Zdolność maspiny do hamowania wzrostu guzów nowotworowych jest niezależna od jej wewnętrznej zdolności hamowania proteaz trypsynopodobnych. Wsunęli oni hipotezę, że maspina nie funkcjonuje podobnie do innych inhibitorów, takich jak chymotrypsyna, elastaza, plazmina lub trypsyna. Nie jest również w stanie, w odróżnieniu od wymienionych enzymów, hamować aktywatorów plazminogenu. Przeprowadzono kilka badań z wykorzystaniem linii komórkowych, dzięki którym udało się zademonstrować czynność supresorową maspiny w stosunku do guzów nowotworowych. W 1994 roku Sheng i wsp. [10] dostarczyli pierwszych dowodów na takie działanie maspiny, a mianowicie, że oczyszczone, rekombinowane białka maspiny (rMaspina), wyprodukowane przez komórki eukariotyczne lub prokariotyczne gospodarza, silnie hamują inwazję komórek pochodzących z dwóch linii komórkowych raka piersi, poprzez rekonstruowaną błonę podstawną. W innym doniesieniu [11] wykazano, że rekombinowana maspina blokuje inwazyjność i ruchliwość komórek pochodzących z linii komórek nowotworowych. Zaobserwowano to nie tylko w obrębie jednej linii komórek, ale także w przypadku linii komórkowych raka piersi i raka prostaty. Możliwe, że mechanizm inhibicji zachodzi na drodze zmniejszenia czynności proteolitycznej powierzchni komórek. Maspina wchodzi w interakcję z protezami serowymi na powierzchni komórek i tworzy kompleksy podobne do uPAR/uPA/PAI. A zatem, maspina zmienia stopień adhezji komórka/macierz podczas migracji. Kompleks uPa ulega nadekspresji w naciekających nowotworach i jest związany z progresją nowotworów, ale wykazano, że maspina może łagodzić związaną z niedotlenieniem ekspresję uPA/uPAR. Potwierdza to tezę, że maspina hamuje ruchliwość i inwazyjność komórek nowotworowych [12]. Sefor i wsp. [13] wykazali w swoim badaniu, z wykorzystaniem linii komórkowych raka piersi MDA-MB-435, cechujących się ogromną zdolnością przerzutowania, że dodanie rekombinowanej maspiny

doprowadzało do wysokiej ekspresji integrzyn $\alpha 5$ i $\alpha 3$ na powierzchni komórek oraz zmniejszało ekspresję integrzyn $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 5$ i $\beta 1$. Takie zmiany ekspresji integrzyn odpowiadają za zdolność komórek nowotworowych do naciekania. Również Bailey i wsp. [14] wykazali zależność pomiędzy maspiną a interferonowym czynnikiem regulacyjnym-6 (IRF 6). Ekspresja IRF 6 jest regulowana przez maspinę i koreluje odwrotnie ze stopniem zaawansowania nowotworu. Taka interakcja dwóch wspomnianych białek warunkuje fenotyp komórki, którego utrata może prowadzić do transformacji nowotworowej, co potwierdza zdolność maspiny do wiązania się z innymi białkami.

Fakt, że maspina posiada zdolność hamowania procesów wzrastania, naciekania i przerzutowania nowotworu oraz angiogenezy w obrębie guza i migracji komórek nowotworowych, przemawia za tym, że w przyszłości może stać się ona doskonałym prekursorem leczenia nowotworowego. W wielu badaniach wykazano także, że maspina może być wykorzystywana jako marker nowotworowy.

