



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανάλυση της έκφρασης, μελέτη και κλινική αξιολόγηση των
καλλικρεϊνών KLK13 και KLK15 στον καρκίνο του προστάτη**

**Expression analysis, study and clinical evaluation of kallikrein-
related peptidases KLK13 and KLK15 in prostate cancer**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΥΡΙΔΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκορίλας Ανδρέας, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Φραγκούλης Γ. Εμμανουήλ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Σίδερης Διαμάντης, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Φραγκούλης Γ. Εμμανουήλ, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Σκορίλας Ανδρέας, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Σίδερης Διαμάντης, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Μπέης Ισίδωρος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Γουργιώτης Δημήτριος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α.

Κλέτσας Δημήτριος, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Παναγιώτου Γεώργιος, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας, Ε.ΚΕ.Β.Ε

«Αλέξανδρος Φλέμιγκ»

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Άρθρο 202, Παρ. 2, Ν. 5343/32).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπλ. Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, το συνεχές ενδιαφέρον του, την επιστημονική του καθοδήγηση και τη συμπαράσταση του σε όλη την πορεία ολοκλήρωσης της παρούσας εργασίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Πρόεδρο του Τμήματος Βιολογίας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Εμμ. Φραγκούλη, για την υποστήριξη του και τις εύστοχες υποδείξεις του σε κάθε στάδιο αυτής της εργασίας. Σε αυτό το σημείο, οφείλω να ευχαριστήσω το Διευθυντή του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Ανάπλ. Καθηγητή Δ. Σίδηρη για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και το ειλικρινές ενδιαφέρον που επέδειξε κατά την περάτωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκ. Καθηγητή Κωνσταντίνο Στραβοδότη της Α΄ Πανεπιστημιακής Ουρολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Λαϊκό», τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας, και ιδιαίτερα τον Δρ. Γεώργιο Κουταλέλλη για την παροχή του βιολογικού υλικού, τη συλλογή του ιστορικού των ασθενών και την ουσιαστική συνεργασία τους.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή Ισίδωρο Μπέη, τον Καθηγητή Δημήτριο Γουργιώτη, τον Δρα Δημήτριο Κλέτσα και τον Δρα Γεώργιο Παναγιώτου για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην επταμελή επιτροπή αξιολόγησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στο σημείο αυτό δε θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου του Αναπλ. Καθηγητή Α. Σκορίλα. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στο συνάδελφο και φίλο Μαργαρίτη Αυγέρη για τη στενή και εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Μαρίκα και Ανέστη για την αδιάκοπη και ανιδιοτελή συμπαράσταση τους σε κάθε επίπεδο και σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι μέρος των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής ενισχύθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (THALES – UoA – BIOPROMO, MIS 377046).

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACT	A1-Antichymotrypsin
ACTP	Testicular Acid Phosphatase
Akt/PKB	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
ALP	Alkaline Phosphatase, Αλκαλική Φωσφατάση
AMACR	A-Methylacyl-CoA Racemase
AMP	Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
AP2M1	Adaptor-Related Protein Complex 2, Mu 1 Subunit
API5	Apoptosis Inhibitor 5
APS	Ammonium persulfate, υπερθειικό αμμώνιο
AR	Androgen Receptor, Υποδοχέας των ανδρογόνων
ATBF1/ZFH3	Zinc Finger Homeobox 3
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate, 5'-Τριφωσφορική Αδενοσίνη
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BIM	BCL2-Like 11 (Apoptosis Facilitator)
bp	Base Pairs
BPH	Benign Prostatic Hyperplasia, Καλοήθης Προστατική Υπερπλασία
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη Βόειου Ορού
CAG	Cancer associated gene
CCND2	Cyclin D2
CD44	CD44 Molecule
CDC42	Cell Division Cycle 42
CDH1	Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin (Epithelial)
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDSN	Corneodesmosin
CHECK2	Checkpoint Kinase 2
CRPC	Castration Resistant Prostate Cancer
Ct	Threshold Cycle, Κύκλος Κατωφλίου
CXCR4	Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4
CYP17	Cytochrome P450, Family 17

CYP3A4	Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 4
DDC, Ddc	L-DOPA decarboxylase, αποκαρβοξυλάση της L-DOPA
DEPC H ₂ O	Diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated H ₂ O
DGCR8	Digeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DIO1	Deiodinase, Iodothyronine, Type I
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl Sulfoxide, Διμεθυλο-Σουλφοξείδιο
dNTPs	Deoxyribonucleotides 5'-Triphosphate, 5'-Τριφωσφορικά Δεοξυριβονουκλεοτίδια
DRE	Digital Rectal Examination-DRE, Δακτυλική Εξέταση Από Το Ορθό
DSC1	Desmocollin 1
DSG1	Desmoglein 1
DTT	Dithiothreitol, Διθειοθρεϊτόλη
E2F2	E2F Transcription Factor 2
E2F3	E2F Transcription Factor 3
EDNRB	Endothelin Receptor Type B
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic, Αιθυλενο-Διαμινο-Τετραοξικό
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial To Mesenchymal Transition
EPHB2	EPH Receptor B2
ERG	V-Ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog (Avian)
ESPRC	European Randomized Study Of Screening For Prostate Cancer
ETV1	Ets Variant 1
EZH2	Enhancer Of Zeste Homolog 2
FBS	Fetal Bovine Serum
FBS	Fetal Bovine Serum, Βόειος Εμβρυϊκός Ορός
FDA	U S Food And Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
fPSA	Free PSA
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Αφυδρογονάση Της 3- Φωσφορικής Γλυκεραλδεΐδης
GSTP1	Glutathione S-Transferase Pi 1
H3.3B	H3 Histone, Family 3B (H3.3B)

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1, Alpha Subunit (Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor)
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2
HPC1/RNASEL	Hereditary Prostate Cancer 1 / Ribonuclease L (2',5'-Oligoisoadenylate Synthetase-Dependent)
HPC2/ELAC2	Hereditary Prostate Cancer 2/ Elac Homolog 2 (E. Coli)
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1, Φωσφοριβοζυλοτρανσφεράση 1 Της Υποξανθίνης
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
IFN-δ	Interferon delta
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1 (Somatomedin C)
IGF-2	Insulin-Like Growth Factor 2 (Somatomedin A)
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IMP-1	Insulin-Like Growth Factor 2 Mrna Binding Protein 1
KAI1/CD82	CD82 Molecule
KLF6	Kruppel-Like Factor 6
KLK	Kallikrein-Related Peptidase, Καλλικρεΐνη
KLKB1	Kallikrein B, Plasma (Fletcher Factor) 1
KLK-L4	Kallikrein-Like Gene 4
LEKTI	Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor
MBP	Myelin Basic Protein
miRNA, miR-	Microna
miRNA*	Συμπληρωματικό μόριο miRNA
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MSR1	Macrophage Scavenger Receptor 1
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
MXI1	MAX Interactor 1, Dimerization Protein
MYC	V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (avian)
MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NKX3.1	NK3 Homeobox 1
oligo-dT	Oligo-deoxy-thymine nucleotides
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)

p53	Tumor Protein P53
PAP	Poly(A) Πολυμεράση
PAR	Protease-Activated Receptors
PASW	Predictive Analytics Software
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS	Phosphate Buffered Saline, Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων
PCA3	Prostate Cancer Antigen 3 (Non-Protein Coding)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
Pim-1	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase pim-1
PIN	Prostate Intraepithelial Neoplasia
PON1	Paraoxonase 1
PSA	Prostate-Specific Antigen, Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο
PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
pT	pathologic Tumor stage
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTHrP	Parathyroid Hormone-Related Protein-
RAS	Rat Sarcoma
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
ROC curve	Receiver Operating Characteristic Curve
ROCK1	Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
ROX	Rhodamine-X, ROX azide, 5- isomer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQ Units	Relative Quantification Units
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SELDI-TOF	Surface-enhanced laser desorption/ionization
SRD5A2	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 2)
SIGLEC-9	Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin-9
SLC45A3	Solute Carrier Family 45, Member 3
SLMAP	Sarcolemma Associated Protein
SMAD4	SMAD Family Member 4
SMAD5	SMAD Family Member 5
SNORD48	Small Nucleolar RNA 48

SPINK5	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5
SPSS	Statistical Package For The Social Sciences
SRD5A2	Steroid-5-Alpha-Reductase, Alpha Polypeptide 2 (3-Oxo-5 Alpha-Steroid Delta 4-Dehydrogenase Alpha 2)
TBE	Tris-Hcl, Borate, EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- α	Transforming Growth Factor, Alpha
TGF- β	Transforming Growth Factor, Beta
Tm	Melting Temperature, Θερμοκρασία Τήξης
TMPRSS2	Transmembrane Protease, Serine 2
TNM	Tumors, Nodes, metastases
tPSA	Total PSA
TURP	Διουρηθρική Προστατεκτομή (Transurethral Prostatectomy/TURP)
TWIST	Twist basic helix-loop-helix transcription factor
uPA	Plasminogen Activator, Urokinase
uPAR	Plasminogen Activator, Urokinase Receptor
VDR	Vitamin D (1,25- Dihydroxyvitamin D3) Receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor, E3 Ubiquitin Protein Ligase
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
H.Π.Α.	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Το πρόβλημα του καρκίνου και η συμβολή των καρκινικών δεικτών στην αντιμετώπισή του.....	1
1.2 Ο καρκίνος του προστάτη	3
1.2.1 Γενικά στοιχεία	3
1.2.2 Παράγοντες επικινδυνότητας ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη	4
1.2.3 Παθοφυσιολογία του προστάτη αδένος	5
1.2.4 Διάγνωση του καρκίνου του προστάτη – Το πρόβλημα της διαφοροδιάγνωσης	6
1.2.5 Η πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη και το πρόβλημα του αναποτελεσματικού διαχωρισμού μεταξύ «αθώων» και επιθετικών όγκων. Η σημασία της βιοχημικής υποτροπής ως υποκατάστατο καταληκτικού σημείου (surrogate endpoint)	9
1.2.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη.....	12
1.2.7 Η μοριακή παθολογία του καρκίνου του προστάτη.....	14
1.3 Μοριακοί δείκτες για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη.....	18
1.3.1 Η καλλικρεΐνη 3 (Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο, PSA): Ένας επιτυχημένος μοριακός δείκτης υπό αμφισβήτηση.....	18
1.3.2 Νέοι μοριακοί δείκτες.....	21
1.4 Οι καλλικρεΐνες	26
1.4.1 Γενικά στοιχεία – Ιστορική αναδρομή.....	26
1.4.2 Κοινά χαρακτηριστικά των καλλικρεϊνών. Ρύθμιση της έκφρασης και της πρωτεϊνικής λειτουργίας των καλλικρεϊνών.....	28
1.4.3 Γονιδιακή οργάνωση και εναλλακτικά μετάγραφα των καλλικρεϊνών	29
1.4.4 Ο ρόλος των καλλικρεϊνών στην ανθρώπινη φυσιολογία και στην παθολογία μη νεοπλασματικών νόσων	30
1.4.5 Η συμμετοχή των καλλικρεϊνών στις ανθρώπινες νεοπλασίες.....	33
1.4.5.1 Γενικά στοιχεία	33
1.4.5.2 Ο ρόλος των καλλικρεϊνών στον καρκίνο του προστάτη	36
1.4.6 Οι καλλικρεΐνες ως καρκινικοί δείκτες.....	38
1.4.6.1 Γενικά στοιχεία	38
1.4.6.2 Οι καλλικρεΐνες ως μοριακοί δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη	41

1.4.6 Η καλλιкреΐνη 13	42
1.4.7 Η καλλιкреΐνη 15	45
1.5 ΜικροRNA (microRNAs, miRNAs) και καρκίνος	47
1.5.1 Γενικά στοιχεία. Ο διττός ρόλος των miRNAs στον καρκίνο	47
1.5.2 MiRNAs και καρκίνος του προστάτη	50
1.5.2.1 Ο ρόλος των miRNAs στη μοριακή παθολογία του καρκίνου του προστάτη	50
1.5.2.2 Τα miRNAs ως μοριακοί δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη: Πιθανές εφαρμογές στη διάγνωση και την πρόγνωση της νόσου.....	52
1.5.3 miRNA και καλλιкреΐνες.....	53
1.5.3.1 Ο ρόλος του άξονα αλληλεπίδρασης miRNA-KLKs στον καρκίνο	53
1.5.3.2 Το μικροRNA 224 (miRNA-224): Ένα miRNA ρυθμιστής της έκφρασης των καλλιкреΐνων με σημαντική συμμετοχή στις ανθρώπινες νεοπλασίες	57
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	59
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
2.1 Βιολογικό υλικό: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία	60
2.2 Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145	63
2.2.1 Ιδιότητες των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145	63
2.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145.....	65
2.2.3 Συνθήκες διατήρησης των κυτταρικών σειρών σε υγρό άζωτο και συνθήκες απόψυξης ...	66
2.3 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας και της πολλαπλασιαστικής ικανότητας της καρκινικής κυτταρικής σειράς DU145 προστάτη υπό την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων	67
2.3.1 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT....	68
2.3.2 Προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και διερεύνηση τυχόν φαινομένων νέκρωσης. Συλλογή των κυττάρων για την ομογενοποίησή τους.....	69
2.4 Ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστού προστάτη και των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη. Απομόνωση ολικού RNA	70
2.4.1 Ομογενοποίηση.....	70

2.4.2 Απομόνωση ολικού RNA	71
2.4.3 Προσδιορισμός της ποσότητας, της καθαρότητας και της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA: Φασματοφωτομετρία υπεριώδους και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	71
2.5 Πολυαδενυλίωση του ολικού RNA για την ανάλυση των μορίων miRNAs	73
2.6 Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription-RT) του mRNA και των πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs με σκοπό τη σύνθεση συμπληρωματικών μορίων DNA (cDNA).....	75
2.6.1 Αρχή της μεθόδου RT.....	75
2.6.2 Αντίστροφη μεταγραφή του mRNA	75
2.6.3 Αντίστροφη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs.	76
2.7 Συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)	76
2.7.1 Αρχή της μεθόδου PCR	76
2.7.2 Σχεδιασμός και σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στη συμβατική PCR.....	79
2.7.3 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR για τα γονίδια αναφοράς <i>GAPDH</i> και <i>HPRT1</i>	79
2.7.5 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR για το γονίδιο <i>KLK15</i>	83
2.7.6 Ηλεκτροφόρηση, ανίχνευση και ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	85
2.8 Απομόνωση και καθαρισμός προϊόντων της αντίδρασης PCR για τα γονίδια <i>KLK13</i>, <i>KLK15</i> και <i>HPRT1</i> με σκοπό την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	86
2.8.1 Απομόνωση και καθαρισμός των προϊόντων PCR από το πήκτωμα αγαρόζης	86
2.8.2 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των προϊόντων PCR και παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων	88
2.9 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR, qPCR)	88
2.9.1 Αρχές της μεθόδου qPCR	88
2.9.2 Σχεδιασμός και σύνθεση των εκκινητών και των μορίων ανιχνευτών (probes) TaqMan της qPCR.....	96
2.9.3 Αντίδραση qPCR για τα γονίδια <i>KLK13</i> , <i>KLK15</i> και <i>HPRT1</i>	99
2.9.4 Αντίδραση qPCR για το miR-224 και το SNORD48 (RNU48)	100
2.9.5 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR για τα γονίδια <i>KLK13</i> και <i>KLK15</i> με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης μέσω της χρήσης προτύπων καμπυλών.....	101

2.9.6 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR για το miR-224 με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της σύγκρισης των CT ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	102
2.10 Στύπωση Western και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης KLK13.....	103
2.10.1 Απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από δείγματα ιστών προστάτη. Φωτομετρική ανάλυση και ηλεκτροφόρηση της ολικής πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	103
2.10.2 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης KLK13	104
2.11 Βιοστατιστική ανάλυση.....	106
2.11.1 Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στις διάφορες ομάδες ασθενών. Συσχετίσεις με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	106
2.11.2 Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής αξίας των υπό μελέτη γονιδίων στον καρκίνο του προστάτη	107
2.11.3 Ανάλυση επιβίωσης ελεύθερας νόσου: Καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox.....	108
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	111
3.1 Έλεγχος ποιότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε από δείγματα ιστού προστάτη και από καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη	111
3.2 Μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων <i>KLK13</i> και <i>KLK15</i> σε δείγματα ιστού προστάτη και καρκινικές σειρές προστάτη μέσω συμβατικής PCR.....	112
3.2.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της συμβατικής PCR για την ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων αναφοράς <i>GAPDH</i> και <i>HPRT1</i> , καθώς και των γονιδίων στόχων <i>KLK13</i> και <i>KLK15</i>	112
3.2.2 Έλεγχος της έκφρασης mRNA των γονιδίων αναφοράς <i>GAPDH</i> και <i>HPRT1</i>	113
3.2.3 Μελέτη και ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου <i>KLK13</i> , σε επίπεδο mRNA, σε δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και καρκίνο του προστάτη, μέσω συμβατικής PCR.....	115
3.2.4 Μελέτη και ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου <i>KLK15</i> , σε επίπεδο mRNA, σε δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και καρκίνο του προστάτη, μέσω συμβατικής PCR.	116

