

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Т. С. Боброва

СЕМЕЙСТВО КАЛЛИКРЕИНОВЫХ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА: БИОЛОГИЯ И РОЛЬ В РАЗВИТИИ РАКА ЯИЧНИКОВ И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Семейство калликреиновых генов человека включает 15 генов, которые тандемно расположены на 19-й хромосоме (19q13.4) и имеют значительную гомологию на уровне как генов, так и белков. Экспрессия многих калликреинов в одной и той же ткани предполагает множественные физиологические функции этих белков и возможные взаимодействия между ними. Экспрессия большинства калликреиновых генов регулируется стероидными гормонами. Многие калликреины взаимодействуют с различными циркулирующими ингибиторами протеаз. Наиболее известным представителем семейства калликреинов является простатический специфический антиген, широко применяемый в качестве опухолевого маркера. Предполагают, что и другие члены семейства калликреинов могут использоваться как опухолевые маркеры и маркеры других острых и хронических заболеваний. В настоящее время признано, что один опухолевый маркер не может предоставить всю необходимую информацию для диагностики, мониторинга и оценки эффективности лечения. Полагают, что при раке яичников следует определять не только СА-125, но и другие маркеры. В частности, с помощью высокочувствительных иммунологических методов показано, что дополнительными диагностическими и прогностическими маркерами рака яичников могут быть калликреины (hK6, hK8, hK10 и hK11).

Ключевые слова: калликреины человека, рак яичников, иммунологические характеристики, физиологические функции.

Злокачественные эпителиальные опухоли яичников — самые частые злокачественные опухоли этой локализации, которые выявляются на поздних стадиях и обычно приводят к смерти. Прогноз при раке яичников неблагоприятный, 5-летняя выживаемость составляет приблизительно 30%, что связывают с поздней диагностикой. Одним из маркеров рака яичников является СА-125. Это высокомолекулярный гликопротеиновый комплекс, который выявляют более чем у 80% больных серозным, эндометриоидным или недифференцированным раком яичников. СА-125 обнаружен также в человеческом молоке, неизменной слизи шейки матки и неизменной ткани легкого. Предполагается, что белковая детерминанта СА-125 более консервативна и уникальна, а полисахаридная может быть соединена с разными белками [18; 23].

До настоящего времени чувствительных методов ранней диагностики рака яичников не разработано. В связи с этим большой интерес представляет идентификация новых маркеров, которые могли бы применяться для

ранней диагностики рака яичников. Хотя этиология и молекулярные механизмы развития этого заболевания еще недостаточно понятны, существуют данные, что повышенная экспрессия сериновых протеаз положительно коррелирует с метастатическим потенциалом опухолевых клеток. Полагают, что протеазы участвуют в опухолевой прогрессии, поскольку разрушают внеклеточный матрикс, способствуя диссеминации опухолевых клеток [18; 23].

Наиболее изученным и широко применяемым маркером при раке яичников на сегодняшний день является СА-125. Исследование уровня СА-125 в сыворотке применяется для скрининга, дифференциальной диагностики рака яичников и доброкачественных опухолей, а также оценки прогноза заболевания. Однако высокие уровни СА-125 наблюдаются у 1% здоровых людей, 6% больных с доброкачественной патологией и 28% больных с негинекологической патологией. В самостоятельном виде и в комбинации с СА-125 при раке яичников пытались исследовать СА-15-3, СА-19-9, OVX-1, лизофосфатидиловую кислоту и раково-эмбриональный антиген. Однако эти маркеры пока не нашли широкого клинического применения [3—5; 7; 10].

В качестве новых потенциальных маркеров рака яичников предлагают использовать тканевые калликреины. Это группа сериновых протеаз с разнообразными функциями, которые присутствуют в разных тканях и биологических жидкостях. Калликреины делятся на две больших категории: плазменные и тканевые. Они различаются по своей молекулярной массе, субстратной специфичности, иммунологическим характеристикам, генной структуре и типу высвобождаемого кинина. Плазменный калликреин (фактор Флетчера, KLKB1) кодируется единственным геном, который локализуется на 4-й хромосоме (4q35). Ген состоит из 15 экзонов и кодирует фермент. Он расщепляет высокомолекулярный кининоген, продуцируемый клетками печени, с выделением биологически активного пептида — брадикинина. Плазменный калликреин экспрессируют только клетки печени. Он участвует в фибринолизе, регуляции тонуса сосудов и воспалении [7; 30; 35].

Тканевые калликреины кодируют 15 генов, tandemно расположенных на 19-й хромосоме (19q13.4) и имеющих значительную гомологию на уровне как генов, так и белков. Гены обозначают KLK, а кодируемые ими белки — hK. Гены кодируют сериновые протеазы. До недавнего времени были известны только три гена этого семейства: почечно-панкреатический калликреин (ген KLK1, белок hK1), железистый калликреин 2 (ген KLK2, белок hK2) и простатический специфический антиген (ПСА, ген KLK3, белок hK3) [1; 3].

ГЕНЫ КАЛЛИКРЕИНОВ ЧЕЛОВЕКА И ГРЫЗУНОВ

Молекулярная биология генов тканевых калликреинов человека и грызунов была детально изучена в 80-х гг. прошлого столетия. Их геномная протяженность сравнительно мала и составляет 4000—10 000 нуклеотидов. Ген, соседствующий с KLK, кодирует не родственную калликреинам тестикулярную кислую фосфатазу (АСРТ). С последним геном семейства — KLK14 — соседствует ген Sigelec 9. Он принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, кодирующих трансмембранные рецепторы, которые способны присоединять сиаловую кислоту. Эти гены не имеют структурного и функционального родства с генами, кодирующими тканевые калликреины. Все члены семейства тканевых калликреинов человека кодируют сериновые протеазы и состоят из 5 кодирующих экзонов [25; 34; 38].