Dzięki zastosowaniu technik immunohistochemicznych Hojo i wsp. [15] wykazali, że guzy piersi, charakteryzujące się obecnością maspiny, mają słabo wyrażoną zdolność do naciekania oraz są mało inwazyjne i rzadko dają przerzuty do węzłów chłonnych, jak również są słabo unaczynione. Wspomniane badanie było prawdopodobnie pierwszym, w którym wykazano, że obecność maspiny w komórkach mioepitelialnych może osłabić proces powstawania fenotypu nowotworowego. Sabbatini i wsp. [16] badali za pomocą metody RT-PCR obecność mRNA maspiny w krwi obwodowej chorych po mastektomii i chemioterapii, i wykazali, że chemioterapia w dawkach konwencjonalnych wywiera działanie mobilizujące. Po chemioterapii, u pacjentów, obserwowano podwyższoną ekspresję maspiny. Sugeruje to, że stwierdzenie obecności maspiny w krążących komórkach raka piersi może mieć znaczenie prognostyczne. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest stokrotnie bardziej czuła niż metody konwencjonalne, jeśli chodzi o wykrywanie krążących komórek raka oraz przerzutów, aczkolwiek z tego samego powodu może wiązać się ze znacznym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich. Konieczna jest wieloletnia obserwacja w celu wykazania, że metoda z zastosowaniem RT-PCR może być pomocna do określenia maspiny jako białka przydatnego w ocenie rokowania i leczenia. Ekspresja maspiny, oceniana za pomocą RT-PCR, w węzłach chłonnych obwodowych i w przerzutach odległych, nie jest w przypadku raka piersi ani markerem czułym ani specyficznym [17]. Loper-Guerrero i wsp. [18] badali możliwość wykorzystania maspiny, CEA i cytokeratyny jako markerów raka piersi. Badaniu z zastosowaniem metody RT-PCR i technik immunocytochemicznych poddano produkty leukaferezy, uzyskane od chorych na raka piersi w stadium II-III i stwierdzono, że maspina jest, w porównaniu z CEA, markerem niespecyficznym i daje do 25% wyników fałszywie dodatnich. Dane te sugerują, że metoda RT-PCR cechuje się wysoką specyficznością w zakresie stwierdzania obecności maspiny. Mass i wsp. [19] stwierdzili obecność ekspresji maspiny w raku piersi

przy zastosowaniu warunków RT-PCR i uznali, że jej ekspresja nie koreluje z jakimikolwiek czynnikami rokowniczymi. Jednakże przeżycie bez cech wznowy wykazywało silną korelację ze stopniem ekspresji maspiny. We wspomnianym badaniu, 75% chorych (6 spośród 8) z przerzutami odległymi w węzłach chłonnych, płucach, wątrobie, kościach i opłucnej (które pojawiły się w ciągu trzech lat od rozpoznania choroby) nie wykazywało jakiegokolwiek ekspresji maspiny. Sugeruje to, że obecność transkryptów maspiny koreluje z prognozowanym przeżyciem chorych na nowotwory i prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów odległych. Chociaż maspina nie jest pewnym markerem i jej specyficzność była już kwestionowana, to jednak stosowano ją w celu oceny obecności mikroprzerzutów w szpiku kostnym. Chorzy na raka piersi, otrzymujący chemioterapię w wysokich dawkach, charakteryzowali się obecnością transkryptów maspiny w szpiku kostnym i przeciwnie, spodziewano się choroby u chorych, u których nie stwierdzano obecności maspiny w szpiku [20]. Maspina stosowana była również z dobrym efektem jako marker umożliwiający wykrycie choroby rezydualnej w przypadku raka piersi [21]. Identyfikowano komórki nowotworowe w krwi obwodowej i szpiku kostnym, pozyskiwanych w trakcie chemioterapii. Technika RT-PCR była stosowana w celu potwierdzenia, że maspina, jak również mamoglobina (specyficzny tkankowo marker obecny w tkankach gruczołu piersiowego), może być stosowana w celu wykrycia ukrytych komórek raka piersi. Inne markery oceniane w tym samym badaniu, takie jak: cytokeratyna 19 i 20, EGFR, MUC-1 i CEA, nie wykazywały wystarczającej czułości, aby być przydatne w wykrywaniu rezydualnych komórek nowotworowych.

Ekspresja maspiny ma szczególne znaczenie w przypadku lokalizacji nabłonkowych, dlatego jej zalety mogą być wykorzystane również w przypadku innych nowotworów. Choć większość badań nad maspiną dotyczyła raka piersi, to jednak poddano badaniom także inne tkanki. Machtens i wsp. [22] wykazali, że ocena ekspresji maspiny może być przydatna jako czynnik prognostyczny u chorych po radykalnej prostatektomii. Zanik ekspresji maspiny obserwowano u chorych w bardziej zaawansowanych stadiach choroby; wiązał się on również ze znamienym zanikiem histologicznego zróżnicowania. Progresję choroby zaobserwowano u 58% (23/40) chorych bez ekspresji maspiny. To właśnie w tym badaniu po raz pierwszy wysunięto hipotezę dotyczącą związku między maspiną i białkiem p53. Związek pomiędzy ekspresją maspiny i przeżyciem bez cech wznowy był również przedmiotem badania prowadzonego przez Xia i wsp. [23]. Badanie to dotyczyło chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej i wykazało, że wysoka ekspresja maspiny zapewniała korzystne rokowanie, ze względu na zmniejszenie ilości przerzutów do węzłów chłonnych. W próbach kontrolnych, prowadzonych na liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka jamy ustnej, ekspresja maspiny była równa zeru. Uważa się, że maspina może być czynnikiem prognostycznym, przydatnym do oceny zdolności nowotworu do tworzenia przerzutów oraz przewidywania czasu przeżycia w chorobach nowotworowych [24]. Wyniki przedstawione