3.2.5 Μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων <i>KLK13</i> και <i>KLK15</i> στις καρκινικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3 και DU145	121
3.3 Στύπωση Western και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης <i>KLK13</i> σε ιστούς προστάτη	123
3.4 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων <i>KLK13</i> και <i>KLK15</i>	124
3.4.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων qPCR	125
3.4.2 Έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR: Υπολογισμός των αποδόσεων των αντιδράσεων, του ορίου ποσοτικοποίησης και του συντελεστή μεταβλητότητας (% CV) της μεθόδου.....	125
3.5 Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK13</i> σε όγκους του προστάτη	130
3.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου <i>KLK13</i> στην καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και στον καρκίνο του προστάτη (CaP).130	
3.5.2 Μελέτη της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου <i>KLK13</i> και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη	133
3.5.3 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου <i>KLK13</i> και της επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Προσδιορισμός της προγνωστικής αξίας του γονιδίου <i>KLK13</i>	133
3.6 Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK15</i> σε όγκους του προστάτη	136
3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου <i>KLK15</i> στην καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και στον καρκίνο του προστάτη (CaP). Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας	136
3.6.2 Μελέτη της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου <i>KLK15</i> και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη	140
3.6.3 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου <i>KLK15</i> και της επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Προσδιορισμός της προγνωστικής αξίας του γονιδίου <i>KLK15</i>	141

3.7 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του miR-224	143
3.7.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του miR-224	144
3.7.2 Έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του miR-224	144
3.8 Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης του miR-224 σε όγκους του προστάτη	148
3.8.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-224 στην καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και στον καρκίνο του προστάτη (CaP). Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας	148
3.8.2 Μελέτη της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-224 και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη	152
3.8.3 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-224 και της επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Προσδιορισμός της προγνωστικής τους αξίας	153
3.9 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του miR-224 με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου στόχου του, <i>KLK15</i>	155
3.9.1 Συσχέτιση σε καρκινικές σειρές προστάτη	155
3.9.2 Συσχέτιση σε δείγματα ιστού από όγκους προστάτη	156
3.10 Μελέτη της επίδρασης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στην καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145	158
3.10.1 Προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς DU145	158
3.10.2 Διερεύνηση της βιωσιμότητας της καρκινικής κυτταρικής σειράς προστάτη DU145 παρουσία των χημειοθεραπευτικών παραγόντων docetaxel και mitoxantrone	159
3.10.3 Μελέτη της μεταβολής της έκφρασης mRNA των γονιδίων <i>KLK13</i> και <i>KLK15</i> στην καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145, υπό την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων	161
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	165
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	181
ABSTRACT	185
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	189
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	207

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το πρόβλημα του καρκίνου και η συμβολή των καρκινικών δεικτών στην αντιμετώπισή του

Ο καρκίνος αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου στις οικονομικά ανεπτυγμένες χώρες και τη δεύτερη σημαντικότερη αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ο επιπολασμός της νόσου εμφανίζει σημαντική αύξηση στις αναπτυσσόμενες χώρες, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού και της υιοθέτησης ενός «δυτικοποιημένου» τρόπου ζωής που περιλαμβάνει το κάπνισμα, την απουσία φυσικής άσκησης και την ανθυγιεινή διαίτα. Κατά τη διάρκεια του έτους 2008, περίπου 7,6 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως επήλθαν ως αποτέλεσμα του καρκίνου. Το 70% των θανάτων αυτών έπληξε χώρες που χαρακτηρίζονται από χαμηλά και μεσαία εισοδήματα [1, 2]. Οι θάνατοι προερχόμενοι από τον καρκίνο αναμένεται να ακολουθήσουν μια αυξητική τάση και υπολογίζεται ότι το έτος 2030 θα φτάσουν τα 13.1 εκατομμύρια/έτος [2].

Με τον όρο «καρκίνος» περιγράφεται μια μεγάλη και ετερογενής ομάδα ασθενειών που μπορούν να πλήξουν κάθε ιστό του ανθρωπίνου σώματος. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι η ταχεία δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων που αναπτύσσονται πέρα από το σύνηθες περιβάλλον τους, εφορμούν σε γειτονικά σημεία του σώματος και διασπείρονται, εν τέλει, σε απομακρυσμένα όργανα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μετάσταση. Η μετάσταση αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Οι κυριότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι: η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, η ακτινοβολήση του όγκου (ακτινοθεραπεία), και η χημειοθεραπεία. Οι προσεγγίσεις αυτές στοχεύουν είτε στην πλήρη θεραπεία της νόσου, είτε στην επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης [2].

Η θνησιμότητα της ιδιαίτερα επιθετικής αυτής νόσου μειώνεται δραστικά σε περιπτώσεις που επιτυγχάνεται η έγκαιρη διάγνωσή της. Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου βασίζεται σε δύο πολύ σημαντικούς πυλώνες: στην πρόωμη διάγνωση και στον προληπτικό έλεγχο του γενικού πληθυσμού (screening). Η σημασία της πρόωμης διάγνωσης έγκειται στην αντιμετώπιση της νόσου πριν αυτή εξελιχθεί σε μια πιο επιθετική και άρα μη αντιμετωπίσιμη μορφή. Ο προληπτικός έλεγχος μπορεί να οριστεί ως η συστηματική εφαρμογή μιας κλινικής δοκιμασίας στον ασυμπτωματικό πληθυσμό, που έχει ως σκοπό την έγκαιρη ταυτοποίηση ατόμων με ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, ούτως ώστε να οδηγηθούν ταχέως στις διαδικασίες της διάγνωσης

και της θεραπείας. Τα προγράμματα προληπτικού ελέγχου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για τύπους καρκίνου για τους οποίους μπορεί να εφαρμοστεί μια οικονομική, αποδεκτή και προσβάσιμη δοκιμασία ελέγχου [1-3]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα προληπτικού ελέγχου του πληθυσμού είναι το «τεστ Παπανικολάου» για τον καρκίνο του ενδομητρίου, η μαστογραφία για τον καρκίνο του μαστού και ο έλεγχος των επιπέδων του ειδικού προστατικού αντιγόνου (Prostate Specific Antigen-PSA/KLK3) για τον καρκίνο του προστάτη. Η έγκυρη πρόγνωση της νόσου αποτελεί ένα ακόμα σημείο κλειδί στην αντιμετώπιση της νόσου. Η ικανότητα αποτελεσματικής πρόβλεψης της πορείας των ασθενών (δυσμενούς ή ευμενούς), αλλά και της παρακολούθησης της θεραπευτικής τους πορείας είναι υψίστης σημασίας για την αντιμετώπιση της νόσου. Με τις διαδικασίες της πρόγνωσης και της θεραπευτικής παρακολούθησης καθίσταται εφικτή η επιλογή ατόμων που θα πρέπει να λάβουν συγκεκριμένη μορφή θεραπείας (επιθετική ή λιγότερο επιθετική), καθώς και η παρακολούθηση ή/και η πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης με σκοπό την ευέλικτη αναπροσαρμογή του θεραπευτικού σχεδιασμού [1, 2, 4].

Οι καρκινικοί δείκτες και ειδικότερα οι μοριακοί δείκτες καρκίνου αποτελούν ένα σημαντικότατο μέτρο αντιμετώπισης της νόσου, καθώς μπορούν να διαδραματίσουν κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες της πρώιμης διάγνωσης, του προληπτικού ελέγχου του γενικού πληθυσμού, της πρόγνωσης, της πρόβλεψης της θεραπευτικής ανταπόκρισης, καθώς και της παρακολούθησης της θεραπευτικής πορείας των ασθενών. Ως καρκινικός δείκτης μπορεί να οριστεί κάθε ουσία που: α) εντοπίζεται στα καρκινικά κύτταρα, ή β) παράγεται και εκκρίνεται από αυτά, ή γ) παράγεται από τον υγιή οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία του όγκου και που η ανίχνευσή της πάνω από κάποια επίπεδα σχετίζεται με την παρουσία ή/και την εξέλιξη του όγκου και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς ή/και προγνωστικούς σκοπούς. Ένας καρκινικός δείκτης θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα, υψηλή διαγνωστική ή/και προγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος, υψηλή αποτελεσματικότητα, ικανότητα διαφορικής διάγνωσης και χαμηλό κόστος προσδιορισμού [4-7].

Μέχρι και σήμερα δεν έχει βρεθεί ένας καρκινικός δείκτης που να πληροί όλα τα παραπάνω κριτήρια. Ωστόσο, η εφαρμογή των μοριακών δεικτών καρκίνου έχει βοηθήσει στο να σωθούν εκατομμύρια ζωές ανά τον κόσμο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί και η χρήση του PSA για τον καρκίνο του προστάτη με εφαρμογές στον προληπτικό έλεγχο του

ανδρικού πληθυσμού για τη νόσο, στην πρόγνωση και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν την εισαγωγή του PSA στην κλινική πράξη το ποσοστό της ανίχνευσης του καρκίνου του προστάτη σε προχωρημένο, μεταστατικό στάδιο ήταν 20,6%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σήμερα έχει πέσει στο 4,0%. Το γεγονός αυτό έχει βοηθήσει σημαντικά στον περιορισμό των επιπτώσεων του καρκίνου προστάτη, μιας νόσου που, ωστόσο, συνεχίζει να αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα τόσο σε κοινωνικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο παγκοσμίως, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω [6, 8, 9].

1.2 Ο καρκίνος του προστάτη

1.2.1 Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου για τους άνδρες των ανεπτυγμένων οικονομικά κοινωνιών, ενώ κατατάσσεται δεύτερος σε συχνότητα στον ανδρικό πληθυσμό παγκοσμίως. Αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο. Στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι το 7% των ανδρών ηλικίας άνω των 50 ετών θα διαγνωστεί με καρκίνο του προστάτη, ενώ για το 1,3% η νόσος αυτή θα αποτελέσει αιτία θανάτου. Στις Η.Π.Α., κατά το τρέχον έτος (2013) ο καρκίνος του προστάτη αναμένεται να αποτελέσει τη συχνότερη νεοπλασία στον ανδρικό πληθυσμό και τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο (Εικόνα 1.1) [1, 3].

ANAMENOMENES NEEΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ 2013 (Η.Π.Α.) ANAMENOMENOI ΝΕΟΙ ΘΑΝΑΤΟΙ ΓΙΑ ΤΟ 2013 (Η.Π.Α.)

Prostate	238,590	28%	Lung & bronchus	87,260	28%
Lung & bronchus	118,080	14%	Prostate	29,720	10%
Colorectum	73,680	9%	Colorectum	26,300	9%
Urinary bladder	54,610	6%	Pancreas	19,480	6%
Melanoma of the skin	45,060	5%	Liver & intrahepatic bile duct	14,890	5%
Kidney & renal pelvis	40,430	5%	Leukemia	13,660	4%
Non-Hodgkin lymphoma	37,600	4%	Esophagus	12,220	4%
Oral cavity & pharynx	29,620	3%	Urinary bladder	10,820	4%
Leukemia	27,880	3%	Non-Hodgkin lymphoma	10,590	3%
Pancreas	22,740	3%	Kidney & renal pelvis	8,780	3%
All Sites	854,790	100%	All Sites	306,920	100%

Εικόνα 1.1. Εκτιμήσεις για την επιδημιολογία του καρκίνου του προστάτη στις Η.Π.Α. το έτος 2013 [3].

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου είναι ότι εμφανίζεται σε συντριπτικό ποσοστό σε προχωρημένη ηλικία. Η συχνότητα και η θνησιμότητα της νόσου αυξάνουν με την πάροδο της ηλικίας και το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρείται περίπου στα 70 έτη [3]. Στρατηγικό ρόλο στην προσπάθεια αντιμετώπισης της νόσου κατέχει ο έλεγχος των επιπέδων PSA στον ορό του ασυμπτωματικού ανδρικού πληθυσμού, ενώ η τελική επιβεβαίωση της διάγνωσης γίνεται με τη λήψη και την εξέταση βιοπτικού υλικού από τον προστατικό αδένα. Σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι το ο βαθμός κακοήθειας κατά Gleason (Gleason score), το στάδιο της νόσου κατά TNM (TNM stage), τα χειρουργικά όρια (surgical margins) και το PSA, το οποίο χρησιμοποιείται και για την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών με καρκίνο του προστάτη [10-13]. Η νόσος μπορεί να αντιμετωπιστεί ικανοποιητικά με τη βασική προϋπόθεση ότι θα διαγνωστεί σε αρχικά στάδια, ενώ αν εξελιχθεί σε προχωρημένα στάδια δε δύναται να αντιμετωπιστεί με τα υπάρχοντα μέσα και η θεραπεία σε αυτήν την περίπτωση διαθέτει μόνο ανακουφιστικό ρόλο ή/και στοχεύει στην απλή παράταση του προσδόκιμου επιβίωσης. Ο καρκίνος του προστάτη αντιμετωπίζεται με την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου (active surveillance) για ασθενείς με εντοπισμένη νόσο, χειρουργική αφαίρεση του όγκου (προστατεκτομή), ορμονοθεραπεία ή/και ακτινοβολία για ασθενείς με περισσότερο προχωρημένη νόσο, και με χημειοθεραπεία για ασθενείς τελικού σταδίου με επιθετική, ορμονοανεξάρτητη και μεταστατική νόσο [10-15].

Από ιστολογικής σκοπιάς, ο όρος καρκίνος του προστάτη αναφέρεται σε ποσοστό 95% των περιπτώσεων σε αδενοκαρκινώματα. Το χαρακτηριστικό των αδενοκαρκινωμάτων του προστάτη είναι η μεγάλη ετερογένεια τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και σε κλινική συμπεριφορά [16, 17].

1.2.2 Παράγοντες επικινδυνότητας ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη

Η ηλικία, η αфро-αμερικανική καταγωγή και το οικογενειακό ιστορικό αποτελούν τους πλέον εγκαθιδρυμένους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη [18].

Αυξανόμενη της ηλικίας η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη αυξάνεται δραματικά. Είναι χαρακτηριστικό ότι μόνο 1 στους 10.000 άνδρες ηλικίας μικρότερης των 40 ετών αναμένεται να διαγνωστεί με τη νόσο, ενώ η αναλογία αυτή αυξάνεται δραματικά για τις ηλικίες 40 – 59 έτη (1 άνδρας στους 39) και ακόμα περισσότερο για τις ηλικίες 60 – 69 έτη (1

στους 14). Το 95% των ατόμων με καρκίνο του προστάτη έχει μέση ηλικία 72 έτη τη στιγμή της διάγνωσης.

Οι Αфро-Αμερικανοί έχουν κατά 56% μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν τη νόσο και είναι 2,5 φορές πιο πιθανό να πεθάνουν εξαιτίας αυτής, σε σχέση με τους άντρες καυκάσιας καταγωγής.

Άντρες που έχουν συγγενείς πρώτου βαθμού διαγνωσμένους με καρκίνο του προστάτη είναι περίπου 2 φορές πιο πιθανό να αναπτύξουν και οι ίδιοι την ασθένεια. Η πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των συγγενών και μειώνεται η ηλικία της διάγνωσης [3, 18].

1.2.3 Παθοφυσιολογία του προστάτη αδένος

Ο φυσιολογικός προστάτης αδένος αποτελείται από τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους: τα εκκριτικά κύτταρα, τα βασικά κύτταρα και τα νευροενδοκρινή κύτταρα. Η φυσιολογική λειτουργία του προστάτη αδένος είναι στενά συνδεδεμένη με την εκσπερμάτιση. Ο προστάτης αδένος εκκρίνει ένα αλκαλικό υγρό το οποίο περιέχει, κυρίως, τα παρακάτω συστατικά: τις πρωτεΐνες σπερμίνη, ινωδολυσίνη, όξινη φωσφατάση, το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), την ινωδογενάση η οποία προκαλεί την πήξη του σπέρματος, καθώς και κιτρικό οξύ, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και ψευδάργυρο. Οι εκκρίσεις του προστάτη είναι απαραίτητες για δύο σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες: τη ρύθμιση του pH του σπέρματος και την ενίσχυση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Η παρουσία ανδρογόνων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη λειτουργία του προστάτη [19-22].