БЕЛКОВАЯ ГОМОЛОГИЯ И ФЕРМЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

Сравнение аминокислотных последовательностей всех 15 членов семейства калликреинов человека показало, что максимум гомологии между этими белками приходится на аминокислоты каталитических центров: гистидин, аспарагин и серин. Показано, что аминокислотная идентичность между разными членами семейства составляет 40—80%. Все калликреины имеют 10—12 цистеино-

вых последовательностей, которые, как предполагают, формируют дисульфидные мостики. Все калликреины синтезируются в виде проферментов. Протеолитическое расщепление молекулы профермента приводит к образованию активного фермента. Большинство калликреинов человека сходны с ферментами пищеварения, коагуляции и апоптоза и обладают трипсиноподобной активностью. Сравнение аминокислотных последовательностей выявило наличие в трех классических калликреинах (9—11) аминокислотной последовательности (калликреиновая петля), которая отсутствует в 12 других ферментах [2; 7; 21; 34].

Сериновые протеазы делят на два семейства, образовавшиеся в результате эволюционной конвергенции: трипсиноподобные сериновые протеазы и субтилизиноподобные пропротеинконвертазы. Полагают, что они образовались в результате дупликации гена-родоначальника. Затем появились другие гены, которые, в свою очередь, основательно мутировали, и возникло семейство генов с новыми функциями. Сериновые протеазы значительно отличаются по своей субстратной специфичности. Различия обусловлены строением субстрат-связывающего домена. Субстрат-связывающий домен трипсиноподобных сериновых протеаз содержит аспарагин, который может образовывать электростатические связи с аргинином или лизином С-концевого фрагмента участка расщепления. За субстратную специфичность отвечают 6 аминокислот субстрат-связывающего домена до серина каталитического участка. Из 15 исследованных элайментом белков у 11 в субстрат-связывающем домене обнаружен аспарагин, и, как ожидается, они будут иметь трипсиноподобную активность. Калликреин 3 содержит в субстрат-связывающем домене серин, калликреин 7 — аспарагин, калликреин 9 — глицин, калликреин 15 — глютаминовую кислоту, и, как ожидается, они будут иметь химотрипсиноподобную или другую специфическую ферментную активность [7; 34; 35; 39].

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КАЛЛИКРЕИНОВЫХ ГЕНОВ

Гормоны не влияют на экспрессию гена KLK1. На клеточной линии рака предстательной железы LNCaP показано, что экспрессия гена KLK3, кодирующего ПСА, зависит от уровня андрогенов, а на клеточных линиях рака молочной железы BT-474, T-47D и MFM223 отмечено, что она зависит от уровней андрогенов и прогестерононов. Р. Murtha и соавт. показали, что экспрессию KLK2 в клеточной линии T-47D повышали андрогены и прогестерогены [21], в то время как Р. Н. J. Riegman и соавт. показали, что ее повышали только андрогены [25]. Регуляция экспрессии генов KLK2 и KLK4 схожа с регуляцией экспрессии гена KLK3. Экспрессию 10 из 11 генов калликреинов (KLK5—15) регулируют стероидные гормоны. Полагают, что экспрессию большинства генов калликреинов в разной степени повышают эстрогены, андрогены

и прогестагены и некоторые из этих генов регулируются гормонами через не прямые механизмы с вовлечением трансктивирующих элементов [25; 26; 34; 38].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Тканевые калликреины человека обладают многообразными физиологическими функциями, такими, как слушивание кожного эпителия, активация факторов роста и протеаз, расщепление белков, связывающих факторы роста, и поддержание нервной пластичности. Многие калликреины коэкспрессируются в одних и тех же тканях, и, как предполагают, это является признаком их функционального родства. Например, показано, что экспрессия KLK2 и KLK3 регулируется сходными механизмами, а кодируемые ими белки часто коэкспрессируются в тканях и жидких средах человека. In vitro показано, что hK2, обладающий трипсиноподобной активностью, может активировать проформу ПСА [7; 34; 38].

Из 15 калликреинов человека только для трех описана специфическая биологическая функция. Поскольку, как предполагается, все калликреины являются секретирруемыми протеазами, их функция состоит в способности переваривать один или несколько субстратов. Присутствие калликреинов в разных тканях предполагает, что в разных тканях они могут действовать на разные субстраты. Их ферментная активность может требовать активации и инактивации или запускаться событиями, опосредованными другими молекулами, включая гормоны, факторы роста, рецепторы и цитокины. Белок hK1 — единственный калликреин человека с кининогеназной активностью. Биологические эффекты этого фермента и плазменного сводятся к высвобождению кинина, который присоединяется к специфическому G-белку поверхностных клеточных рецепторов. Калликреин-кининовая система участвует в патогенезе воспаления, артериальной гипертензии, заболеваний почек, панкреатита и злокачественных опухолей.

Тканевые калликреины принимают участие в процессе факторов роста и пептидных гормонов в шишковидной и поджелудочной железах и других тканях. Показано, что hK1 расщепляет проинсулин, липопротеиды низкой плотности, проренин, вазоактивный интестинальный пептид, проколлагеназу и ангиотензиноген. Недавно исследованы физиологические функции hK2. Показано, что он активирует сам себя (отщепление 7 аминокислот) и проформу ПСА. Исследования субстратной специфичности hK1 и hK2 выявили важные различия, предполагающие, что оба белка имеют разные природные субстраты. Это подтверждает гораздо более низкая кининогеназная активность hK2 по сравнению с hK1. Показано, что hK2 может расщеплять семиногелины I и II, но в других участках и с меньшей эффективностью, чем ПСА.