w pracy Sood i wsp. [25], uzyskane w grupie chorych na raka jajnika, wykazały, że umiejscowienie maspiny (tj. jądrowe lub cytoplazmatyczne) zmienia jej aktywność oraz działanie. Wybrane linie komórkowe raka jajnika oceniono pod kątem ekspresji maspiny z zastosowaniem technik immunohistochemicznych, RT-PCR, Western-blot oraz Northern-blot. Wykazano, w przypadku raków jajnika, cytoplazmatyczne umiejscowienie maspiny, podczas gdy, paradoksalnie, wewnątrzjądrowe umiejscowienie maspiny (prawdopodobnie charakterystyczne dla aktywnej formy cząsteczki) wiąże się z dobrymi wynikami i lepszym przeżyciem chorych. Wykazano również, że maspina, naturalnie występująca, może całkowicie zahamować progresję raka jajnika. Wyniki te sugerują, że w przypadku raka jajnika wysoki poziom ekspresji maspiny wpływa na stopień inwazyjności nowotworu, a jej umiejscowienie ma kluczowe znaczenie dla zahamowania inwazyjności komórek nowotworowych. Ostatnie badania wykazały, że w przypadku raka jajnika wysoki poziom ekspresji maspiny wynika z lepszej dostępności struktur chromatyny i demetylacji fragmentu promotorowego dla maspiny. W normalnych warunkach komórki raka jajnika są maspino-ujemne, a jej ekspresję można indukować, stosując terapię 5-aza-dC lub wymuszoną nadekspresję białka p53 [26].

W kilku badaniach, poświęconych nowym metodom leczenia onkologicznego, analizowano zmiany stopnia ekspresji maspiny w komórkach nowotworowych i stwierdzono, że stosowanie pewnych substancji w celu regulacji stopnia ekspresji maspiny może stworzyć nowe podejście do leczenia chorób nowotworowych. Khalkhali-Ellis i wsp. [27] przebadali w tym celu tamoksyfen (selektywny, niesteroidowy modulator receptorów estrogenowych, szeroko stosowany w leczeniu raka piersi) i stwierdzili, że tamoksyfen może indukować aktywność fragmentu promotorowego maspiny, dzięki czemu wpływa on na apoptozę komórek nowotworowych oraz zmniejsza zdolność komórek raka piersi do tworzenia przerzutów. Dzięki zastosowaniu techniki *Western blot* potwierdzono, że tamoksyfen może spowodować re-ekspresję maspiny w maspino-ujemnych komórkach raka piersi. W innym badaniu [28] oceniono korelację pomiędzy śródbłonkową syntezą tlenku azotu i maspiną w komórkach raka piersi oraz stwierdzono, że regulowana poziomem tlenku azotu ekspresja maspiny przyspiesza proces apoptozy. Sugeruje to, że w przypadku choroby nowotworowej regulowane uwalnianie tlenku azotu, wpływające na poziom ekspresji działającej przeciwnowotworowo maspiny, może stanowić podstawę nowej strategii leczenia raka piersi. Działanie maspiny może być również wykorzystane w badaniach nad sposobami leczenia raka gruczołu krokowego. W badaniu opublikowanym przez Watanabe i wsp. [29] zastosowano wirus AVV, serotyp 2 (*adeno-associated virus*), jako wektor z kodem maspiny w terapii genowej ludzkiego raka gruczołu krokowego w modelu *in vivo* („nagie” myszy) i wykazano, że stopień ekspresji maspiny regulowany za pomocą AVV, powoduje supresję raka gruczołu krokowego na drodze apoptozy i zahamowa-

nia angiogenezy. W ten sposób maspina zyskuje kolejne potencjalne zastosowanie w terapiach przyszłości.

Przedstawiliśmy ocenę znaczenia maspiny jako genu supresorowego, hamującego rozrost komórek nowotworowych oraz jej zdolności do hamowania rozrostu, naciekania i przerzutowania guzów nowotworowych. Wskazaliśmy również badania, w których oceniano potencjalne znaczenie maspiny jako markera nowotworowego. Konieczne są dalsze, długofalowe badania, dzięki którym będzie można dowiedzieć, że maspina może stanowić znaczny stopień zaawansowania choroby oraz, że zastosowana w warunkach klinicznych, może poprawić wyniki leczenia onkologicznego.