Ο καρκίνος του προστάτη ξεκινά την εξάπλωσή του από την περιοχή της κορυφής ή της βάσης του αδένος ή από περιοχές όπου ο προστάτης έρχεται σε επαφή με παρακείμενα αγγεία, νεύρα ή άλλα όργανα [21, 23]. Η εξάπλωση στις σπερματοδόχους κύστες και σε άλλους ιστούς, γειτονικούς στον προστάτη, λαμβάνει χώρα σε προχωρημένα στάδια της νόσου, όπου συνήθως συνυπάρχει και διήθηση των τοπικών λεμφαδένων. Οι μεταστάσεις του προστάτη δημιουργούνται αιματογενώς και κατά κύριο λόγο στα οστά, ενώ άλλες θέσεις αιματογενούς διασποράς είναι το ήπαρ, οι πνεύμονες και σπανιότερα ο εγκέφαλος. Η λεμφική οδός μετάστασης περιλαμβάνει το ένδο- και περι-προστατικό πλέγμα, καθώς και τους λαγόνιους, και προϊερούς λεμφαδένες [19, 20].

Εκτός από τον καρκίνο του προστάτη, οι σημαντικότερες παθολογικές καταστάσεις που επηρεάζουν τον αδένος είναι η καλοήγησ προστατική υπερπλασία (Benign Prostatic Hyperplasia-

BPH) και οι διάφορες φλεγμονές που περιγράφονται με το γενικό όρο προστατίτιδες. Οι ασθένειες αυτές είναι αντιμετωπίσιμες, ωστόσο δημιουργούν το σημαντικότερο πρόβλημα της διαφοροδιάγνωσης με τον καρκίνο του προστάτη όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω [12, 22, 24].

1.2.4 Διάγνωση του καρκίνου του προστάτη – Το πρόβλημα της διαφοροδιάγνωσης

Στον ασυμπτωματικό ανδρικό πληθυσμό άνω των 50 ετών, ή άνω των 40 ετών σε περιπτώσεις με οικογενειακό ιστορικό, η ετήσια δακτυλική εξέταση (Digital Rectal Examination-DRE) για την ανίχνευση ύποπτης σκληρίας στον αδένα και η μέτρηση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (Prostate Specific Antigen- PSA/καλλικρεΐνη 3/KLK3) στον ορό αποτελούν τις πλέον ακολουθούμενες διαδικασίες προληπτικού ελέγχου. Σε περίπτωση που εντοπιστούν θετικά ευρήματα, ακολουθεί η, κατευθυνόμενη με διορθικό υπερηχογράφημα, βιοψία προστάτη [25, 26].

Κυρίαρχο ρόλο στο τομέα της διάγνωσης των προστατικών νεοπλασιών κατέχει το PSA. Το PSA αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο καρκινικό δείκτη στην κλινική πράξη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει μια μεγάλη συζήτηση σχετικά με την πραγματική χρησιμότητά του. Από τη μια πλευρά, σύμφωνα με στοιχεία της American Cancer Society, για το έτος 2009 το ποσοστό της νόσου που εντοπίστηκε σε προχωρημένα μεταστατικά στάδια ήταν μόλις 4.0%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό το 1990 έφτανε το 20,6%. Η μεγάλη αυτή διαφορά αποδίδεται, μεταξύ άλλων παραγόντων, στην ένταξη της εξέτασης του PSA στην καθημερινή κλινική πράξη [9, 25, 27]. Επιπρόσθετα, μια μεγάλης έκτασης ευρωπαϊκή μελέτη για τον καρκίνο του προστάτη (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer- ESPRC) αναφέρει ότι από τη στιγμή που εισήλθε το PSA στην κλινική πράξη, έχει παρατηρηθεί μείωση της θνησιμότητας της νόσου κατά 31% [13]. Από την άλλη πλευρά, έχει αναπτυχθεί μια κριτική στάση απέναντι στη χρήση του PSA, η οποία εστιάζει, κυρίως, στη μειωμένη ειδικότητα που παρουσιάζει ως βιοδείκτης. Η μειωμένη ειδικότητα του PSA οφείλεται στο γεγονός ότι αυξημένα επίπεδα του μορίου αυτού ανιχνεύονται και στο αίμα ασθενών που πάσχουν από μη καρκινικές αλλοιώσεις, όπως η καλοήθης προστατική υπερπλασία (BPH) και οι προστατίτιδες. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί όλες οι παθολογικές καταστάσεις που προαναφέρθηκαν, νεοπλασματικές και μη, έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή της αρχιτεκτονικής του προστάτη αδένα με επακόλουθο τα μόρια του PSA να ξεφεύγουν στην κυκλοφορία του αίματος, όπου και ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα. Επομένως, οι αυξημένες τιμές του PSA στην καλοήθη

υπερπλασία και στις προστατίτιδες μειώνουν σημαντικά τη διαγνωστική του ειδικότητα και οδηγούν στην ύπαρξη πολλών ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και στη διενέργεια επαναλαμβανόμενων βιοψιών που θα μπορούσαν να αποφευχθούν [9, 12, 24, 25, 28].

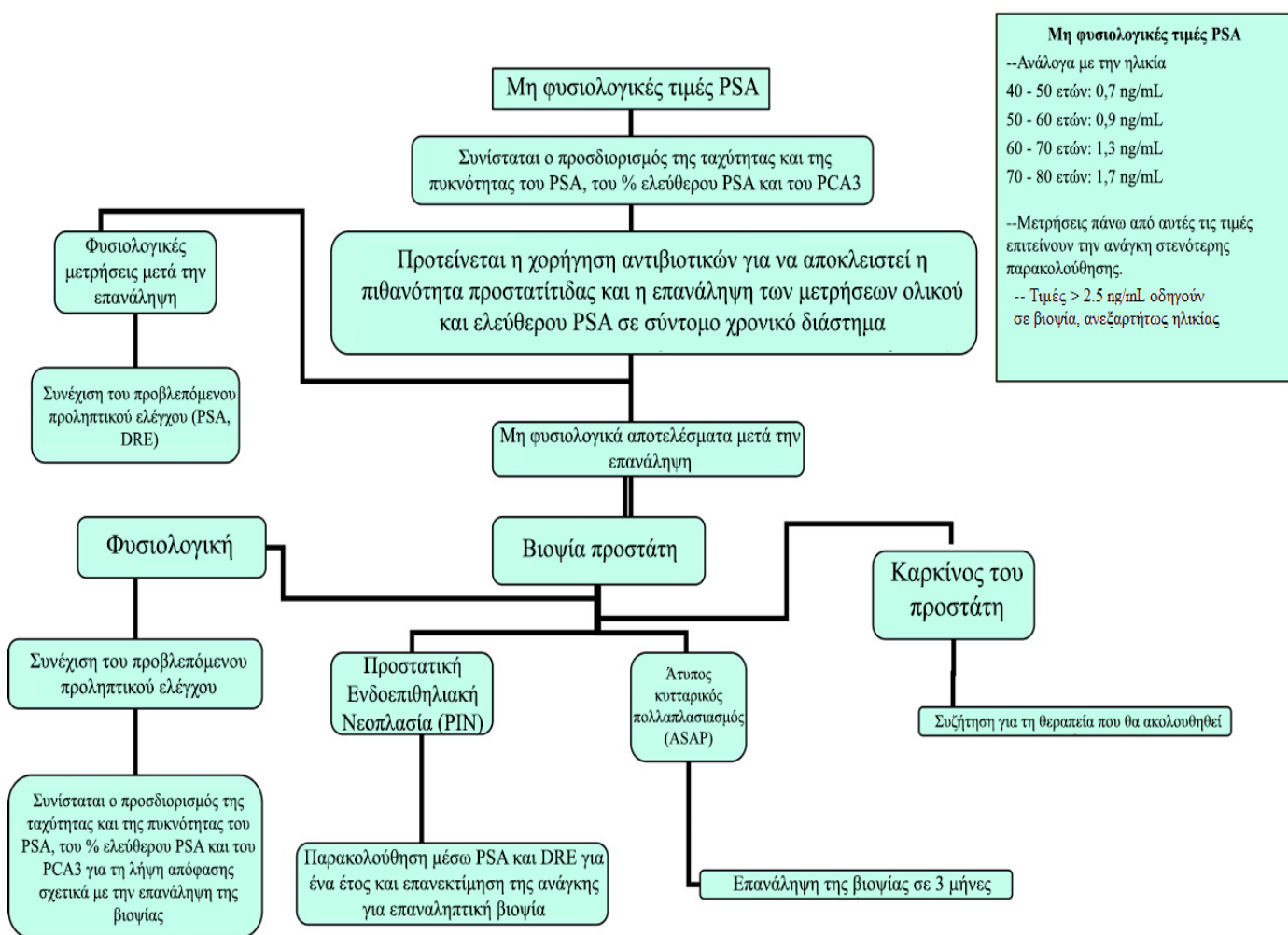
Στο σημείο αυτό θα ήταν δόκιμο να αναφερθούν κάποια δεδομένα για τις μη νεοπλασματικές καταστάσεις που προκαλούν προβλήματα στη διαφορική διάγνωση με τον καρκίνο του προστάτη: την καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και τις προστατίτιδες [12, 24].

Η καλοήγη υπερπλασία του προστάτη είναι μια από τις συχνότερες ασθένειες των ανδρών μέσης και προχωρημένης ηλικίας. Η BPH αναπτύσσεται σχεδόν αποκλειστικά στην μεταβατική ζώνη του αδένου, σε αντιπαράθεση με τον καρκίνο του προστάτη που αναπτύσσεται συνήθως στην περιφερική ζώνη. Τα συμπτώματα της νόσου δεν είναι ειδικά, καθώς μπορεί να είναι κοινά με αυτά του καρκίνου, της προστατίτιδας, νευρολογικών παθήσεων ή σακχαρώδους διαβήτη. Η δακτυλική εξέταση και η μέτρηση του PSA αποτελούν και σε αυτή την περίπτωση κομβικά σημεία της κλινικής εξέτασης. Οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση της BPH καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα επιλογών που περιλαμβάνει από την απλή παρακολούθηση, μέχρι τη φαρμακευτική αντιμετώπιση μέσω ανταγωνιστών των α -αδρενεργικών υποδοχέων, που προκαλούν χάλαση των λείων μυϊκών ινών του προστάτη και της ουρήθρας με αποτέλεσμα να επέρχεται μείωση της τάσης αυτών, και αναστολέων του ενζύμου της 5 α -ρεδουκτάσης (αναστολή σύνθεσης διυδροτεστοστερόνης), καθώς και χειρουργική αντιμετώπιση με διουρηθρική προστατεκτομή (Transurethral prostatectomy/TURP) ή ανοικτή προστατεκτομή [21, 22, 24].

Οι προστατίτιδες αφορούν ένα σύνολο παθήσεων με συμπτώματα από το κατώτερο ουροποιητικό, χωρίς συγκεκριμένη και ενιαία αιτιοπαθογένεια και κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: στην οξεία βακτηριακή προστατίτιδα, στη χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα, στη χρόνια μη βακτηριακή προστατίτιδα και στην ασυμπτωματική προστατίτιδα. Η αντιμετώπισή τους γίνεται, αναλόγως με την περίπτωση, με τη χρήση αντιβιοτικών, αντιφλεγμονωδών σκευασμάτων ή α -αναστολέων [21, 22].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι τιμές PSA μπορούν να επηρεαστούν σημαντικά από τις προαναφερθείσες παθολογικές καταστάσεις. Φυσιολογικές τιμές PSA θεωρούνται, πλέον, οι μετρήσεις $\leq 2,5$ ng/mL, αν και σήμερα προτείνεται, η καθιέρωση ορίων αναφοράς σε σχέση με την ηλικία. Το μεγαλύτερο πρόβλημα εμφανίζεται με τις τιμές PSA που εμπίπτουν στη λεγόμενη

«γκρίζα ζώνη», δηλαδή στην περιοχή 2,5-10 ng/mL. Οι τιμές αυτές μπορεί να θεωρηθούν φυσιολογικές, να είναι αποτέλεσμα ύπαρξης μη νεοπλασματικής παθολογίας, ή ακόμα και να είναι ενδεικτικές της ύπαρξης ενός καρκινικού όγκου στον αδένα. Επομένως, η μεγάλη δυσκολία που προκύπτει είναι η ορθή διαχείριση ενός πιθανού θετικού αποτελέσματος κατά την εξέταση του PSA. Η πολυπλοκότητα που επηρεάζει τη λήψη απόφασης μετά από μια μη φυσιολογική τιμή PSA φαίνεται στην Εικόνα 1.2. Όσον αφορά τις περιπτώσεις τιμών που εμπίπτουν στη γκρίζα ζώνη συνίσταται η εξέταση επιπρόσθετων παραμέτρων, όπως η διόρθωση της τιμής PSA σε σχέση με το μέγεθος του αδένα, η μεταβολή του PSA με το χρόνο δεδομένης της μέτρησης σε μεταγενέστερο χρονικό διάστημα, η τιμή του λόγου ελεύθερο προς ολικό PSA, και αν κριθεί αναγκαίο προτείνεται στον ασθενή η διενέργεια βιοψίας [9, 15, 26, 28].



Εικόνα 1.2. Αλγόριθμος για τη λήψη αποφάσεων μετά από μια μη φυσιολογική μέτρηση επιπέδων ολικού PSA στον ορό [26].

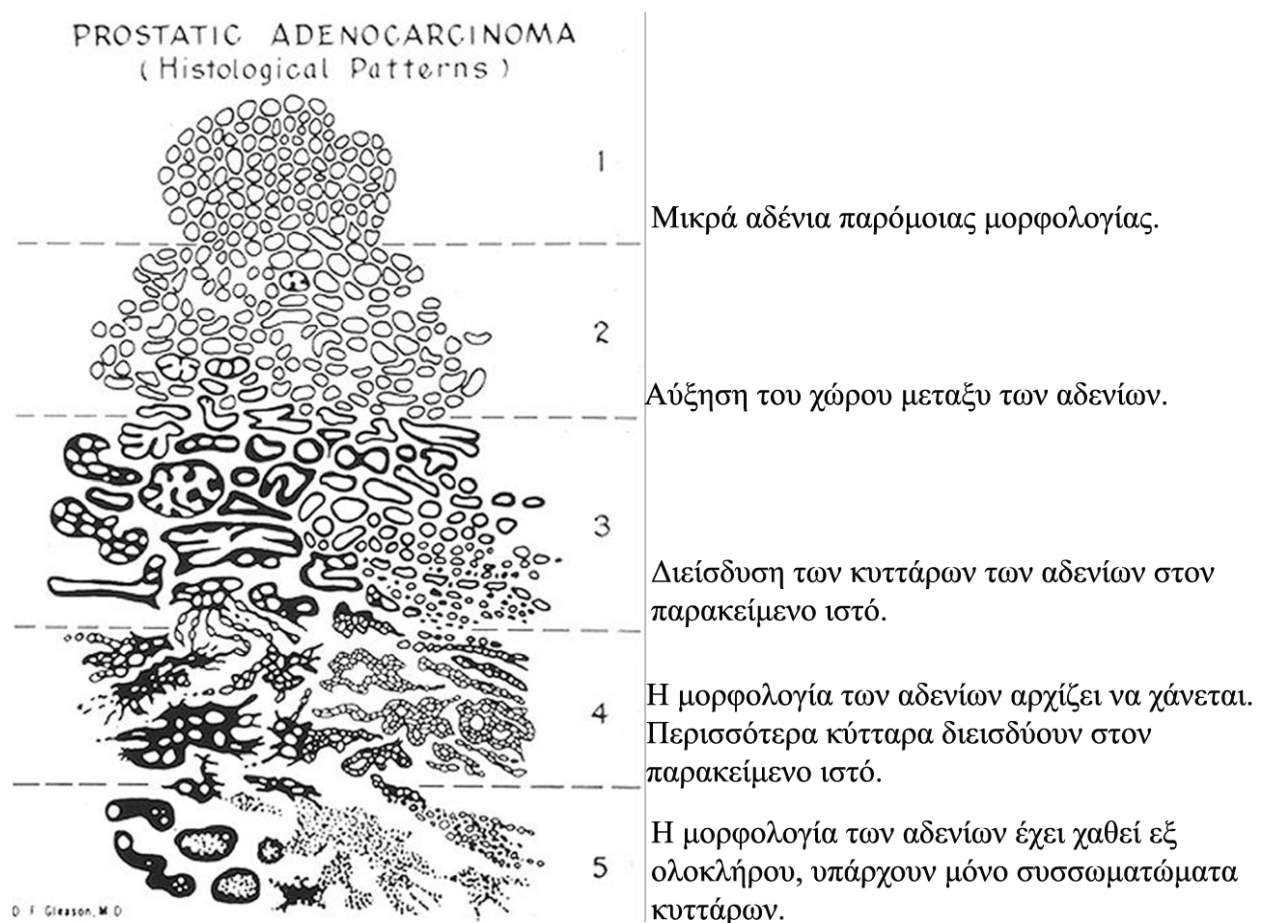
Η βιοψία διενεργείται με τη βοήθεια του διορθικού υπερηχογραφήματος. Αν η εστιακή βλάβη δεν απεικονίζεται υπερηχογραφικά, λαμβάνεται βιοπτικό υλικό τυχαία 6-12 φορές από προκαθορισμένες περιοχές του προστάτη. Η βιοψία αποτελεί σήμερα το μόνο εργαλείο για να επιβεβαιωθεί η κλινική υποψία και να τεθεί η τελική διάγνωση. Επιπρόσθετα, ποικίλες απεικονιστικές μέθοδοι μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στη μελέτη των αλλοιώσεων σε διάφορες ζώνες του αδένου και ιδιαίτερα στην εντόπιση μεταστάσεων σε άλλα σημεία του σώματος. Από τις μεθόδους αυτές, σημαντικότερη θεωρείται το διορθικό υπερηχογράφημα, το οποίο μπορεί να παράσχει μια λεπτομερή απεικόνιση του προστάτη για τη μελέτη της εσωτερικής αρχιτεκτονικής των ζωνών του αδένου, για τον έλεγχο της ακεραιότητας της προστατικής κάψας και των σπερματοδόχων κύστεων, καθώς και για τυχόν εξωπροστατική επέκταση της νόσου [25, 26, 29].