Помимо семиногелинов I и II идентифицировано несколько других субстратов ПСА, включая IGFBP-3, трансформирующий фактор роста β , базальные мембраны,

РТН-родственный пептид и плазминоген. В настоящее время известно, что hK3 присутствует в содержимом кист молочной железы, грудном молоке, амниотической жидкости и опухолевых экстрактах. Предполагают, что hK3 обладает биологическими функциями вне ткани предстательной железы, в частности в молочной железе, и может играть роль в эмбриогенезе. Показано также, что hK3 и hK2 вместе присутствуют в любых биологических жидкостях, что подтверждает их возможное функциональное родство. Недавно показано, что hK2 in vitro активизирует зимоген — одноцепочечную форму активатора плазминогена урокиназного типа (uPA). Поскольку последний участвует в метастазировании, предполагают, что hK2 также играет роль в метастазировании рака предстательной железы. В то время как и hK1, и hK2 обладают трипсиноподобной активностью, hK3 имеет химотрипсиноподобную активность [2; 7; 30; 34; 36].

ТКАНЕВАЯ ЭКСПРЕССИЯ КАЛЛИКРЕИНОВ И СВЯЗЬ С ПАТОЛОГИЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Ни один из калликреинов, кроме KLK1, KLK2 и KLK3, не является тканеспецифическим, хотя кодирующие их гены имеют преимущественную экспрессию в определенных тканях, например KLK5, KLK6, KLK10 и KLK13 — в молочной железе, KLK5, KLK7 и KLK8 — в коже, KLK6, KLK8, KLK9 и KLK14 — в центральной нервной системе, почти все калликреины — в слюнных железах [7; 34; 38].

Калликреин 1

Наибольшая экспрессия KLK1 отмечается в поджелудочной железе, почке и слюнных железах. Два других гена классических калликреинов KLK2 и KLK3, как полагали в течение многих лет, экспрессируются исключительно в предстательной железе. С использованием высокочувствительных иммунологических методик, ПЦР с обратной транскрипцией и иммуногистохимического исследования в настоящее время продемонстрировано, что и KLK2, и KLK3 экспрессируются и в других тканях, но в значительно меньшей концентрации, чем в предстательной железе.

Калликреин 2

Железистый калликреин hK2, как и ПСА, тоже является маркером рака предстательной железы. ПСА (hK3) и hK2, а также мРНК KLK2 и KLK3 в значительных количествах обнаруживают в молочной железе у мужчин и в более низких концентрациях во многих других тканях. Сывороточная концентрация hK2 не превышает таковую ПСА. Предполагают, что hK2 можно использовать для дифференциальной диагностики рака и доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Недавно показано, что экспрессия hK2, хотя и в меньшей степени, чем экспрессия ПСА, снижена в злокачественных опухолях молочной железы и других органов по сравнению с окружающими опухоль неизмененными тканями [22; 34].

Калликреин 3

ПСА (hK3) является лучшим из известных опухолевых маркеров благодаря своей тканевой специфичности. Повышение сывороточной концентрации ПСА наблюдается при раке предстательной железы. Определение уровня ПСА широко используется для диагностики этого заболевания и наблюдения за больными после лечения. ПСА — это секретируемая сериновая протеаза с молекулярной массой 30 кДа. Показано, что ПСА может расщеплять белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста. При этом высвобождается инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I), который является митогеном для эпителия и клеток стромы предстательной железы. ПСА может активировать трансформирующий фактор роста β , тем самым способствуя диссеминации опухолевых клеток. Подобно другим сериновым протеазам, ПСА может способствовать расщеплению базальных мембран, ведущему к инвазии и метастазированию. Помимо высокой экспрессии в предстательной железе повышенная экспрессия ПСА обнаружена при некоторых формах рака яичников.

Хотя сывороточная концентрация ПСА обычно повышена при раке предстательной железы, механизм его участия в патогенезе этого заболевания мало понятен. Более того, показано, что низкая экспрессия ПСА в опухоли сочетается с ее более агрессивным течением. Это согласуется также с данными о том, что экспрессия ПСА ниже при раке молочной железы по сравнению с нормальной тканью и гиперплазией, а также в более агрессивных опухолях по сравнению с менее агрессивными. Больные раком молочной железы, у которых выявлена экспрессия ПСА в опухоли, обычно имеют более ранние стадии заболевания, большую продолжительность жизни и более низкий риск прогрессирования. Кроме того, показано, что о высоком риске прогрессирования рака молочной железы свидетельствует низкая экспрессия ПСА в аспирате опухоли. Возможно, ПСА является супрессором опухолевого роста и клеточной пролиферации, индуктором апоптоза, ингибитором ангиогенеза и резорбции кости. Некоторые исследователи предполагают, что экспрессия ПСА может являться неблагоприятным прогностическим фактором при раке молочной и предстательной желез и некоторых других локализаций. Обнаружено также, что высокая экспрессия ПСА при раке молочной железы сочетается с низкой эффективностью тамоксифена (табл. 1) [2; 15; 22; 25; 34].

Калликреин 4

Экспрессия гена KLK4 в опухоли обнаружена у 69 (47%) из 147 больных раком яичников. Полагают, что KLK4 является потенциальным кандидатом в опухолевые маркеры этого заболевания. Во-первых, KLK4 высоко гомологичен другим калликреиновым генам, играющим роль при раке яичников. Во-вторых, известно, что при раке яичников в ткани опухоли имеются рецепторы ан-

дрогенов, а андрогены, как показано *in vitro*, влияют на пролиферацию клеток многих опухолей и регулируют экспрессию KLK4. Полагают, что экспрессия KLK4 является на поздних стадиях рака яичников и свидетельствует об агрессивном течении этой опухоли. Кроме того, с помощью ПЦР с обратной транскрипцией продемонстрировано, что KLK4 экспрессируется в молочной железе и других тканях. Показано, что этот ген на 38% идентичен и на 52% гомологичен гену KLK3, а также высоко гомологичен другим калликреиновым генам. Показано, что экспрессия KLK4 часто выявляется при прогрессировании рака яичников и является независимым неблагоприятным прогностическим фактором при раке яичников I—II стадий [23; 32; 36].