Dr Katarzyna Karwasik-Kajszczarek
Katedra Genetyki Medycznej z Zakładem Genetyki Nowotworów
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
im. F. Skubiszewskiego
ul. Radziwiłłowska 11, 20- 950 Lublin
e- mail: kakar@esculap.pl

Piśmiennictwo

1. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ i wsp. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 1994; 263: 526-9.
2. Sager R, Sheng S, Pemberton P i wsp. Maspin: a tumor suppressing serpin. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 51- 64.
3. Zhang M, Volpert O, Shi YH i wsp. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 2000; 6: 196-9.
4. Blaque OE, Worrall DM. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. *J Biol Chem* 2002; 277: 10783-8.
5. Yin S, Li X, Meng Y i wsp. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathion S-transferase. *J Biol Chem* 2005; 280: 34985-96.
6. Zou Z, Gao C, Nagaich AK i wsp. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem* 2000; 275: 6051-4.
7. Zhang M, Maas N, Magit D i wsp. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 179-86.
8. Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ i wsp. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. *Int J Cancer* 2000; 85: 805-10.
9. Pemberton PA, Wong DT, Gibson HL i wsp. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. *J Biol Chem* 1995; 270: 15832-7.
10. Sheng S, Pemberton PA, Sager R. Production, purification and characterization of recombinant maspin protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 30988- 93.
11. Sheng S, Carey J, Seftor EA i wsp. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11669-74.
12. Amir S, Margaryan NV, Odero-Marah V i wsp. Maspin regulates hypoxia-mediated stimulation of uPA/uPAR complex in invasive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 400-6.
13. Seftor RE, Seftor EA, Sheng S i wsp. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 5681-5.
14. Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Kondo S i wsp. Mammary Serine Protease Inhibitor (Maspin) binds directly to Interferon Regulatory Factor 6. *J Biol Chem* 2005, 280: 34210-7.
15. Hojo T, Akiyama Y, Nagasaki K i wsp. Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. *Cancer Lett* 2001; 171: 103-10.
16. Sabbatini R, Federico M, Morselli M i wsp. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of

- maspin in patients with breast cancer undergoing conventional-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1914-20.
17. Merrie AE, Yun K, Gunn J i wsp. Analysis of potential markers for detection of submicroscopic lymph node metastasis in breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 2019-24.
 18. Lopez-Guerrero JA, Gilabert PB, Gonzales EB i wsp. Use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for carcinoembryonic antigen, cytokeratin 19, and maspin in the detection of tumor cells in leukapheresis products from patients with breast cancer: comparison with immunocytochemistry. *J Hematother* 1999; 8: 53-61.
 19. Maas N, Hojo T, Rosel F i wsp. Down-regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001; 34: 303-7.
 20. Ballestro A, Coviello DA, Garuti A i wsp. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction of the maspin gene in the detection of bone marrow breast carcinoma cell contamination. *Cancer* 2001; 92: 2030-5.
 21. Corradini P, Voena C, Astolfi M i wsp. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 1693-8.
 22. Machtens S, Serth J, Bokemeyer C i wsp. Expression of the p53 and maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Int J Cancer* 2001; 95: 337-42.
 23. Xia W, Lau YK, Hu MC i wsp. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 2398-403.
 24. Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N i wsp. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 962-6.
 25. Sood AK, Fletcher MS, Gruman LM i wsp. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2924-32.
 26. Rose SL, Fitzgerald MP, White NO i wsp. Epigenetic regulation of maspin in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2006; Aug; 102(2): 319-24. Epub 2006 Feb 7.
 27. Khalkhali-Ellis Z, Christian AL, Kirschmann DA i wsp. Regulating the tumor suppressor gene maspin in breast cancer cells: a potential mechanism for the anticancer properties of tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 449-54.
 28. Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. Nitric oxide regulation of maspin expression in normal mammary epithelial and breast cancer cells. *Am J Pathol* 2003; 162: 1411-7.
 29. Watanabe M, Nasu Y, Kashiwakura Y i wsp. Adeno-associated virus 2-mediated intratumoral prostate cancer gene therapy: long-term maspin expression efficiently suppresses tumor growth. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 699-710.

Otrzymano: 14 listopada 2008 r.

Przyjęto do druku: 20 marca 2009 r.