1.2.5 Η πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη και το πρόβλημα του αναποτελεσματικού διαχωρισμού μεταξύ «αθώων» και επιθετικών όγκων. Η σημασία της βιοχημικής υποτροπής ως υποκατάστατο καταληκτικού σημείου (surrogate endpoint)

Η καθοδηγούμενη με βάση τις μετρήσεις PSA ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη, μπορεί να οδηγήσει πολλές φορές σε λάθος αποφάσεις σχετικά με την αντιμετώπιση της νόσου. Αυτό συμβαίνει γιατί, σε πολλές περιπτώσεις, είναι δύσκολο να διακριθούν οι λιγότερο επιθετικοί (αθώοι-indolent) όγκοι, που ενδέχεται να μη χρειάζονται θεραπευτική αντιμετώπιση από τους περισσότερους επιθετικούς όγκους που θα πρέπει να αντιμετωπίζονται άμεσα. Το αποτέλεσμα είναι το φαινόμενο που περιγράφεται με τον όρο overdiagnosis, δηλαδή η διάγνωση περιστατικών καρκίνου που δεν έχουν κλινική σημασία. Αποτέλεσμα της overdiagnosis είναι η χορήγηση θεραπείας σε μη επιθετικά περιστατικά καρκίνου για τα οποία δεν είναι αναγκαίος ο συγκεκριμένος θεραπευτικός χειρισμός (overtreatment). Επιπρόσθετα, κανένας από τους χρησιμοποιούμενους προγνωστικούς δείκτες δεν μπορεί να παράσχει μια σαφή εικόνα της πορείας που πρόκειται να ακολουθήσει η νόσος σε όλες τις υποκατηγορίες των ασθενών [9, 15, 28, 30]. Επομένως, η πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη είναι ένα πεδίο που σίγουρα επιδέχεται βελτιώσεων.

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα στην πρόγνωση της νόσου είναι, με σειρά σημαντικότητας, ο βαθμός της αποδιαφοροποίησης των δομών του αδένου, που ονομάζεται βαθμός κακοήθειας κατά Gleason (Gleason Score), το στάδιο της νόσου, τα θετικά χειρουργικά όρια και τα προεγχειρητικά επίπεδα PSA στον όρο [10, 31-33].

Ο ισχυρότερος προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του προστάτη σήμερα είναι το Gleason score. Όσο μεγαλύτερο Gleason score παρουσιάζει ένας ασθενής τόσο χειρότερη είναι η πρόγνωση της νόσου. Οι δεκαετίες πιθανότητες εξέλιξης της νόσου είναι <25% για Gleason Score = 2-4 (υψηλή διαφοροποίηση), ~50% για Gleason Score = 5-7 (μέση διαφοροποίηση) και ≥75% για Gleason Score >8 (χαμηλή διαφοροποίηση). Για τον προσδιορισμό του Gleason Score εκτιμάται η μορφολογία και η αρχιτεκτονική διάταξη των κακοηθών αδένων, οι οποίοι ταξινομούνται με βαθμούς 1-5 (Εικόνα 1.3). Λόγω όμως της ετερογένειας του όγκου πρέπει να εκτιμηθούν οι δυο προεξάρχουσες μορφές ανάπτυξης και ως εκ τούτου το αποτέλεσμα προκύπτει ως άθροισμα με τιμές, θεωρητικά, από 2 (1+1) έως 10 (5+5) [34].



Εικόνα 1.3. Η κατάταξη των καρκινικών όγκων με βάση το σύστημα Gleason. Η εικόνα είναι το αρχικό σχέδιο που κατασκευάστηκε από τον Donald F. Gleason (1920 – 2008) [34].

Το στάδιο της νόσου αποτελεί έναν ακόμα ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της επιβίωσης από τη νόσο. Η σταδιοποίηση της νόσου μπορεί να είναι κλινική (πριν το

χειρουργείο) ή παθολογοανατομική (μετά το χειρουργείο) (Πίνακας 1.1). Για την κλινική σταδιοποίηση χρησιμοποιούνται, εκτός της διορθικής βιοψίας, η δακτυλική εξέταση, το διορθικό υπερηχογράφημα, τα επίπεδα PSA, η αξονική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα οστών. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση που λαμβάνει χώρα μετά τη ριζική προστατεκτομή αξιοποιεί ακριβείς πληροφορίες για την διήθηση των λεμφαδένων, της προστατικής κάψας, των σπερματοδόχων κύστεων και των περιπροστατικών νεύρων. Η έκταση της τοπικής νόσου εκτιμάται από το διορθικό υπερηχογράφημα, ενώ η τοπική διήθηση και η μετάσταση από το σπινθηρογράφημα, την αξονική και τη μαγνητική τομογραφία [10, 35-37].

Πίνακας 1.1. Η σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη με βάση το παθολογοανατομικό στάδιο (pathologic Tumor stage, pT stage).

Στάδιο	Περιγραφή
pT2	Ο καρκινικός όγκος περιορίζεται στον προστάτη
pT2a	Ο καρκινικός όγκος εκτείνεται στο μισό, ή και λιγότερο, του ενός λοβού του προστάτη
pT2b	Ο καρκινικός όγκος εκτείνεται στο μισό του ενός λοβού του προστάτη αλλά όχι και στους δύο λοβούς
pT2c	Ο καρκινικός όγκος εκτείνεται και στους δύο λοβούς του προστάτη
pT3	Ο καρκινικός όγκος εκτείνεται πέραν του προστάτη
pT3a	Ο καρκινικός όγκος εκτείνεται πέραν της προστατικής κάψας
pT3b	Ο καρκινικός όγκος διηθεί τα σπερματικά αγγεία
pT4	Ο καρκινικός όγκος διηθεί ιστούς πέραν των σπερματικών αγγείων όπως την ουροδόχο κύστη, τους ανελκτήρες μύες ή/και το πυελικό τοίχωμα.

Η εκτίμηση των χειρουργικών ορίων αναφέρεται στο εάν με τη ριζική αφαίρεση του προστάτη έχει απομακρυνθεί πλήρως ο καρκινικός ιστός. Ασθενείς στους οποίους ο καρκίνος του προστάτη έχει φτάσει στα χειρουργικά όρια (θετικά χειρουργικά όρια), παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν υποτροπή [10].

Τα προεγχειρητικά επίπεδα PSA στον ορό μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την πρόγνωση της νόσου. Ασθενείς με επίπεδα PSA < 4 ng/mL, εμφανίζουν εντοπισμένη νόσο και καλή πρόγνωση, σε σχέση με ασθενείς με επίπεδα PSA > 10ng/mL όπου αναμένεται να υπάρχει διάσπαση της προστατικής κάψας. Ασθενείς με PSA > 50ng/mL εμφανίζουν συχνά θετικούς λεμφαδένες, ενώ σε ασθενείς με επίπεδα PSA > 100ng/mL ανιχνεύονται οστικές μεταστάσεις και έχουν πολύ φτωχή πρόγνωση [10, 31, 37].

Αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από τους παραπάνω προγνωστικούς δείκτες, τα νομογράμματα, δηλαδή ειδικοί αλγόριθμοι που χρησιμοποιούν πληθώρα προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών δεδομένων, θεωρούνται από πολλούς ίσως το πιο αξιόπιστο προγνωστικό εργαλείο για τον καρκίνο του προστάτη, καθώς και έναν αποτελεσματικό τρόπο για να αποφασιστεί η βέλτιστη θεραπεία που θα πρέπει να ακολουθηθεί [38].

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη η εξέλιξη-επανεμφάνιση της νόσου (υποτροπή), καθορίζεται από την παρουσία της βιοχημικής υποτροπής. Η βιοχημική υποτροπή ορίζεται ως η μετεγχειρητική εμφάνιση δύο διαδοχικών μετρήσεων $PSA \geq 0,2 \text{ ng/mL}$. Μετά τη ριζική προστατεκτομή οι τιμές PSA πέφτουν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (PSA-nadir). Η απότομη και επιμένουσα αύξηση των τιμών PSA αποτελεί ένα πολύ αξιόπιστο σημάδι επανεμφάνισης της νόσου, πριν την κλινική της εμφάνιση. Επομένως, από τα παραπάνω συμπεραίνεται η θεμελιώδης σημασία του PSA ως δείκτη παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, η οποία μάλιστα θεωρείται ότι είναι πολύ μεγαλύτερη από την όποια διαγνωστική του αξία [31, 32, 39].

1.2.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη

Η αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο του προστάτη είναι ιδιαίτερα ετερογενής, καθώς εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων όπως: α) το στάδιο της νόσου β) ο βαθμός επιθετικότητας του όγκου, γ) η ηλικία του ασθενή δ) τα συνυπάρχοντα νοσήματα και ε) το προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενή. Δεδομένου ότι η νόσος συνήθως παρουσιάζει αργή εξέλιξη, σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας ή σε ασθενείς με μικρό προσδόκιμο επιβίωσης δεν απαιτείται ριζική αντιμετώπιση [19, 37, 40]. Παρακάτω αναφέρονται με λεπτομέρειες οι θεραπευτικές επιλογές που είναι διαθέσιμες για τις διάφορες κατηγορίες ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Για τους ασθενείς με εντοπισμένη νόσο και μικρό βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου, δεν απαιτείται επιθετική θεραπευτική αντιμετώπιση και συνήθως συνίσταται η παρακολούθηση της νόσου (watchful waiting). Ωστόσο, όλοι οι ασθενείς με όγκους σταδίου T1b-T2c ή όγκους σταδίου T1a και υψηλό βαθμό αποδιαφοροποίησης, θα πρέπει να λαμβάνουν ριζική θεραπεία. Η ριζική προστατεκτομή αποτελεί την πλέον αποτελεσματική μέθοδο αντιμετώπισης του κλινικά εντοπισμένου καρκίνου του προστάτη. Η 10ετής επιβίωση ελεύθερης υποτροπής μετά τη ριζική προστατεκτομή μπορεί να φτάσει έως το 75%. Η εξωτερική ακτινοβολήση αποτελεί άλλη μια θεραπευτική επιλογή της κλινικά εντοπισμένης νόσου, ενώ έδαφος κερδίζει τελευταία και η

ενδοϊστική ακτινοθεραπεία με εμφυτεύματα ισοτόπων χαμηλής ενέργειας αλλά και ο συνδυασμός ακτινοθεραπείας με ανδρογονικό αποκλεισμό [19, 41-43] .

Η αντιμετώπιση της τοπικά προχωρημένης νόσου, δηλαδή σταδίου T3 απαιτεί το συνδυασμό ανδρογονικού αποκλεισμού και ριζικής προστατεκτομής. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με πλήρη ανδρογονικό αποκλεισμό όταν η νόσος έχει επεκταθεί σε τέτοιο βαθμό που η χειρουργική αντιμετώπιση είναι δύσκολη. Σε περιπτώσεις που υπάρχουν διηθημένοι λεμφαδένες απαιτείται άμεση έναρξη του ανδρογονικού αποκλεισμού που ακολουθείται από ριζική προστατεκτομή ή ακτινοθεραπεία [43, 44].

Η αντιμετώπιση της μεταστατικής νόσου έχει παρηγορητικό χαρακτήρα και στοχεύει στην επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης και τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής. Αρχικά η θεραπεία έχει ως στόχο τον ανδρογονικό αποκλεισμό είτε μέσω αναστολής της δράσης του υποδοχέα των ανδρογόνων (Androgen Receptor-AR) είτε μέσω αναστολής της σύνθεσης των ανδρογόνων και κυρίως της διυδροτεστοστερόνης είτε με χημικό είτε με ανατομικό ευνουχισμό. Ο ανδρογονικός αποκλεισμός αρχικά καθυστερεί την εξέλιξη της νόσου [43]. Ωστόσο, από ένα σημείο και έπειτα, τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται ανθεκτικά στις παραπάνω θεραπείες, αναπτύσσοντας μοριακούς μηχανισμούς (παρουσιάζονται στην παράγραφο 1.2.7) που τους επιτρέπουν να ανταπεξέλθουν και να συνεχίσουν να αναπτύσσονται παρά τον ανδρογονικό αποκλεισμό. Η κατάσταση αυτή αντιπροσωπεύει ένα προχωρημένο στάδιο της νόσου που ονομάζεται ανθεκτικός στον ευνουχισμό καρκίνος του προστάτη (Castration Resistant Prostate Cancer-CRPC) και χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα. Σε αυτό το στάδιο η χορήγηση χημειοθεραπείας, αποτελεί τη μόνη αποτελεσματική προσέγγιση [14, 45-48]. Συγκεκριμένα, οι χημειοθεραπευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι το docetaxel και το mitoxantrone. Το docetaxel είναι μια ταξάνη που ανήκει στην κατηγορία των μιτωτικών αναστολέων οι οποίοι προσδένονται με υψηλή συγγένεια στους μικροσωληνίσκους, σταθεροποιούν τη μιτωτική άτρακτο και παρεμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση. Σε ασθενείς που αποτυγχάνει η θεραπεία με docetaxel χρησιμοποιείται η πρόσφατα εγκεκριμένη ταξάνη cabazitaxel η οποία έχει τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Το mitoxantrone ανήκει στην οικογένεια των ανθρακινόνων και επιτελεί το κυτταροστατικό του έργο κυρίως μέσω αναστολής της τοποϊσομεράσης τύπου II, παρεμποδίζοντας τη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA. Παρά το γεγονός ότι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών το τελικό αποτέλεσμα, σε κάθε περίπτωση, είναι η επαγωγή της απόπτωσης [14, 45-50]. Πρόσφατα, εγκρίθηκε και η

ανοσοθεραπεία sipuleucel-T για το μεταστατικό, ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη. Η ανοσοτροποποιητική αυτή θεραπεία αυτή αποτελεί το πρώτο εγκεκριμένο «εμβόλιο» για την αντιμετώπιση του καρκίνου [51].

1.2.7 Η μοριακή παθολογία του καρκίνου του προστάτη

Το χαρακτηριστικό του καρκίνου του προστάτη, όπως και της πλειονότητας των νεοπλασματικών νόσων άλλωστε, είναι η ετερογένεια, η οποία είναι περισσότερο εμφανής σε μοριακό επίπεδο. Η μοριακή παθολογία του καρκίνου του προστάτη είναι ιδιαίτερα δαιδαλώδης, καθώς εμπλέκονται πολλαπλά και αλληλεπιδρώντα γονίδια, αλλά και αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που οδηγούν αρχικά σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και καταλήγουν στη δημιουργία ενός διηθητικού-επιθετικού καρκινικού όγκου. Οι μοριακές αλλαγές που ενυπάρχουν στο γενετικό υλικό ή που επισυμβαίνουν κατά την εξέλιξη της νόσου επηρεάζουν την έκφραση και τη λειτουργία σημαντικών γονιδίων, καθώς και τη σύνθεση και τη δράση πρωτεϊνών κομβικής σημασίας για τη λειτουργία του κυττάρου. Ένας τρόπος κατηγοριοποίησης του καρκίνου του προστάτη είναι σε σποραδικό, που αφορά στην πλειονότητα των περιπτώσεων, και σε κληρονομικό [17, 23, 52, 53].