Калликреин 5

Экспрессия гена KLK5 на уровне мРНК также регулируется стероидными гормонами. Показано, что ген KLK5 по-разному экспрессируется в гормонально-зависимых новообразованиях и что он также является потенциальным опухолевым маркером. В сыворотке и асцитической жидкости hK5 присутствует в двух разных формах с молекулярной массой примерно 50 и 150—180 кДа. Возможно, hK5 в этих биологических средах взаимодействует с ингибиторами протеаз или другими интерактивными белками. Экспрессия hK5 в опухоли повышена у 55—60% больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников. У 67% больных раком яичников и 49% больных раком молочной железы повышена сывороточная концентрация hK5. Повышенная экспрессия калликреинов при раке яичников свидетельствует о неблагоприятном прогнозе [7; 32; 37].

Калликреин 6

Экспрессия KLK6 снижается при диссеминированном раке молочной железы и повышается при некоторых первичных опухолях молочной железы и яичников. Кроме того, показано, что hK6 может быть специфическим циркулирующим опухолевым маркером при раке яичников. Специфичность исследования hK6 при раке яичников всех стадий составляет 90—95% (ранних стадий — 21—26%), чувствительность — 47—52%. Сывороточные концентрации hK6 и CA-125 умеренно коррелируют друг с другом. Предполагается, что hK6 более специфичен для рака яичников, чем CA-125, потому что повышение сывороточной концентрации hK6 при доброкачественных опухолях отсутствует. Чувствительность определения hK6 при раке яичников немного ниже, чем чувствительность исследования CA-125 при одинаковой специфичности. Однако чувствительность одновременного исследования hK6 и CA-125 при раке яичников выше чувствительности определения каждого из них по отдельности при всех стадиях, включая I—II. Специфичность одновременного исследования CA-125 и hK6 составляет 90%, чувствительность при раке яичников всех стадий — 72%, при раке

Таблица 1

Экспрессия калликреинов и кодирующих их генов в опухолях и сыворотке больных раком яичников

Гены и белки	Частота экспрессии ^a , %				Примечания
	в опухоли		в сыворотке		
	I—II ст.	III—IV ст.	I—II ст.	III—IV ст.	
KLK4 (KLK-L1)	55		НД	НД	Ген KLK4 на 38% идентичен и на 52% гомологичен гену KLK3. Экспрессируется на поздних стадиях рака яичников, указывает на агрессивное течение болезни
KLK5 / hK5 (KLK-L2, 50 и 150—180 кДа)	55—60 (hK5)		65—67		Наиболее высокая экспрессия гена KLK5 в коже. Обнаружен также в молочной железе, пищеводе, головном мозге, яичнике и яичке. Белок hK5 выявляется в сыворотке 49% больных раком молочной железы
KLK6 / hK6 (KLK6 zyme / neurosin)	НД	НД	21—26	НД	Белок hK6 считают более специфичным маркером рака яичников, чем СА-125. Его выявляют у 68% больных серозным, 33% больных эндометриоидным и 9% больных муцинозным раком яичников. Специфичность одновременного исследования СА-125 и hK6 составляет 90%, чувствительность при раке яичников всех стадий — 72%, при раке яичников I—II стадий — 42%
KLK8 / hK8 (нейропсин, 30 кДа)	55 (hK8)		62		Высокая экспрессия hK8 более характерна для рака яичников ранних, нежели поздних стадий. Специфичность определения в сыворотке 97,5%
KLK9 (KLK-L3)	46	44	НД	НД	Экспрессия при серозном и несерозном раке яичников одинакова
KLK10 / hK10 (NES1)	НД	НД	54	НД	Экспрессия характерна для серозного рака яичников поздних стадий. Специфичность одновременного исследования СА-125 и hK10 составляет 90%, чувствительность при раке яичников всех стадий — 73%, при раке яичников I—II стадий — 51%
KLK11 / hK11 (трипсиноподобная сериновая протеаза, 33 и 100 кДа)	НД	НД	70		Наиболее высокая экспрессия hK11 отмечена в предстательной железе. В высоких концентрациях содержится во многих биологических жидкостях, включая амниотическую жидкость и грудное молоко. Самый высокий уровень отмечен в семенной плазме. Выявляется в сыворотке 60% больных раком предстательной железы
KLK13 / hK13 (25—28 кДа, гликозилированная форма — 50 кДа)	50 (hK13)		НД	НД	Наиболее высокая экспрессия hK13 отмечена в пищеводе, миндалинах. В меньших количествах присутствует в предстательной железе, почке, легком. Обнаружен также в семенной плазме, грудном молоке, асцитической жидкости и цитозольных экстрактах рака яичников
KLK14 / hK14 (25—28 кДа)	НД	НД	65—67		Наиболее высокая экспрессия hK14 отмечена в молочной железе. В меньших количествах присутствует в коже, предстательной железе и подмышечных лимфатических узлах. Имеет прогностическую ценность при раке яичников и молочной железы. Выявляется в сыворотке 40% больных раком молочной железы

НД — нет данных.

^a Доля образцов с высокой экспрессией калликреинов и их генов по сравнению с неизмененными тканями и сывороткой доноров.

яичников I—II стадий — 42%. Обнаружено, что, подобно уровню СА-125, уровень hK6 чаще повышен при серозном раке яичников (68% случаев), чем при эндометриальном (33%) и муцинозном (9%), а также на поздних стадиях болезни. Сывороточный уровень hK6 снижается после операции у 68% больных. Незначительное повышение сывороточной концентрации hK6 наблюдается при раке молочной, предстательной и щитовидной желез, легкого, желудочно-кишечного тракта и опухолях яичка. Калликреин 6 разрезает белки — предшественники амилоида и, как и аспартилпротеаза, ген которой был недав-

но клонирован, может играть роль в патогенезе болезни Альцгеймера [5—7; 9; 11].