Ο κληρονομικός καρκίνος του προστάτη αφορά μόλις το 10% του συνόλου των περιπτώσεων. Έχει υπολογιστεί ότι η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη είναι διπλάσια για άνδρες που έχουν συγγενή πρώτου βαθμού που φέρει τη νόσο, σε σχέση με άνδρες που δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου προστάτη [54, 55]. Τα γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με τις μεγαλύτερες πιθανότητες ανάπτυξης της νόσου είναι το *HPC1/RNASEL* που βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 1q24-25, το *HPC2/ELAC2* στη χρωμοσωμική θέση 17p12-13 και το *MSR1* στη χρωμοσωμική θέση 8p22-23. Το γονίδιο *HPC1/RNASEL* κωδικοποιεί την ενδοριβονουκλεάση L (RNase L), μια πρωτεΐνη η έκφραση της οποίας επάγεται από ιντερφερόνες, συμμετέχει σε αντιϊκές και προαποπτωτικές λειτουργίες, και φαίνεται να έχει ογκοκατασταλτική δράση. Έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο γονίδιο υφίσταται μεταλλάξεις που οδηγούν σε μειωμένη ενζυμική ενεργότητα της RNaseL σε όγκους προστάτη. Ορισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις συνδέονται σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης προστατικού καρκίνου. Το γονίδιο *HPC2/ELAC2* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ELAC2 η οποία συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA και την ωρίμανση του mRNA. Αρκετοί πολυμορφισμοί του γονιδίου αυτού συνδέονται με τον κληρονομικό καρκίνο του προστάτη σε συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Το γονίδιο *MSR1* κωδικοποιεί έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα, ο οποίος μεσολαβεί στην πρόσδεση, την πρόσληψη και την επεξεργασία μακρομορίων του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο *MSR1*, συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη σε Αфро-Αμερικανούς. Τα προαναφερθέντα γονίδια έχουν συσχετισθεί με μια σημαντική αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης προστατικού καρκίνου, ωστόσο οι μεταλλάξεις τους είναι αρκετά σπάνιες. Αντίθετα, έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια τα οποία έχουν συνδεθεί με μέτρια πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, ενώ οι πολυμορφισμοί τους εμφανίζουν μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν, μεταξύ άλλων, το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων *AR*, το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D, *VDR*, το γονίδιο *SRD5A2* που κωδικοποιεί την 5α-ρεδουκτάση τύπου II, η οποία καταλύει την μετατροπή της τεστοστερόνης σε διυδροτεστοστερόνη, το γονίδιο *PON1* που κωδικοποιεί την παραοξονάση του ορού, η οποία μειώνει τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *BRCA2* που συνδέεται με την επιδιόρθωση του DNA [17, 23, 54-56].

Η σποραδική μορφή αφορά τη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων του καρκίνου του προστάτη και παρουσιάζει σαφώς μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε μοριακό επίπεδο [23, 52]. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, είναι πιθανόν ο καρκίνος του προστάτη να αναπτύσσεται σε πρωταρχικό στάδιο από πολυδύναμα αρχέγονα καρκινικά κύτταρα (stem cells), ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα αρχικά καρκινικά κύτταρα προέρχονται από τον πληθυσμό των βασικών κυττάρων του αδένα [57]. Σε κάθε περίπτωση, για την ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου στον προστάτη απαιτείται μια σειρά μοριακών γεγονότων. Ως προ-καρκινική κατάσταση έχει αναγνωριστεί η προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Prostate Intraepithelial Neoplasia/PIN). Πολλές υποθέσεις έχουν αναπτυχθεί για να εξηγήσουν την καρκινογένεση στον προστάτη και την εξάπλωση των νεοπλασματικών όγκων του αδένα [52, 58]. Από τις πιο ενδιαφέρουσες είναι οι παρακάτω: α) ο ρόλος του υποδοχέα των ανδρογόνων (*AR*) [59, 60], β) η ενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκογονιδίων, γ) η απενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων [17, 53], δ) η οξειδωτική βλάβη [61], και ε) η χρωμοσωμική αστάθεια [53, 56].

Τα ανδρογόνα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τη λειτουργία του προστάτη αδένα. Όπως έχει αναφερθεί, ο ανδρογονικός αποκλεισμός αποτελεί μια σημαντική θεραπευτική επιλογή για τον περιορισμό του καρκίνου του προστάτη. Ωστόσο, παρά την αρχική ανταπόκριση στην θεραπεία, τα καρκινικά κύτταρα σταματούν να ανταποκρίνονται στον ανδρογονικό αποκλεισμό. Είναι λογικό να υποτεθεί ότι υπό την πίεση του ανδρογονικού αποκλεισμού

αποκτάται από τα καρκινικά κύτταρα η ικανότητα να διαιρούνται απουσία ανδρογόνων. Είναι γεγονός ότι η ανθεκτικότητα στον ανδρογονικό αποκλεισμό οφείλεται κυρίως στη μη φυσιολογική ενεργοποίηση μορίων ή μοριακών μονοπατιών του AR [49, 50, 59, 60]. Οι κυριότεροι μοριακοί μηχανισμοί αντίστασης στον ανδρογονικό αποκλεισμό είναι οι παρακάτω:

- α) η αύξηση της έκφρασης των ενζύμων της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών στα καρκινικά κύτταρα,
- β) η υπερέκφραση του AR μέσω γεγονότων γονιδιακής επέκτασης,
- γ) η πρόκληση μεταλλάξεων που αυξάνουν την ευαισθησία και τη λειτουργικότητα του AR,
- δ) η ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης που δρουν καταρροϊκά του AR,
- ε) η ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών που παρακάμπτουν την αναγκαιότητα του AR (π.χ. ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών μονοπατιών),
- στ) η παρουσία προστατικών καρκινικών βλαστικών κυττάρων (prostate cancer stem cells) τα οποία δεν εκφράζουν τον AR [49].

Η απενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην πλειονότητα των ανθρώπινων νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη. Μια από τις πρώτες αλλαγές που αναγνωρίζονται κατά την ανάπτυξη της νόσου είναι η μείωση της έκφρασης του γονιδίου *GSTP1* μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Το γονίδιο *GSTP1* κωδικοποιεί το ισοένζυμο π της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες. Το γονίδιο *NKX3.1* κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στον καρκίνο του προστάτη και η απώλεια της έκφρασής του απαντάται πολύ συχνά στη νόσο και οφείλεται σε απαλοιφή της χρωμοσωμικής περιοχής 8p21. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *EDNRB* (Endothelin B Receptor) παρουσιάζεται, επίσης, σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης στον καρκίνο του προστάτη λόγω υπερμεθυλίωσης. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* κωδικοποιεί μια λιπιδική φωσφατάση, η οποία καταστέλλει τις δράσεις της κινάσης της 3-φωσφοϊνοσιτόλης (PI3K), και αναστέλλει το Akt/PKB μονοπάτι, το οποίο δρα ενισχύοντας την κυτταρική επιβίωση και αναστέλλοντας την απόπτωση. Ελλείψεις και μεταλλάξεις του *PTEN* εμφανίζονται κυρίως στη μεταστατική νόσο. Το γονίδιο *MXI1* εμφανίζει ογκοκατασταλτική δράση, κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη που προσδένεται και αναστέλλει την πρωτεΐνη MYC, προϊόν του *c-MYC* πρωτο-ογκογονιδίου. Έχει βρεθεί μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *MXI1* όπως και στο γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, καθώς και στα γονίδια *KLF6*, *ATBF1* και *EPHB2* τα οποία

διαθέτουν κι αυτά ογκοκατασταλτική δράση. Μειωμένη έκφραση παρουσιάζουν και γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική προσκόλληση και τη διακυτταρική επικοινωνία. Η απώλεια της έκφρασης των γονιδίων αυτών διευκολύνει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση. Τα γονίδια αυτά είναι το *CDH1* το οποίο κωδικοποιεί για την Ε-καδερίνη, και τα *KAI1* και *CD44* που κωδικοποιούν για μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες [16, 17, 23, 52, 53, 62].

Η ενεργοποίηση ογκογόνων μοριακών μονοπατιών στον καρκίνο του προστάτη είναι συνήθως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης συγκεκριμένων ογκογονιδίων. Συχνά παρατηρείται υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες 1 και 2 (IGF-1, IGF-2) και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-α και -β (TGF-α, TGF-β). Παράλληλα, παρατηρείται και αύξηση της έκφρασης των αντίστοιχων υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Σημαντικό ρόλο έχει και η ενίσχυση του ογκογονιδίου *MYC*, η οποία παρατηρείται στο 8% των πρώιμων όγκων του προστάτη και σε μεγαλύτερο ποσοστό των επιθετικών μορφών της νόσου. Ταυτόχρονη ενίσχυση της έκφρασης με το ογκογονίδιο *MYC* παρουσιάζει και το γονίδιο *PSCA* (Prostate Stem Cell Antigen). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της υπερέκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μεταγραφικούς παράγοντες *ERG* και *ETV1*. Τα γονίδια *ERG* (χρωμοσωμική θέση: 21q22.3) και *ETV1* (χρωμοσωμική θέση: 7p21.2), ενεργοποιούνται από γενετικό ανασυνδυασμό ο οποίος συνδέει το 3' άκρο του κάθε γονιδίου με το 5' άκρο του ανδρογόνο-ρυθμιζόμενου γονιδίου *TMPRSS2* (χρωμοσωμική θέση: 21q22.2), το οποίο κωδικοποιεί μια προστατική πρωτεάση σερίνης. Αποτέλεσμα αυτού του ανασυνδυασμού η δημιουργία μιας ογκοπρωτεΐνης σύντηξης. Η υπερέκφραση των γονιδίων *ERG* και *ETV1* έχει βρεθεί τόσο στην τοπική όσο και την μεταστατική νόσο, αλλά όχι στις πρώιμες αλλοιώσεις τύπου PIN. Υπερέκφραση έχει παρατηρηθεί και για το αντιαποπτωτικό γονίδιο *BCL2*, κυρίως στην επιθετική νόσο [16, 17, 23, 52, 53, 56, 62].

Εκτός από τις περιπτώσεις που προαναφέρθηκαν, άλλες δύο ενδιαφέρουσες υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί σχετικά με την καρκινική εξαλλαγή στον προστάτη είναι αυτές της χρωμοσωμικής αστάθειας και της οξειδωτικής βλάβης. Η οξειδωτική βλάβη παρουσιάζεται ως ένα πρωταρχικό μοριακό γεγονός κατά την καρκινογένεση στον προστάτη και κεντρικό ρόλο στην υπόθεση αυτή κατέχει η απενεργοποίηση του γονιδίου *GSTP1* μέσω υπερμεθυλίωσης [61]. Η χρωμοσωμική αστάθεια είναι ένα κυρίαρχο χαρακτηριστικό των επιθηλιακών νεοπλασιών και

συνήθως προκαλείται από την μείωση του μήκους των τελομερών. Έχει ανακαλυφθεί ότι οι ελλείψεις του γενετικού υλικού είναι πολύ πιο συχνές και γίνονται σε πιο πρώιμα στάδια, σε σχέση με τον επέκτασή του. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία βρίσκονται στις περιοχές των ελλείψεων, είναι περισσότερο απαραίτητη για την καρκινογένεση στον προστάτη, από την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων η οποία απαντάται κυρίως σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου. Οι χρωμοσωμικές περιοχές 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 13q, 16q, 17q και 18q υφίστανται, κυρίως, απαλοιοφές, ενώ επεκτάσεις παρατηρούνται στις περιοχές 7p/q, 8q και Xq [23, 53, 56].

Νεότερα δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι καλλικρεΐνες αλλά και η ρύθμιση μέσω μικρομοριακών RNA (miRNA) κατέχουν σημαντικότατο ρόλο στην μοριακή παθολογία του καρκίνου του προστάτη [63]. Διεξοδική περιγραφή του ρόλου τους ακολουθεί σε μεταγενέστερο κεφάλαιο (1.5) καθώς αποτελούν κύριο στοιχείο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

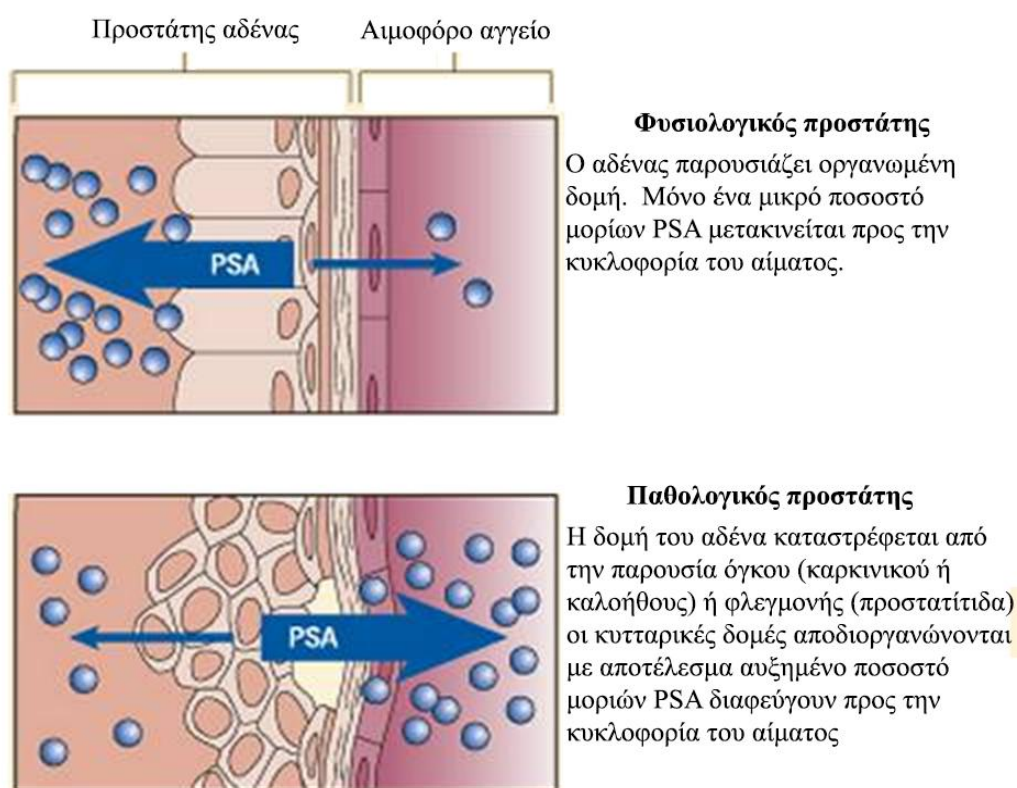
1.3 Μοριακοί δείκτες για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη

Τα τελευταία χρόνια αρκετοί μοριακοί δείκτες έχουν προταθεί για τον προληπτικό έλεγχο του γενικού πληθυσμού, τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη-παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, με σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη [8]. Γεγονός είναι ότι παρά την κριτική που δέχεται τον τελευταίο καιρό η χρήση του PSA, ο προσδιορισμός του αποτελεί τον πλέον χρησιμοποιούμενο και σε πολλές περιπτώσεις το μοναδικό μοριακό δείκτη για τον καρκίνο του προστάτη [9, 13, 28]. Στο σημείο αυτό θα περιγραφούν επικαιροποιημένα δεδομένα τόσο για το PSA όσο και για τους σημαντικότερους προτεινόμενους μοριακούς δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη.

1.3.1 Η καλλικρεΐνη 3 (Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο, PSA): Ένας επιτυχημένος μοριακός δείκτης υπό αμφισβήτηση

Ο οριστικός χαρακτηρισμός του PSA πραγματοποιήθηκε από τους Wang *et. al.* το 1979, οπότε και αποδείχθηκε η ταύτιση του με διάφορα πρωτεϊνικά αντιγόνα που είχαν προσδιοριστεί σε προγενέστερο χρονικό διάστημα [64]. Το 1980, για πρώτη φορά έγινε προσδιορισμός του PSA στον ορό ασθενών με καρκίνο του προστάτη και αμέσως μετά αναπτύχθηκε η πρώτη enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) μεθοδολογία για τη μέτρησή του. Το 1986 εγκρίθηκε από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Η.Π.Α. (U.S. Food and Drug Administration / FDA) η μέτρηση των επιπέδων PSA στον ορό για την παρακολούθηση

διαγνωσμένων ασθενών με καρκίνο του προστάτη και το 1994 εγκρίθηκε η χρήση του ως εργαλείο για την πρώιμη διάγνωση για τον προληπτικό έλεγχο του αντρικού πληθυσμού ηλικίας >50 ετών [65-67]. Μέχρι και σήμερα, παρά τις όποιες αντιρρήσεις και τις εύλογες ενστάσεις σχετικά με τη διαγνωστική ειδικότητα του PSA και την υπερβολική ανίχνευση μη επιθετικών περιστατικών (Εικόνα 1.4) που σε άλλη περίπτωση δε θα χρειαζόντουσαν θεραπεία (overdiagnosis-overtreatment), ο προσδιορισμός των επιπέδων του PSA του ορού, θεωρείται μια απαραίτητη εξέταση για την καθοδήγηση της πρώιμης διάγνωσης και την παροχή προγνωστικής πληροφορίας για τους ασθενείς με καρκίνο προστάτη [28, 65-68].



Εικόνα 1.4. Οι αυξημένες τιμές PSA που ανιχνεύονται στις παθολογικές καταστάσεις του προστάτη είναι αποτέλεσμα της καταστροφής της αρχιτεκτονικής δομής του αδένα και για το λόγο αυτό δεν είναι ενδεικτικές μόνο της παρουσίας καρκίνου, αλλά μπορεί να είναι αποτέλεσμα και ενός καλοήθους όγκου ή μιας φλεγμονής (προστατίτιδα).

Όσον αφορά τη χρήση του PSA στην πρώιμη διάγνωση του προστατικού καρκίνου αρκεί να αναφερθεί ότι ο μαζικός έλεγχος του ανδρικού πληθυσμού μέσης ηλικίας, είχε ως αποτέλεσμα την δραματική αύξηση του ρυθμού ανίχνευσης της νόσου, τη διάγνωσή της σε

αρχικά στάδια και την αύξηση της επιβίωσης των ασθενών με προστατικό καρκίνο. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές παραθέτουν δεδομένα που αναφέρουν ότι η όποια αύξηση της επιβίωσης των ασθενών δεν οφείλεται στο PSA, αλλά στη βελτιστοποίηση των χειρουργικών και άλλων θεραπευτικών τεχνικών, ενώ αντιθέτως το PSA οδηγεί στην υπερανίχνευση περιστατικών τα οποία δεν έχουν κάποιο όφελος από τη θεραπεία [9, 28, 30]. Είναι γεγονός ότι το PSA αποτελεί ένα επιτυχημένο μοριακό εργαλείο για την ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη, όμως οι αποφάσεις που βασίζονται στις μετρήσεις PSA θα πρέπει να λαμβάνονται με ιδιαίτερη προσοχή και αφού ενημερωθεί ο ασθενής κατάλληλα για τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των επακόλουθων χειρισμών. Είναι αδιαμφισβήτητο ότι το PSA δεν παρουσιάζει μεγάλη αποτελεσματικότητα ως διαγνωστικό εργαλείο για τον καρκίνο του προστάτη. Η προγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος για το PSA έχει υπολογιστεί στο 37%. Επίσης, ασθενείς με τιμές που εμπίπτουν στη γκριζα ζώνη έχουν πιθανότητα 25% να πάσχουν από καρκίνο του προστάτη, ο οποίος δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί μέσω προσδιορισμού του PSA. Επιπρόσθετα, το ποσοστό των ασθενών με καρκίνο και με τιμές $PSA < 4 \text{ ng/mL}$ ανέρχεται στο 15%. Επομένως, εκτός από τη μείωση του ορίου λήψης απόφασης στα $2,5 \text{ ng/mL}$, έχουν προταθεί συγκεκριμένες βελτιώσεις που μπορούν να αυξήσουν τη διαγνωστική ικανότητα του PSA, ιδιαίτερα στην περιοχή που ονομάζεται «γκρίζα ζώνη» και όπου η λήψη αποφάσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολη [9, 13, 26-28, 30]. Το 1991 οι Stenman *et al.* [69] και Lilja *et al.* [70] διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με προστατικό καρκίνο, εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό του PSA συμπολοκοποιημένο με την α1-αντιχυμοθρυψίνη (σύμπλοκο PSA-ACT) σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες ή ασθενείς με καλοήγη υπερπλασία. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη χρήση του λόγου $\%fPSA = \text{ελεύθερο PSA (fPSA)} / \text{ολικό PSA (tPSA)}$ ο οποίος βελτιώνει σημαντικά την διαγνωστική ειδικότητα του PSA [69-72]. Το 1998 ο FDA ενέκρινε τον προσδιορισμό του $\%fPSA$. Τιμές του $\%fPSA > 0,20$ με tPSA στην «γκρίζα ζώνη», υποδεικνύουν την ύπαρξη καλοηθών αλλοιώσεων του προστάτη, ενώ τιμές $< 0,15$ οδηγούν στην υποψία παρουσίας καρκίνου. Η πυκνότητα του PSA (PSA density), δηλαδή ο λόγος της συγκέντρωσης του PSA του πλάσματος προς τον όγκο του προστάτη αδένος, προσδιοριζόμενου από το διορθικό υπερηχογράφημα, μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της ειδικότητας του PSA. Η παρατηρούμενη αύξηση των τιμών PSA στην καλοήγη προστατική υπερπλασία και με την πάροδο της ηλικίας, συνοδεύεται από την προοδευτική αύξηση του μεγέθους του αδένος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η τιμή της πυκνότητας του PSA να είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς με

καρκίνο του προστάτη. Άτομα με τιμές πυκνότητας $> 0,15$ θα πρέπει να υποβάλλονται σε βιοψία. Ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης του PSA (PSA velocity), δηλαδή η ετήσια αύξηση των τιμών του PSA στον ορό μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως δεδομένο για τη λήψη απόφασης για τη διενέργεια βιοψίας. Άτομα με ρυθμό αύξησης PSA $> 0,3 - 0,5$ ng/mL/έτος, συνίσταται να υποβάλλονται σε βιοψία. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι τα επίπεδα του PSA αυξάνονται με την ηλικία, καθώς αυξάνει και το μέγεθος του αδένου οι τιμές αναφοράς του PSA θα πρέπει να ορίζονται ανάλογα με την ηλικία [9, 27, 28, 68, 73, 74].

Όσον αφορά τη χρήση του PSA στην πρόγνωση και την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, αξίζει να αναφερθεί ότι είναι κοινώς αποδεκτό ότι η προγνωστική αξία του PSA είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη διαγνωστική του αξία. Είναι χαρακτηριστικό ότι η αρχική χρήση του PSA του ορού ήταν για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Η συγκέντρωση του PSA του ορού σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, το στάδιο της νόσου και την ανταπόκριση στην θεραπεία. Γενικά, θεωρείται ότι κάθε επιτυχής θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης του PSA του ορού ενώ η αύξησή των επιπέδων PSA πάνω από ένα επίπεδο μετά τη θεραπεία ορίζεται ως βιοχημική υποτροπή και είναι σαφές σημάδι κλινικής υποτροπής της νόσου. Η βιοχημική υποτροπή (επαναλαμβανόμενα μετεγχειρητικά PSA επίπεδα $\geq 0,2$ ng/mL) ασθενών που έχουν υποβληθεί σε ριζική προστατεκτομή προηγείται σημαντικά (6-18 μήνες) της κλινικής εξέλιξης της νόσου, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη θεραπευτική αντιμετώπιση. Επιπρόσθετα, η ταχύτητα αύξησης του PSA αποτελεί και ένα χρήσιμο δείκτη της επιθετικότητας του προστατικού καρκίνου και της ανταπόκρισης στην θεραπεία, ενώ και ο χρόνος διπλασιασμού του PSA (PSA doubling time) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ανταπόκρισης στην θεραπεία και την πρόγνωση της πορείας των ασθενών έπειτα από αυτή [8, 39, 75, 76].

1.3.2 Νέοι μοριακοί δείκτες

Οι παραδοσιακές μέθοδοι για τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη εμφανίζουν σημαντικούς περιορισμούς. Τα μειονεκτήματα του PSA έχουν δημιουργήσει την ανάγκη εξεύρεσης περισσότερο ειδικών μοριακών δεικτών ούτως ώστε να αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και να περιοριστούν οι περιπτώσεις χορήγησης επιθετικής θεραπείας σε ασθενείς με βραδέως αναπτυσσόμενους, «αθώους» όγκους [9, 68]. Σήμερα, είναι πλέον αποδεκτό ότι η ετερογένεια της νόσου δεν επιτρέπει τη στρατηγική της μίας και μοναδικής αντιμετώπισης και η έννοια της εξατομικευμένης ιατρικής του καρκίνου αποκτά

ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο του προστάτη [4, 5]. Επιπρόσθετα, οι προγνωστικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα (κλινικό στάδιο, Gleason score) δε μπορούν να προβλέψουν απόλυτα την πορεία της νόσου και, καθώς βασίζονται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, δε μπορούν να εναρμονιστούν με τη μεγάλη ετερογένεια της νόσου η οποία είναι έκδηλη σε μοριακό επίπεδο [4-6, 44].

Η μέτρηση του ολικού PSA έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα χρήσιμο διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο, ωστόσο έχει αρκετά μειονεκτήματα, τα οποία έχουν αναφερθεί προηγουμένως [9, 28]. Οι νέοι μοριακοί δείκτες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο προς την κατεύθυνση της εξατομικευμένης ιατρικής του καρκίνου του προστάτη [77, 78]. Οι περισσότεροι υποσχόμενοι νέοι μοριακοί δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη παρουσιάζονται παρακάτω.

Οι καλλικρεΐνες (KLKs) είναι μια ομάδα 15 πρωτεασών σερίνης οι οποίες συνδέονται με πληθώρα ανθρώπινων νεοπλασιών και έχουν προταθεί ως καρκινικοί δείκτες για πολλές από αυτές, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη. Ο ρόλος των καλλικρεΐνών ως μοριακοί δείκτες του καρκίνου του προστάτη θα αναπτυχθεί διεξοδικά σε ξεχωριστό σημείο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι μελέτες που βασίζονται σε μετρήσεις της καλλικρεΐνης 2 (KLK2) στον ορό του αίματος δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική βελτίωση στην αποτελεσματικότητα της διάγνωσης όταν χρησιμοποιείται η KLK2 μαζί με το ολικό PSA. Επιπλέον, η KLK2 φαίνεται να παρέχει βελτιωμένη, συγκρινόμενη με το PSA, προγνωστική πληροφορία, σχετικά με τη βιοχημική υποτροπή της νόσου. Συνοπτικά αναφέρεται ότι άλλες καλλικρεΐνες με διαγνωστική ή/και προγνωστική αξία στον καρκίνο του προστάτη είναι οι KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK11, KLK14 και KLK15 [27, 79, 80].

Το καρκινικό προστατικό αντιγόνο 3 (PCA3), που είναι επίσης γνωστό με το όνομα DD3, εκφράζεται αποκλειστικά και μάλιστα σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του προστάτη. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μεθοδολογίες μέτρησης του mRNA του γονιδίου *PCA3* στα ούρα. Χρησιμοποιώντας τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *PCA3* και τη συγκέντρωση του PSA για κανονικοποίηση, προκύπτει μια τιμή που ονομάζεται PCA3 score. Μια μεγάλη μελέτη που πρόέκυψε από τη συνεργασία πολλών εργαστηρίων χρησιμοποιώντας το PCA3 score σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του προστάτη οδήγησε σε μια καμπύλη ROC ευαισθησίας-ειδικότητας σημαντικά βελτιωμένη σε σχέση με αυτή του PSA. Η ευαισθησία του PCA3 υπολογίστηκε στο 58% και η ειδικότητα στο 72%. Το διαγνωστικό αυτό test έχει μεγάλη δυναμική, μπορεί να βελτιώσει τις μετρήσεις του PSA και έχει μεγαλύτερη δυναμική όταν

χρησιμοποιείται σε ένα πάνελ καρκινικών δεικτών. Το Φεβρουάριο του 2012 ο προσδιορισμός του PCA3 εγκρίθηκε από τον FDA με σκοπό τη διευκόλυνση της λήψης απόφασης για επαναληπτική βιοψία στον προστάτη σε άνδρες με προηγούμενες αρνητικές βιοψίες [8, 77, 81].

Το ειδικό προστατικό μεμβρανικό αντιγόνο (Prostate-Specific Membrane Antigen-PSMA) είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα επιθηλιακά κύτταρα του καρκινικού προστατικού ιστού. Έχει αναπτυχθεί μια ραδιοϊστοχημική μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεΐνης αυτής, η οποία είναι διαθέσιμη εμπορικά. Επιπλέον, έχει ελεγχθεί το δυναμικό του PMSA ως θεραπευτικού στόχου χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι αυτής της πρωτεΐνης συζευγμένα με ραδιοϊσότοπα. Η χρήση του PMSA δεν έχει εισαχθεί ακόμα στην κλινική πράξη και ο ρόλος του ως διαγνωστικό εργαλείο και ως θεραπευτική στρατηγική είναι υπό μελέτη [8, 77].

Η α -Μεθυλακυλ-CoA-Ρακεμάση (α -Methylacyl-CoA racemase -AMACR) είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στον οξειδωτικό μεταβολισμό και τη σύνθεση λιπαρών οξέων με διακλαδιζόμενη αλυσίδα. Αναλύσεις μικροσυστοιχειών έδειξαν ότι το AMACR υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη. Μια διαφορετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία πολλών εργαστηρίων έδειξε ότι ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της AMACR συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ καλοήθους και καρκινικού ιστού με 97% διαγνωστική ευαισθησία και 92% διαγνωστική ειδικότητα. Επιπλέον, η μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης AMACR φαίνεται να έχει προγνωστική αξία όσον αφορά τη βιοχημική υποτροπή της νόσου. Επιπρόσθετα, οι αυξημένες συγκεντρώσεις αυτό-αντισωμάτων για την AMACR βοηθούν στην ανίχνευση ασθενών με καρκίνο του προστάτη στη γκρίζα ζώνη με 62% διαγνωστική ευαισθησία και 72% διαγνωστική ειδικότητα [8, 77, 78].

Ο προσδιορισμός των μορίων του ενεργοποιητή και του υποδοχέα της ουροκινάσης του πλασμινογόνου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη. Η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου και η ενεργοποίηση του καταρράκτη αντιδράσεων του συστήματος της ουροκινάσης του πλασμινογόνου φαίνεται ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται στην ενεργοποιημένη του μορφή, την πλασμίνη, μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεάσης σερίνης- ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου uPA και της σύνδεσης της στον uPA υποδοχέα (uPAR). Η ανίχνευση των ισομορφών του uPA παράλληλα με το PSA και την καλικρεΐνη 2 παρέχει αυξημένη ικανότητα πρόβλεψης του

αποτελέσματος της βιοψίας, σε ασθενείς με αυξημένες τιμές PSA. Αυξημένες συγκεντρώσεις του uPAR σε καρκινικούς ιστούς προστάτη έχουν συνδεθεί με μετάσταση του όγκου στα οστά. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε αυξημένες τιμές στις συγκεντρώσεις των uPA και uPAR στο αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο στα οστά. Έτσι, τα μόρια uPA και uPAR μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μετάστασης στα οστά (ο πιο συχνός μεταστατικός τύπος για τον καρκίνο του προστάτη), βιοχημικής υποτροπής και να βοηθήσουν να μεταβληθεί η θεραπευτική στρατηγική ώστε να γίνει πιο επιθετική [77].

Οι μεταβολές των επιπέδων των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων (insulin-like growth factors- IGFs) και των πρωτεϊνών που προσδέονται σε αυτούς (IGFBPs) στον ορό του αίματος συνδέονται με τον καρκίνο του προστάτη. Η οικογένεια των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων περιλαμβάνει δύο μόρια προσδέτες (IGF-1, IGF-2), δύο υποδοχείς (IGFR-1, IGFR-2) και έξι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στα μόρια αυτά (IGFBPs 1–6) και ρυθμίζουν αρνητικά τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Αυξημένες συγκεντρώσεις του IGF-1 συνδέονται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη. Η κύρια πρωτεΐνη της οικογένειας IGFBP που παράγεται στον προστάτη, η IGFBP-2, συνδέεται αντιστρόφως με το μέγεθος του όγκου και την επιθετικότητα της νόσου. Επιπλέον, η συγκέντρωση της IGFBP-3 στον ορό συνδέεται αντιστρόφως με την ύπαρξη μετάστασης στα οστά [77].

Οι γονιδιακές ανακατατάξεις αποτελούν συχνό φαινόμενο στον καρκίνο. Μια τέτοια ανακατάταξη, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην περιγραφή της μοριακής παθολογίας του προστάτη, περιλαμβάνει τα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων *ERG* (21q22.2) και *ETV1* (7p21.1) καθώς και το γονίδιο της διαμεμβρανικής πρωτεάσης σερίνης *TMPRSS2* (21q22.3). Αυτή η ανακατάταξη ή ακριβέστερα γονιδιακή συγχώνευση βρέθηκε ότι υφίσταται στο 80% των καρκίνων του προστάτη. Τα προϊόντα αυτής της γονιδιακής σύντηξης (mRNA μετάγραφα ή/και πρωτεΐνη) βρέθηκαν στο 42% των ασθενών με καρκίνο προστάτη, στο 20% με ενδοθηλιακή προστατική νεοπλασία (PIN), και σχεδόν σε μηδενικό ποσοστό στην καλοήγη προστατική υπερπλασία. Μια μελέτη που έγινε σε βάθος 9 χρόνων και σε 252 ασθενείς σταδίων T2a/b κατέδειξε ότι η *TMPRSS2:ERG* γονιδιακή ανακατάταξη, συνδέεται περισσότερο από την *TMPRSS2:ETV1*, με επιθετική-μεταστατική νόσο και με μειωμένη επιβίωση. Μια εναλλακτική μορφή της *TMPRSS2:ERG* γονιδιακής ανακατάταξης έχει ανιχνευθεί στο 80-95% των καρκινικών ιστών προστάτη και ενδεχομένως να αποτελεί θεραπευτικό στόχο [8, 77, 78].