Калликреин 7

KLK7 участвует в патогенезе заболеваний кожи, в том числе кератозов и псориаза. Повышение экспрессии KLK7 отмечено при некоторых формах рака яичников [7; 34].

Калликреин 8

Предполагается, что KLK8 играет роль в развитии заболеваний центральной нервной системы, в том числе

эпилепсии и нарушений памяти. Повышение экспрессии этого гена отмечено при некоторых формах рака яичников. Ген *KLK8*, клонированный из геномной библиотеки кожи человека, гомологичен гену нейропсина мыши. Наибольшая экспрессия мышинового нейропсина обнаружена в коже и головном мозге, особенно в гипоталамусе. Считается, что он отвечает за нейрональную пластичность и память. У человека повышенная экспрессия мРНК *KLK8* отмечается в гипоталамусе при болезни Альцгеймера, что подтверждает участие этого гена в высшей нервной деятельности у человека. Повышенная экспрессия транскриптов *KLK8* в опухоли наблюдается при раке яичников. При этом в результате альтернативного сплайсинга образуются две разные мРНК.

Для выявления *hK8* в тканях и сыворотке используют высокочувствительный и высокоспецифичный иммунологический метод на основе поликлональных мышино- и кроличьей антисывороток. В качестве стандарта применяют рекомбинантный *hK8*. При использовании этого метода перекрестные реакции с другими калликреинами отсутствуют. Исследование 20 цитозольных фракций, полученных от больных раком яичников, показало, что у 55% больных содержание *hK8* в ткани опухоли выше, чем в неизмененных тканях. Белок *hK8* выявлен в сыворотке больных раком яичников разных стадий, при этом чувствительность составила 62%, а специфичность 97,5%. И в сыворотке, и в асцитической жидкости концентрация *hK8* коррелирует с концентрацией СА-125 [7; 14; 34].

Многие ферменты циркулируют в сыворотке в комплексе с ингибиторами протеаз (например, ПСА в комплексе с α_1 -антихимотрипсином). При фракционировании сыворотки больной раком яичников с использованием гель-фильтрационной хроматографии *hK8* выявлен в виде единственного пика с молекулярной массой примерно 30 кДа. Таким образом, *hK8* присутствует в сыворотке в свободном состоянии. Однако предполагают, что *hK8* может связываться с ингибиторами протеаз (подобных α_2 -макроглобулину) и не выявляться иммунологическими методами. С помощью метода ELISA выявлена очень высокая концентрация *hK8* в асцитической жидкости больных раком яичников II—IV стадий. Еще более высокие концентрации *hK8* обнаружены при раке яичников I стадии. По мнению авторов этого исследования, концентрация *hK8* может быть маркером дифференцировки рака яичников, а высокая концентрация — указывать на более дифференцированные и менее агрессивные опухоли. Интересно, что, по данным этого исследования, доля больных с повышенной экспрессией *hK8* в ткани опухоли (55%) сходна с долей больных с повышенной сывороточной концентрацией *hK8* (62%) [7; 14; 34].

Калликреин 9

KLK9 (известный еще как *KLK-L3*) — недавно идентифицированный член семейства калликреиновых ге-

нов. Он экспрессируется во многих тканях, включая мозжечок, спинной мозг, яичко, предстательную железу, яичник и кожу. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией исследована экспрессия *KLK9* в 168 образцах рака яичников разных стадий и гистологических типов. Обнаружено, что экспрессия *KLK9* значительно выше при раке яичников I—II стадий по сравнению с III—IV. Если опухоль экспрессирует *KLK9*, дольше безрецидивный период и выше общая выживаемость.

Иммуногистохимическим методом обнаруживают умеренную положительную реакцию на *hK9* в цитоплазме опухолевых клеток без окрашивания ядра и клеток стромы. Экспрессия СА-125 и *KLK9* коррелирует отрицательно. На клеточных линиях рака яичников и молочной железы показано, что экспрессия *KLK9* регулируется стероидными гормонами. При раке яичников I—II стадий *KLK9* обнаруживают в опухоли у 46% больных, III стадии — у 44%. Поскольку *KLK9* одинаково экспрессируют серозные и несерозные опухоли яичников, полагают, что его исследование можно применять для диагностики и наблюдения за больными несерозным раком яичников, когда СА-125 малоинформативен [7; 32; 34; 35].

Калликреин 10

Калликреин 10 (*hK10*, *NES1*) — один из вновь идентифицированных калликреинов. Ген *KLK10* имеет длину 5500 нуклеотидов и имеет 5 экзонов. Белок *hK10* имеет каталитическую триаду (гистидин, аспарагиновая кислота, серин), характерную для сериновых протеаз, что определяет его трипсиноподобную активность. Методом ELISA *hK10* выявлен в сыворотке больных раком яичников. Чувствительность исследования составила 54%, специфичность — 90%. Белок *hK10* имеется примерно у 35% больных раком яичников, у которых уровень СА-125 не превышает 23 ед/л. Белок *hK10* является более специфичным маркером рака яичников, чем СА-125, поскольку его уровень не повышается при доброкачественных опухолях яичников. Чувствительность определения *hK10* сравнима с чувствительностью определения СА-125. Уровни *hK10* и СА-125 слабо коррелируют друг с другом, и многие больные с нормальным уровнем СА-125 имеют повышенный уровень *hK10*. Чувствительность одновременного исследования *hK10* и СА-125 при раке яичников выше чувствительности определения каждого из них по отдельности. Она составляет 73% при всех стадиях и 51% при I—II стадиях. Уровень *hK10*, как и уровень СА-125, чаще повышен при серозном раке яичников, чем при эндометриоидном и муцинозном, а также на поздних стадиях и при прогрессировании болезни.

Хотя на животных моделях показано, что *KLK10* подавляет пролиферацию опухолевых клеток при раке молочной железы, его диагностическое и прогностическое значение при этой опухоли еще не определено. Недавно обнаружено, что снижение экспрессии *KLK10* сочета-

ется с повышением агрессивности рака предстательной железы [7; 16—20].

Калликреин 11

Ген KLK11 впервые клонирован S. Yoshida с соавт., а его продукт, белок hK11, назван трипсиноподобной сериновой протеазой [32]. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией выявлена экспрессия KLK11 во многих тканях, включая мозг, кожу, слюнные железы, предстательную железу, желудок и кишечник. Интенсивное иммуногистохимическое окрашивание на hK11 отмечается в супрануклеарной области цитоплазмы эпителиальных клеток тонкой кишки и папиллярного серозного рака яичников. Наиболее высокая экспрессия hK11 отмечена в предстательной железе и семенной плазме, менее выраженная — в желудке, трахее, коже и кишечнике. Белок hK11 обнаружен также в амниотической жидкости, грудном молоке, спинномозговой жидкости и в цитоплазме клеток рака молочной железы. Концентрация hK11 в семенной плазме и экстрактах ткани предстательной железы в 300 раз ниже, чем концентрация ПСА, и почти равна концентрации hK2.

На клеточных линиях рака молочной железы MCF7, BT-474, BT-20, MFM-223 и ZR-75 показано, что экспрессию KLK11 повышает эстрадиол и в меньшей степени — другие стероидные гормоны. Повышение сывороточной концентрации hK11 обнаружено у 70% больных раком яичников и 60% больных раком предстательной железы. С помощью гель-фильтрационной хроматографии в семенной плазме hK11 обнаружен в виде единственного пика с молекулярной массой 30—33 кДа, а в сыворотке в виде двух пиков: большего — с молекулярной массой 30—33 кДа и меньшего — с молекулярной массой примерно 100 кДа. Полагают, что в сыворотке hK11, как и ПСА, частично находится в комплексе с ингибиторами протеаз [4; 10; 32; 34].

Калликреин 12

По предварительным данным, при некоторых формах рака молочной железы отмечается снижение экспрессии генов KLK12, KLK13 и KLK14 [34; 38; 39].

Калликреин 13

KLK13 (прежде известный как KLK-L4) идентифицирован также недавно. Последовательность hK13 на 47 и 45% идентична таковым ПСА и hK2 соответственно. Наибольшая экспрессия мРНК KLK13 выявляется в тканях молочной и предстательной желез, яичка и слюнных желез. Функция hK13 пока не известна. Он является секреторной сериновой протеазой. Активная часть белка начинается с 26-й аминокислоты (сегмент, состоящий из первых 20 аминокислот, представляет собой сигнальный пептид, а сегмент с 21-й по 25-ю аминокислоту — активационный). Клонирована кДНК, кодирующая активную форму hK13. Ее продуктами являются белки с молеку-

лярной массой 50 и 28 кДа. Показано, что hK13 в значительной степени гликозилирован. Дегликозилирование hK13 гликопептидазой F (PNGase F) приводит к снижению молекулярной массы до 25—28 кДа, что соответствует молекулярной массе негликозилированного hK13 (белок с этой молекулярной массой не окрашивается на гликопротеины).

С помощью иммунологических методов hK13 выявлен в тканях пищевода, трахеи, миндалин, легкого, предстательной железы и шейки матки, а также в семенной плазме, амниотической и фолликулярной жидкостях, в асцитической жидкости при раке яичников, в грудном молоке и цитозольных экстрактах рака яичников. Это подтверждает, что hK13 секретируется клетками репродуктивной системы мужчин и женщин. Иммуногистохимически hK13 локализован в эпителии предстательной железы, в том числе в исходящих из него опухолях. Белок hK13 определяется в основном в цитоплазме эпителиальных клеток, в минимальных количествах — в ядре и отсутствует в строме [12; 13; 33].

Калликреин 14

KLK14 (ранее назывался KLK-L6) кодирует гормонально регулируемую сериновую протеазу; мРНК KLK14 обнаружена только в трех тканях — преимущественно в предстательной железе и в меньших количествах в селезенке и скелетных мышцах. Методом ПЦР с обратной транскрипцией экспрессия KLK14 обнаружена в центральной нервной системе, молочной и предстательной железах и яичках. С помощью гибридизации ДНК *in situ* дополнительно отмечено, что KLK14 присутствует в доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолях предстательной железы.

Наиболее высокая концентрация hK14 выявлена в молочной железе. В меньших количествах он присутствует в коже, предстательной железе и подмышечных лимфатических узлах, в еще меньших — в легком, желудке и яичке. Иммуногистохимически hK14 определяется в железистом эпителии и исходящих из него опухолях. Интенсивное окрашивание обычно выявляют в цитоплазме клеток. В строме этот белок отсутствует. С помощью метода ELISA hK14 обнаружен в некоторых биологических жидкостях. Наиболее высокая концентрация отмечается в семенной плазме и амниотической жидкости. Повышение сывороточной концентрации hK14 наблюдается у 65% больных раком яичников и 40% больных раком молочной железы. Предполагается, что hK14 формирует комплексы с ингибиторами протеаз, что затрудняет его определение иммунологическими методами. Образование комплексов с циркулирующими ингибиторами протеаз, в том числе с α -макроглобулином, ингибитором протеина C, α_2 -антиплазмином, α_1 -антитрипсином, α_1 -антихимотрипсином, антитромбином и ингибитором протеазы 6, показано и для других калликреинов, в частности hK2, hK3 и hK6.