Το γονίδιο *EZH2* (ενισχυτής του γονιδίου *Zeste Homolog 2*) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των polycomb πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Η *EZH2* πρωτεΐνη παράγεται σε υψηλότερο βαθμό σε μεταστατικούς καρκίνους παρά σε εντοπισμένους όγκους ή σε καλοήθεις καταστάσεις του αδένου. Επιπρόσθετα, αυτός ο δείκτης αποδείχτηκε καλύτερος από το Gleason score και το PSA στον καθορισμό της εξέλιξης της νόσου. Η χρήση του δείκτη αυτού σε συνδυασμό με την E-καδερίνη, φαίνεται ότι μπορεί να προβλέψει αποτελεσματικά την υποτροπή της νόσου μετά την τοπική θεραπεία. Η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας μέτρησης αυτής της πρωτεΐνης στον ορό θα βοηθούσε στην εγκαθίδρυση του δείκτη αυτού ως μοριακού δείκτη παρακολούθησης πιθανών μεταστάσεων [8, 77, 78].

Η μειωμένη έκφραση του *GSTP1* γονιδίου λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του έχει συσχετισθεί με τον καρκίνο του προστάτη και ο προσδιορισμός της στο ίζημα των ούρων έχει προταθεί ως δείκτης αναγκαιότητας για τη διενέργεια βιοψίας [77, 78].

Η αποκαρβοξυλάση της 3,4-διϋδροξυ-L-φαινυλαλανίνης (*L-DOPA Decarboxylase*, DDC, Ddc) συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών και πιθανόν της σεροτονίνης (5-υδροξυτρυπταμίνη) [82]. Μεταξύ άλλων διαδικασιών, η DDC εμπλέκεται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών προστατικών κυττάρων, πιθανώς μέσω της ενίσχυσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα των ανδρογόνων [83, 84]. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *DDC* παρουσιάζονται αυξημένα σε καρκινικούς όγκους προστάτη σε σχέση με καλοήθεις όγκους, καθώς και σε προστατικές νεοπλασίες προχωρημένου σταδίου και αυξημένου Gleason score [85]. Πρόσφατα, η έκφραση του γονιδίου *DDC* προσδιορίστηκε ως ένας νέος ανεξάρτητος δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για τον καρκίνο του προστάτη [85, 86].

Η πολλαπλή ταυτόχρονη ανάλυση των πρωτεϊνών στα βιολογικά υγρά του σώματος, σε ιστούς και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, μέσω της πρωτεωμικής, αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων μοριακών δεικτών. Επιπλέον, η τεχνολογία φασματογραφίας μάζας SELDI-TOF επιτρέπει την κατασκευή πρωτεϊνικού προφίλ για βιολογικά δείγματα. Για τον καρκίνο του προστάτη έχει ανιχνευθεί ένα πρωτεϊνικό αποτύπωμα όπως προκύπτει από τη φασματογραφία μάζας, το οποίο είναι ικανό να ανιχνεύει ασθενείς με νεοπλασία του προστάτη και να τους ξεχωρίζει από τον υγιή πληθυσμό με 83% ευαισθησία και 97% ειδικότητα. Η μεθοδολογία αυτή έχει ακολουθηθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες με

παρόμοια αποτελέσματα όμως το δεύτερο στάδιο επαλήθευσης αυτών των αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκε με δια-εργαστηριακό έλεγχο παρουσίασε δυσκολίες [77].

Τα τελευταία χρόνια η χρήση νομογραμμάτων κερδίζει έδαφος ως εργαλείο για την πρόβλεψη της πορείας της νόσου. Τα νομογράμματα είναι στατιστικά εργαλεία που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μεταβλητών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, όπως το στάδιο του όγκου, ο βαθμός αποδιαφοροποίησης του και τα επίπεδα διαφόρων μοριακών δεικτών, ούτως ώστε να παρέχεται ένα πλήρες προφίλ για τον κάθε ασθενή. Για τη κατασκευή των νομογραμμάτων χρησιμοποιούνται στοιχεία που έχουν αποδειχθεί και επαληθευτεί μέσα από επιστημονικές μελέτες, με σκοπό τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία, λαμβάνοντας υπόψη το στάδιο της νόσου του κάθε ασθενή, ούτως ώστε να αντιμετωπίζεται η νόσος όσο πιο αποτελεσματικά γίνεται. Αρκετά νομογράμματα έχουν κατασκευαστεί κυρίως για την πρόβλεψη της βιοχημικής υποτροπής της νόσου [33, 38, 77]. Στην ίδια λογική με τα νομογράμματα, η ταυτόχρονη χρήση πολλών καρκινικών δεικτών φαίνεται ότι βελτιώνει την ικανότητα διάγνωσης αρκετών νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη. Η ετερογένεια της νόσου δυσκολεύει τη σαφή διάκριση των σταδίων του καρκίνου του προστάτη, τα οποία ποικίλουν από άτομο σε άτομο λόγω της έμφυτης διαφορετικότητας του κάθε ασθενή. Έτσι, η χρησιμοποίηση ενός πάνελ μοριακών δεικτών φαίνεται η πλέον κατάλληλη στρατηγική για τον έλεγχο του αντρικού πληθυσμού, καθώς αυξάνονται σημαντικά οι πιθανότητες σωστής διάγνωσης και πρόγνωσης [6, 77, 80, 87]. Η προετοιμασία ενός τέτοιου πάνελ προσδιορισμού μελών της οικογένειας των καλικρεϊνών αποτελεί άμεσο μελλοντικό στόχο.

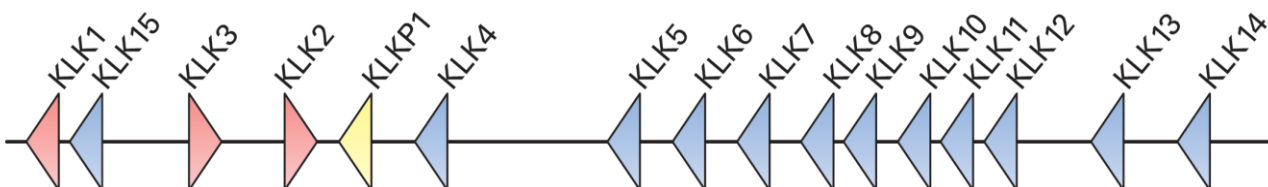
1.4 Οι καλικρεΐνες

1.4.1 Γενικά στοιχεία – Ιστορική αναδρομή

Οι ανθρώπινες ιστικές καλικρεΐνες αποτελούν μια υποομάδα 15 δομικά ομόλογων, εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης [88-90]. Τα γονίδια των καλικρεϊνών (*KLKs*) χαρτογραφούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3-13.4, αποτελώντας, μεταξύ των περίπου 180 πρωτεασών σερίνης που μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο, το μεγαλύτερο μη διακοπόμενο γονιδιακό σύμπλεγμα πρωτεασών σερίνης (Εικόνα 1.5) [88-91]. Επίσης αποτελούν το μεγαλύτερο σύμπλεγμα γονιδίων πρωτεασών, στο σύνολο των καταλυτικών τάξεων. Η καλικρεΐνη του πλάσματος κωδικοποιείται από το γονίδιο *KLKB1*, που βρίσκεται σε

διαφορετική χρωμοσωμική περιοχή (4q35), διαφέρει δομικά, λειτουργικά και εξελικτικά από τις ιστικές καλλικρεΐνες [88-92]. Οι ιστικές καλλικρεΐνες ή απλώς καλλικρεΐνες όπως θα αναφέρονται από αυτό το σημείο και έπειτα, εκφράζονται σε πληθώρα ιστών στον άνθρωπο και συμμετέχουν σε πλήθος διαφορετικών φυσιολογικών διεργασιών [92-94]. Οι διεργασίες αυτές περιλαμβάνουν από την αναδόμηση του δέρματος και τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος, μέχρι την επεξεργασία ορμονών και τη ρευστοποίηση του σπέρματος [95, 96].

Ο όρος καλλικρεΐνη προέρχεται από το καλλίκρεας, δηλαδή το πάγκρεας, και αποδόθηκε από τους Kraut, Frey και Werle το 1930, όταν ανακάλυψαν μια ουσία που ρυθμίζει την πίεση του αίματος και εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πάγκρεας. Επτά χρόνια αργότερα η ουσία αυτή ταυτοποιήθηκε ως ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που ονομάστηκε ιστική καλλικρεΐνη ή καλλικρεΐνη 1. Ωστόσο, το γονίδιο *KLK1* ανακαλύφθηκε πολύ αργότερα, το 1985 [80, 88, 94, 97]. Στο τέλος της δεκαετίας του '80 δύο ακόμα γονίδια που χαρακτηρίζονται από υψηλή δομική ομοιότητα με το γονίδιο *KLK1*, τα γονίδια *KLK2* και *KLK3/prostate-specific antigen (PSA)* κλωνοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή με το γονίδιο *KLK1*. Τα τρία αυτά γονίδια ονομάστηκαν γονίδια των «κλασικών καλλικρεϊνών». Από τα μέσα έως τα τέλη της δεκαετίας του '90 επιστήμονες από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες κλωνοποίησαν αρκετά επιπλέον γονίδια πρωτεασών σερίνης που έφεραν πολλές ομοιότητες με τα γονίδια των «κλασικών καλλικρεϊνών». Η τελική ταυτοποίηση, κλωνοποίηση και χαρτογράφηση της γονιδιακής οικογένειας που σήμερα είναι γνώστη ως γονιδιακή οικογένεια των καλλικρεϊνών και αριθμεί 15 μέλη πραγματοποιήθηκε από την ομάδα των Yousef, Scorilas και Diamandis [88-90, 97, 98].



Εικόνα 1.5. Απεικόνιση του γονιδιακού τύπου της οικογένειας των καλλικρεϊνών [97] .

1.4.2 Κοινά χαρακτηριστικά των καλλικρεϊνών. Ρύθμιση της έκφρασης και της πρωτεϊνικής λειτουργίας των καλλικρεϊνών.

Η οικογένεια των καλλικρεϊνών χαρακτηρίζεται από πολλά κοινά δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Τα σημαντικότερα από αυτά τα κοινά χαρακτηριστικά είναι [88, 90, 95-101]:

1. Η παρουσία πέντε κωδικών εξονίων με παρόμοιο μέγεθος.
2. Η παρουσία της συντηρημένης καταλυτικής τριάδας του ενεργού κέντρου His-Asp-Ser στα εξόνια 1, 3 και 5 αντίστοιχα.
3. Ο μεγάλος αριθμός εναλλακτικών mRNA μεταγράφων για κάθε γονίδιο.
4. Το πεπτίδιο σηματοδότης απαραίτητο για την έκκρισή τους σε βιολογικά υγρά.
5. Ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας σε ποσοστό 40–80%.
6. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από στεροειδείς ορμόνες.
7. Η απαραίτητη ενεργοποίηση των προενζύμων για την εμφάνιση ενζυμικής ενεργότητας και η συμμετοχή τους σε ένα πολύπλοκο δίκτυο ενεργοποίησης (KLK activome), όπου μια καλλικρεΐνη μπορεί να ενεργοποιεί και να ενεργοποιείται από άλλα μέλη της οικογένειας.
8. Η διασταυρούμενη συμμετοχή (cross-talk) σε άλλα δίκτυα πρωτεασών (π.χ. μεταλλοπρωτεΐνασων).
9. Η αναστολή της ενζυμικής τους λειτουργίας από ειδικούς αναστολείς.
10. Η ρύθμιση των επιπέδων έκφρασής τους από μικρομοριακά RNAs (miRNAs).

Σε μεταγραφικό επίπεδο, ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων των καλλικρεϊνών, πραγματοποιείται κυρίως από τις στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες μαζί με τους υποδοχείς τους προσδένονται σε *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες, στον υποκινητή ή τον ενισχυτή του γονιδίου, γνωστές ως “Hormone Response Elements” (HRE). Στη συνέχεια, επάγεται η αλληλεπίδραση μεταγραφικών παραγόντων, με το βασικό ενζυμικό σύμπλοκο της μεταγραφής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενίσχυση της μεταγραφής των γονιδίων *KLK2* και *KLK3* από τα ανδρογόνα και τις προγεστίνες σε καρκινικές σειρές προστάτη και μαστού αντίστοιχα, ενώ αντίθετα, τα γονίδια *KLK1*, *KLK6* και *KLK10*, ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα [99]. Παράλληλα, φαίνεται ότι στη ρύθμιση της μεταγραφής των *KLKs* σημαντικό ρόλο κατέχει και η μεθυλίωση του DNA. Αξίζει να αναφερθεί ότι η υπερμεθυλίωση του εξωνίου 3 του γονιδίου

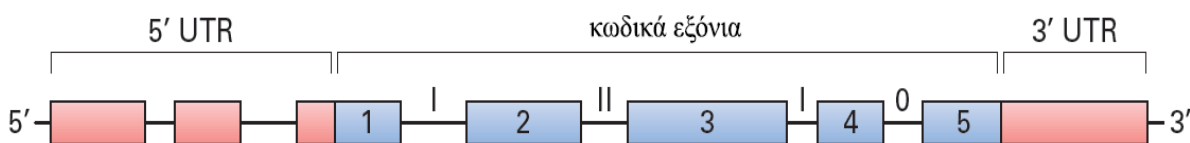
KLK10 θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους λόγους μείωσης της έκφρασης του γονιδίου στους καρκίνους του μαστού, της ωοθήκης, του προστάτη και στην οξεία μυελογενή λευχαιμία [80, 102-104]. Στο μέτα-μεταγραφικό και στο μεταφραστικό επίπεδο, τα επίπεδα των καλλικρεϊνών ρυθμίζονται, όπως θα αναφερθεί και πιο διεξοδικά σε μεταγενέστερο σημείο, από συγκεκριμένα miRNAs [105]. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας των καλλικρεϊνών κατέχουν, αφενός η ενεργοποίηση των αντίστοιχων ανενεργών προεζύμων-ζυμογόνων (pro-KLKs), και αφετέρου η απενεργοποίησή τους μέσω πρωτεόλυσης ή της δράσης ειδικών αναστολέων. Αναλυτικότερα, όλα τα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών συντίθενται με την μορφή προεζύμων φέροντας ένα προ-πεπίδιο 4-9 αμινοξικών κατάλοιπων στο αμινοτελικό τους άκρο, το οποίο παρεμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η απομάκρυνση αυτού του προ-πεπτιδίου πραγματοποιείται από πρωτεάσες σερίνης με ενεργότητα τρυψίνης, από άλλες καλλικρεΐνες καθώς και μέσω αυτοενεργοποίησης. Αντιθέτως, η απενεργοποίηση των καλλικρεϊνών πραγματοποιείται είτε με τον εσωτερικό τους τεμαχισμό, ο οποίος μπορεί να είναι αυτολυτικός ή να πραγματοποιηθεί από άλλες πρωτεάσες, είτε μέσω ενδογενών αναστολέων (α_2 -μακροσφαιρίνη, α_1 -αντιτρυψίνη, α_1 -αντιχυμοθρυψίνη, αναστολέας-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου) [96, 106].

1.4.3 Γονιδιακή οργάνωση και εναλλακτικά μετάγραφα των καλλικρεϊνών

Τα μέλη της γονιδιακής οικογένειας των καλλικρεϊνών χαρτογραφούνται στον άνθρωπο σε μια κοινή χρωμοσωμική περιοχή, η οποία εμφανίζει έκταση ~300 Kb και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19, μεταξύ των περιοχών 13.3 και 13.4 (19q13.3-13.4). Κεντρομερικά της περιοχής αυτής βρίσκεται το γονίδιο *ACTP* (testicular acid phosphatase) και τελομερικά τα γονίδια *CAG* (cancer associated gene) και *SIGLEC-9* (sialic acid-binding Ig-like lectin-9). Η διάταξη των γονιδίων των καλλικρεϊνών δε διακόπτεται από κάποιο άλλο γονίδιο που δεν ανήκει στην οικογένεια. Τα τρία γονίδια των «κλασικών καλλικρεϊνών» (*KLK1*, *KLK2* και *KLK3*) βρίσκονται μαζί με το γονίδιο *KLK15* σε μια περιοχή ~60 Kb στη διάταξη *KLK1* – *KLK15* – *KLK3* – *KLK2*, ενώ τα γονίδια *KLK4*-*KLK14* και το ψευδογονίδιο *ΨKLK1* βρίσκονται τελομερικά του γονιδίου *KLK2*. Η κατεύθυνση της μεταγραφής όλων των γονιδίων είναι από το τελομερές προς το κεντρομερές πλην των *KLK3* και *KLK2* (Εικόνα 1.5) [89, 90, 97, 107].