На клеточной линии рака молочной железы BT-474 показано, что экспрессию KLK14 регулируют как андрогены, так и эстрогены. Согласно предварительным данным, hK14 можно использовать для диагностики и наблюдения за больными раком молочной железы и яичников [1; 10; 29; 31].

Калликреин 15

По предварительным данным, при агрессивных формах рака предстательной железы отмечается повышение экспрессии гена KLK15 [34; 38; 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что многие протеазы имеют прогностическую значимость при злокачественных опухолях [20; 27; 28]. При раке яичников информативно исследование сериновых протеаз — членов семейства калликреинов и кодирующих их генов, включая KLK4 (мРНК), KLK5 (мРНК), hK6, KLK7 (мРНК), KLK8 (мРНК), KLK9 (мРНК) и hK11, а также сериновых протеаз, не принадлежащих к семейству калликреинов, таких, как трипсин, простазин, хепсин и тестизин.

Предварительные данные предполагают, что при определенных формах рака молочной железы отмечается снижение экспрессии KLK12, KLK13 и KLK14, а при агрессивных формах рака предстательной железы — повышение экспрессии KLK15 [34; 38; 39]. Показано, что при раке яичников происходит нарушение регуляции экспрессии многочисленных калликреиновых генов [20; 27; 28].

Протеазы участвуют в расщеплении внеклеточного матрикса, что способствует инвазии и метастазированию злокачественных опухолей. Участие протеаз в прогрессировании рака яичников и других опухолей хорошо известно. Особый интерес представляют металлопротеазы, которые вызывают деградацию соединительной ткани и обеспечивают инвазию опухолевых клеток. Уже показано прогностическое значение активатора плазминогена урокиназного типа и его ингибиторов при раке яичников. Полагают, что прогностическое значение имеют также другие протеазы, включая катепсин D и некоторые коллагеназы [8; 20; 27; 28].

Многие калликреины циркулируют в биологических жидкостях в виде комплексов с ингибиторами протеаз. Показано, что калликреины hK2, hK3, hK5, hK6 и hK14, связываясь с α_2 -макроглобулином, α_2 -антиплазмином, α_1 -антитрипсином, α_1 -антихимотрипсином, антитромбином и ингибитором протеазы 6, формируют комплексы, которые достаточно трудно обнаружить. Однако полагают, что как свободные, так и связанные формы калликреинов являются информативными маркерами злокачественных опухолей. «Калликреины коэкспрессируются и, возможно, координированно регулируются, формируя ферментный каскадный путь, вовлеченный в канцерогенез рака яичников и молочной железы пока неизвестными механизмами. Изучение роли калликреинов в патогенезе

рака яичников может привести к разработке препаратов, мишенью которых станет ферментная активность этих протеаз» [16; 30; 33; 36].

Таким образом, тканевые калликреины могут быть дополнительными диагностическими и прогностическими маркерами рака яичников. При раке яичников экспрессируются четыре калликреиновых гена (KLK6, KLK7, LKL8 и KLK10), и их продукты могут быть частью упомянутого выше ферментного каскадного пути. Все перечисленные гены, кроме KLK8, характеризуются высокой экспрессией при генерализованных и агрессивных формах рака яичников. Механизмы участия калликреинов в патогенезе и прогрессировании рака яичников не известны. Недавно показано, что калликреин hK3 (ПСА) обладает антиангиогенной активностью. Возможно, что этим действием обладают и другие калликреины [14; 36].

В настоящее время признано, что один опухолевый маркер не может предоставить всю необходимую информацию для диагностики, мониторинга и оценки эффективности лечения. В связи с этим при раке яичников предлагают помимо СА-125 исследовать калликреины hK6, hK8, hK10 и hK11 [7; 14; 19; 32; 34; 38].

ЛИТЕРАТУРА

1. Borgono C. A., Grass L., Soosaipillai A. et al. Human kallikrein 14. A new potential biomarker for ovarian and breast cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 9032—9041.
2. Christensson A., Laurell C. B., Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reaction with extracellular serine proteinase inhibitors // *Eur. J. Biochem.* — 1990. — Vol. 194. — P. 755—763.
3. Diamandis E. P., Yousef G. M., Clements J. et al. New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46. — P. 1855—1858.
4. Diamandis E. P., Okui A., Mitsui S. et al. Human kallikrein 11: A new biomarker of prostate and ovarian carcinoma // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 295—300.
5. Diamandis E. P., Scorilas A., Fraccioli S. et al. Human kallikrein 6 (hK6): a new potential serum biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma // *J. Clin. Oncol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 1035—1043.
6. Diamandis E. P., Yousef G. M. Human tissue kallikrein gene family: a rich source of novel disease biomarkers // *Exp. Rev. Mol. Diag.* — 2001. — Vol. 1. — P. 182—190.
7. Diamandis E. P., Yousef G. M. Human tissue kallikreins: a family of a new cancer biomarkers // *Clin. Chem.* — 2002. — Vol. 48. — P. 1198—1205.
8. Garzetti G. G., Ciavattini A., Lucarini G. et al. Tissue and serum metalloproteinase (MMP-2) expression in advanced ovarian serous cystadenocarcinomas: clinical and prognostic implications // *Anticancer Res.* — 1995. — Vol. 15. — P. 2799—2804.
9. Ghosh M. C., Grass L., Soosaipillai A. Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may enhance the metastatic potential of tumor cells // *Tumor Biol.* — 2004. — Vol. 25. — P. 193—199.
10. Hooper J. D., Bui L. T., Rae F. K. et al. Identification and characterization of klk14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle // *Genomics.* — 2001. — Vol. 73. — P. 117—122.
11. Hutchinson S., Luo L.-Y., Yousef G. M. et al. Purification of human kallikrein 6 from biological fluids and identification of its complex with α_1 -antichymotrypsin // *Clin. Chem.* — 2003. — Vol. 49. — P. 746—751.
12. Kapadia C., Chang A., Sotiropoulou G. et al. Human kallikrein 13: Production and purification of recombinant protein and monoclonal and polyclonal antibodies, and development of a sensitive and specific immunofluorometric assay // *Clin. Chem.* — 2003. — Vol. 49. — P. 77—86.

13. Kapadia C., Ghosh M. C., Grass L. *et al.* Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — Vol. 323. — P. 1084—1090.
14. Kishi T., Grass L., Soosaipillai A. *et al.* Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 2771—2774.
15. Lilja H., Chritensson A., Dahlen U. *et al.* Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha-1-antichymotrypsin // *Clin. Chem.* — 1991. — Vol. 37. — P. 1618—1625.
16. Luo L.-Y., Bunting P., Scorilas A. *et al.* Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma? // *Clin. Chem. Acta.* — 2001. — Vol. 306. — P. 111—118.
17. Luo L.-Y., Katsaros D., Scorilas A. *et al.* Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 2372—2379.
18. Luo L.-Y., Katsaros D., Scorilas A. *et al.* The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 807—811.
19. Mills G. B., Bast R. S., Jr., Srivastava S. Future for ovarian cancer screening: novel markers from emerging technologies of transcriptional profiling and proteomics // *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda).* — 2001. — Vol. 93. — P. 1437—1439.
20. Mok S. C., Chao J., Skates S. *et al.* Prostate, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology // *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda).* — 2001. — Vol. 93. — P. 1458—1464.
21. Murtha P., Tindall D. J., Young C. Y. F. Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene // *Biochemistry.* — 1993. — Vol. 32. — P. 6459—6464.
22. Nelson P. S., Gan L., Fergusson C. Molecular cloning and characterization of prostate, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 3114—3119.
23. Obiezu C. V., Scorilas A., Katsaros D. *et al.* Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 2380—2386.
24. Petraki C. D., Karavana V. N., Diamandis E. P. Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study // *J. Histochem. Cytochem.* — 2003. — Vol. 51. — P. 493—501.
25. Riegman P. H. J., Vlietstra R. J., van der Korput J. A. G. M. *et al.* The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element // *Mol. Endocrinol.* — 1991. — Vol. 5. — P. 1921—1930.
26. Risch H. A. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1998. — Vol. 90. — P. 1774—1786.
27. Siewinski M., Saleh Y., Popiela A. Expression of high molecular weight cysteine proteinase inhibit ovarian cancer tissues: regulation of cathepsin B expression by placental CPI // *Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 384. — P. 1103—1107.
28. Sprem M., Babic D., Abramic M. Cathepsin D and plasminogen activator type I in normal, benign and malignant ovarian tissues. A preliminary report // *Radiol. Oncol.* — 2000. — Vol. 34. — P. 41—47.
29. Stenman U. H., Leinonen J., Alfthan H. *et al.* A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer // *Cancer Res.* — 1991. — Vol. 51. — P. 222—226.
30. Takayama T. K., Fujikawa K., Davie E. W. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen — activation by trypsin and by human glandular kallikrein // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272. — P. 21 582—21 588.
31. Underwood L. J., Tanimoto H., Wang Y. *et al.* Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease over-expressed by human carcinoma // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 4435—4439.
32. Yoshida S., Taniguchi M., Suemoto T. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1399. — P. 225—228.
33. Yousef G. M., Chang A., Diamandis E. P. Identification and characterization of KLK-L4, a new kallikrein-like gene that appears to be down-regulated in breast cancer tissues // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 11 891—11 898.
34. Yousef G. M., Diamandis E. P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease // *Endocr. Rev.* — 2001. — Vol. 22. — P. 184—204.
35. Yousef G. M., Kyriakopoulou L. G., Scorilas A. *et al.* Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: A new independent and favorable prognostic marker // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 7811—7818.
36. Yousef G. M., Obiezu C. V., Luo L.-Y. *et al.* Prostate/KLK-L1 is a new member of the human kallikrein gene family, is expressed in prostate and breast tissues, and is hormonally regulated // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 4252—4256.
37. Yousef G. M., Polymeris M.-E., Grass L. *et al.* Human kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 3958—3965.
38. Yousef G. M., Scorilas A., Diamandis E. P. Genomic organization, mapping tissue expression and hormonal regulation of trypsin-like serine protease (TLSP PRSS20), a new member of the human kallikrein gene family // *Genomics.* — 2000. — Vol. 63. — P. 88—96.
39. Yousef G. M., Scorilas A., Jung K. *et al.* Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15): up-regulation in prostate cancer // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 53—61.

Поступила 09.03.2006

T. S. Bobrova

**HUMAN KALLIKREIN GENE FAMILY: BIOLOGY AND THE ROLE IN
DEVELOPMENT OF OVARIAN CANCER AND OTHER DISEASES**

Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

Human kallikrein gene family includes 15 genes that are located in a tandem manner on chromosome 19 (19q13.4) and demonstrate a considerable homology both at gene and protein levels. Multiple kallikrein gene expression in the same tissue suggests both a variability of physiological functions of and possible interactions between these proteins. Most kallikrein genes are regulated by steroid hormones. Many kallikreins interact with circulating protease inhibitors. Prostate-specific antigen, a widely used tumor marker, is the most famous representative of the kallikrein family. It is suggested that other kallikreins may be used as markers of neoplastic and some other acute or chronic diseases. As recognized generally today, a single tumor marker cannot provide full information needed for the diagnosis, monitoring and assessment of treatment outcomes. It is thought that other markers, besides CA-125, have to be measured in ovarian cancer. In particular, high-sensitivity immunological study has demonstrated that kallikreins (hK6, hK8, hK10 and hK11) may be used as diagnostic and prognostic markers in ovarian cancer.

Key words: human kallikreins, ovarian cancer, immunological characteristics, physiological functions.