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 90 mRNA ισομορφές για τα γονίδια των καλλικρεϊνών συμπεριλαμβανομένων των κλασσικών mRNA μεταγράφων, δημιουργώντας έτσι μια νέα διάσταση στην πολυπλοκότητα της οικογένειας των καλλικρεϊνών

(Εικόνα 1.6). Ως σημαντικότεροι μηχανισμοί εναλλακτικού ματίσματος έχουν αναγνωρισθεί: η παράλειψη εξονίου (35% των περιπτώσεων), η επέκταση εξονίων (24%) και η αποκοπή μέρους εξονίων (18%) και η διατήρηση εσωνίου (16%). Παράλληλα, έχουν παρατηρηθεί μετάγραφα που προκύπτουν από εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μεταγραφής και από εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Περίπου 40 εναλλακτικά μετάγραφα, κωδικοποιούν μοναδικές πρωτεϊνικές ισομορφές, το 95% των οποίων όμως εμφανίζονται ημιτελείς και αναμένεται να είναι μη λειτουργικές ή να έχουν διαφορετική λειτουργία σε σχέση με τις κλασικές ισομορφές [97-101].



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση ενός mRNA μεταγράφου αντιπροσωπευτικού για το σύνολο των γονιδίων των καλλικρεϊνών [97].

1.4.4 Ο ρόλος των καλλικρεϊνών στην ανθρώπινη φυσιολογία και στην παθολογία μη νεοπλασματικών νόσων

Οι καλλικρεΐνες θεωρούνται πλειοτροπικά ένζυμα καθώς συμμετέχουν σε ένα ιδιαίτερα μεγάλο εύρος φυσιολογικών διαδικασιών από τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος μέχρι την ανάπτυξη του εξωκυττάριου χώρου και τη ρευστοποίηση του σπέρματος [95, 99, 108, 109].

Ο κύριος ρόλος της KLK1 είναι η διάσπαση του κινινογόνου και η απελευθέρωση της Lys-βραδυκινίνης (kallidin), η οποία ρυθμίζει πλήθος διαδικασιών όπως την πίεση του αίματος, τη συστολή των λείων μυϊκών ινών, το χημειοτακτισμό των ουδετερόφιλων, τη διαπερατότητα των αγγείων, την ηλεκτρολυτική ισορροπία και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Επιπρόσθετα, η KLK1 συμμετέχει και στην επεξεργασία αυξητικών παραγόντων και πεπτιδικών ορμονών [89, 95, 104, 108].

Σε αντίθεση με την KLK1, οι KLK2 και KLK3 διαθέτουν ελάχιστη ενεργότητα κινινογενάσης. Ο ρόλος της KLK2 είναι η ρευστοποίηση του σπέρματος μέσω της διάσπασης των σεμινογελινών I και II. Έχει επίσης αποδειχτεί ότι η KLK2 εμφανίζει ικανότητα ενεργοποίησης του προδρόμου μορίου της (pro-KLK2), αλλά και του pro-KLK3 μορίου. Η λειτουργική σύνδεση των δυο αυτών καλλικρεϊνών αποτυπώνεται και από τον κοινό εντοπισμό τους στα βιολογικά υγρά. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί η πρωτεόλυση της προσδενόμενης σε

ινσουλινόμορφους αυξητικούς παράγοντες πρωτεΐνης (Insulin Growth Factor Binding Protein) IGFBP-3 από την KLK2, γεγονός που αναδεικνύει τη δράση της στη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας αυτών των αυξητικών παραγόντων. Η KLK3 (PSA) εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα του σπέρματος όπου έχει βρεθεί να υδρολύει τις πρωτεΐνες σεμινογελίνη I, σεμινογελίνη II και την φимπρονεκτίνη, προκαλώντας τη ρευστοποίηση του σπερματικού υγρού. Άλλα υποστρώματα της KLK3 που έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί είναι η IGFBP-3, ο TGFβ και το πλασμινογόνο [95, 101, 104, 108].

Όσον αφορά τα νεότερα μέλη της οικογένειας των καλλικρεΐνων, έχει προταθεί ότι πολλά από αυτά κατέχουν κεντρικό ρόλο στη φυσιολογία του δέρματος, στην ενεργοποίηση των πεπτιδικών ορμονών, στην αντιμικροβιακή άμυνα του οργανισμού, στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, στην ωρίμανση των δοντιών, στην ανάπτυξη των ιστών, στην ενεργοποίηση μέλων της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας και σε μονοπάτια σηματοδότησης μέσω G-πρωτεϊνών. Οι KLK5 και KLK7 αρχικά είχαν απομονωθεί από την κεράτινη στιβάδα του δέρματος και μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι συμμετέχουν στην αναδόμιση-απολέπιση του δέρματος μέσω της επεξεργασίας των πρωτεϊνών των δεσμοσωμάτων της κεράτινης στιβάδας corneodesmosin (CDSN), desmoglein 1 (DSG1), και desmocollin 1 (DSC1). Επιπλέον, μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη ενός πρωτεολυτικού καρταρράκτη απαραίτητου για την αναδόμιση του δέρματος από τις καλλικρεΐνες που περιλαμβάνει τα μόρια KLK5, KLK7 και KLK14. Νεότερες μελέτες, αναφέρουν ότι και οι καλλικρεΐνες KLK6 και KLK8 συμμετέχουν στη φυσιολογική διαδικασία αναδόμησης του δέρματος μέσω της ρύθμισης της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κερατινοκυττάρων. Επιπρόσθετα, αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν τη συμμετοχή των καλλικρεϊνών KLK1, KLK6, KLK10 και KLK13 στην ενεργοποίηση των πεπτιδικών ορμονών στο πάγκρεας. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι οι καλλικρεΐνες λαμβάνουν μέρος στην άμυνα του οργανισμού μέσω της ρύθμισης των πεπτιδίων καθελικιδίνης (cathelicidin) τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση. Οι KLK5 και KLK7 διασπούν το πρόδρομο μόριο των καθελικιδινών hCAP18 με αποτέλεσμα να παράγεται η ώριμη μορφή του LL-3. Διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν τον αναστολέα των καλλικρεϊνών LEKTI παρουσιάζουν αυξημένη άμυνα έναντι των βακτηρίων η οποία προέρχεται από την καλλικρεΐνο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της καθελικιδίνης. Η KLK5 φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο στην ωρίμανση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου α1-ντιφενσίνη (α1-defensin) [95, 96, 109]. Όσον αφορά το νευρικό σύστημα, έχει υποστηριχθεί ότι οι KLK6

και KLK8 κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των νευρώνων, στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, στη ρύθμιση της μυελίνωσης και στην τροποποίηση της μορφολογίας των συνάψεων. Επιπρόσθετα, η KLK4 συνδέεται με την φυσιολογική ανάπτυξη των δοντιών μέσω την αποικοδόμησης πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας της αδαμαντίνης, ενώ οι KLK5, KLK13 και KLK14 αποικοδομούν συστατικά του εξωκυττάριου χώρου, συμμετέχοντας έτσι στην ανάπλαση των ιστών, με μηχανισμό όμοιο με αυτό των μεταλλοπρωτεϊνών.

Οι καλλικρεΐνες δύναται να αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεάσες [95, 96]. Πιο συγκεκριμένα, οι KLK2, KLK4 και KLK12 ενεργοποιούν μέλη της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών της θεμέλιας ουσίας, είτε έμεμσα μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού uPA-uPA receptor είτε μέσω άμεσης ενεργοποίησης. Νεότερα δεδομένα συνδέουν τις καλλικρεΐνες με την ενεργοποίηση των υποδοχέων PAR (Protease-activated receptors) υποδοχέων, μιας ομάδας υποδοχέων G-πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν σε σημαντικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Η δράση τους στους υποδοχείς PAR λαμβάνει χώρα μέσω της αποικοδόμησης του εξωκυττάριου NH₂-τελικού άκρου τους, η οποία επάγει τον διμερισμό και την ενεργοποίησή τους [88, 92, 95, 101].

Εκτός από τη συμμετοχή τους σε μηχανισμούς καρκινογένεσης και εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων, η οποία είναι ιδιαίτερα μελετημένη και θα παρουσιαστεί σε ξεχωριστό κεφάλαιο, οι καλλικρεΐνες φαίνεται να εμπλέκονται και σε μη νεοπλασματικές νόσους [108]. Η KLK6 έχει συνδεθεί με φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα που προκαλούν απομυελίνωση, όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, καθώς μπορεί να υδρολύσει τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (myelin basic protein-MBP). Επίσης, η KLK6 συνδέεται και με νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως την νόσο του Alzheimer και την νόσο του Parkinson. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές μεταβολές των επιπέδων της KLK6 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών με Alzheimer's σε σχέση με υγιή άτομα, ενώ έχει φανεί ότι η KLK6 διασπά *in vitro* την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς απελευθερώνοντας τη β-αμυλοειδική πρωτεΐνη. Η KLK6 έχει εντοπισθεί επίσης στα σωμάτια Lewis και φαίνεται να μειώνει την έκφραση της α-synuclein. Επίσης έχει παρατηρηθεί πρόσφατα μεγάλη αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου KLK8 στον υπόκαμπο ατόμων που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες.

Οι διάφορες μεταβολές που έχουν παρατηρηθεί στην πρωτεολυτική ικανότητα των καλλικρεϊνών, είτε ως αποτέλεσμα υπερέκφρασης είτε ως αποτέλεσμα απορρυθμισμένης

ενεργότητας, θεωρούνται ως οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες για διάφορες ασθένειες του δέρματος όπως η χρόνια δερματίτιδα, η ψωρίαση, η ατοπική δερματίτιδα και το σύνδρομο Netherton. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα αρκετών καλλικρεϊνών είναι αυξημένα στην ψωρίαση και σε άλλες αλλοιώσεις του δέρματος. Επίσης, στο σύνδρομο Netherton, μια κληρονομική δερματική νόσο, εμφανίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPINK5* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη LEKTI, έναν αναστολέα αρκετών καλλικρεϊνών. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην έλλειψη αναστολής της ενεργότητας των καλλικρεϊνών. Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν ήδη σχεδιαστεί φαρμακευτικές ουσίες που στοχεύουν στην αναστολή της λειτουργίας των καλλικρεϊνών σε παθήσεις του δέρματος. Επιπρόσθετα, έχει καταγραφεί ο ρόλος της απορρύθμισης του συστήματος KLK1-κινινογόνου σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, στην υπέρταση και σε νεφρικές ασθένειες [92, 95, 108, 109].

1.4.5 Η συμμετοχή των καλλικρεϊνών στις ανθρώπινες νεοπλασίες

1.4.5.1 Γενικά στοιχεία

Τα τελευταία 15 χρόνια πληθώρα μελετών έχει αποδείξει την εκτεταμένη συμμετοχή των καλλικρεϊνών στην παθοβιοχημεία του καρκίνου [80, 88, 102-104, 108, 110]. Οι καλλικρεΐνες κατέχουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία των ανθρώπινων νεοπλασιών σε κάθε στάδιο, από την αρχική δημιουργία του όγκου, την αγγειογένεση, την τοπική διήθηση και την απομακρυσμένη εξάπλωσή του. Έχει καταγραφεί επανειλημμένως ότι η έκφραση αρκετών μελών της οικογένειας των καλλικρεϊνών παρουσιάζεται απορρυθμισμένη στο σύνολο των ανθρώπινων νεοπλασιών (Εικόνα 1.7). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο καρκίνος της ωοθήκης όπου η έκφραση σχεδόν όλων των γονιδίων των καλλικρεϊνών (*KLKs* 2–11 και *KLKs*13–15) παρουσιάζεται απορρυθμισμένη και ο καρκίνος του προστάτη όπου σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK2*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK7*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK14* και *KLK15* [79, 80, 88, 101-104, 107, 108, 110].

Καρκινικός ιστός	Καλλικρεΐνη														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Εγκεφάλου															
Ουροδόχου κύστης															
Μαστού															
Παχέος εντέρου															
Οισοφάγου															
Κεφαλής-τραχήλου															
Νεφρού															
Πνεύμονα															
Ωοθήκης															
Παγκρέατος															
Προστάτη															
Δέρματος															
Στομάχου															

Εικόνα 1.7. Η έκφραση των καλλικρεϊνών, σε επίπεδο mRNA, στους καρκινικούς ιστούς συγκρινόμενη με μη καρκινικούς ιστούς. Πράσινο: αυξημένη έκφραση. Κόκκινο: μειωμένη έκφραση. Κυανό: απουσία έκφρασης. Λευκό: καμία μεταβολή στην έκφραση. Μωβ: παρουσία έκφρασης, αλλά δεν έχει γίνει σύγκριση με το μη καρκινικό ιστό. Κίτρινο: δεν έχει μελετηθεί η έκφραση [108].

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι καλλικρεΐνες συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της νεοπλασίας ρυθμίζοντας το ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό βασίζεται κυρίως στη ρύθμιση της δράσης των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων (IGFs) η βιοδιαθεσιμότητα των οποίων ρυθμίζεται από τις αντίστοιχες δεσμευόμενες πρωτεΐνες (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins IGFBPs) σε σκοπό την ασφαλή μεταφορά τους στους ιστούς-στόχους. Αυξημένα επίπεδα της IGFBP-3, πρωτεΐνης δεσμευόμενης στον IGF1, αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου. Ωστόσο, οι KLK2 και KLK3 έχουν την ικανότητα να διασπούν τις IGFBPs, συμπεριλαμβανομένης της IGFBP-3, και ως αποτέλεσμα αυξάνουν τη διαθεσιμότητα των ινουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων, προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου [101]. Οι KLK4, KLK5, KLK11 και KLK14 μπορούν επίσης να διασπάσουν πρωτεΐνες IGFBPs. Αντιθέτως, έχει προταθεί ότι οι KLK3 και KLK10 μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη του όγκου. Η KLK3 επάγει την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως αυτό που κωδικοποιεί για την IFN- δ και να καταστείλει την έκφραση παραγόντων όπως των uPA,

VEGF και Pim-1 που επάγουν την αύξηση των όγκων. Επίσης, η έκφραση της KLK3 και της KLK10 οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των καρκινικών όγκων σε *in vivo* μοντέλα [79, 80, 101, 104]. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση των υποδοχέων PAR από συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των καλλικρεΐνων επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό των πολλαπλασιασμό και την επιθετικότητα των κυττάρων ενός καρκινικού όγκου, όπως έχει περιγραφεί σε πρόσφατες μελέτες [111].

Το φαινόμενο της αγγειογένεσης κατά την ανάπτυξη του όγκου αφορά στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων και αποτελεί ένα σημαντικό σημείο για τη διατήρηση και την εξέλιξη του όγκου [112]. Πληθώρα δεδομένων αποδεικνύουν ότι οι καλλικρεΐνες επηρεάζουν το φαινόμενο της αγγειογένεσης ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ ενεργοποιητών και αναστολέων του φαινομένου. Πιο συγκεκριμένα, οι καλλικρεΐνες βοηθούν τη διείσδυση και την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας με έμμεσο τρόπο (ενεργοποίηση μονοπατιών μεταλλοπρωτεϊνών, uPA-uPAR, κινινογόνου) ή άμεσο τρόπο αποικοδομώντας οι ίδιες συστατικά του εξωκυττάριου χώρου. Αντιθέτως, ορισμένες καλλικρεΐνες όπως οι KLK3, KLK5, KLK6, KLK13 αναστέλλουν την αγγειογένεση κυρίως μέσω της παραγωγής πεπτιδικών θραυσμάτων που ομοιάζουν στις αγγειοστατίνες από την εσωτερική πρωτεόλυση του πλασμινογόνου σε συγκεκριμένα σημεία [79, 80, 101, 104].

Έχοντας την απαραίτητη παροχή αίματος τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την τάση να εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να εγκατασταθούν σε απομακρυσμένα όργανα με τη διαδικασία της μετάστασης. Η απαραίτητη κυτταρική κινητικότητα προέρχεται από την απόκτηση μεσεγχυματικής μορφολογίας μέσω του φαινομένου που ονομάζεται επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (epithelial to mesenchymal transition - EMT). Σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι οι καλλικρεΐνες KLK3 και KLK4 εμπλέκονται σε αυτό το στάδιο, καθώς η υπερέκφρασή των αντίστοιχων γονιδίων μέσω κατάλληλων γονιδιακών κατασκευών οδηγεί σε φαινοτυπικές αλλαγές τύπου EMT και σε ταυτόχρονη απώλεια της E-καδερίνης (χαρακτηριστικό μόριο επιθηλιακού τύπου) και επαγωγή της έκφρασης της βιμεντίνης (χαρακτηριστικό μόριο μεσεγχυματικού τύπου). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι καλλικρεΐνες αποικοδομούν, άμεσα ή έμμεσα, μόρια της εξωκυττάριας ουσίας (φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο, λαμίνη, πρωτεογλυκάνες), γεγονός που διευκολύνει τη διάχυση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [79, 80, 96, 101, 104].

Νεότερα δεδομένα τονίζουν το ρόλο των καλλικρεϊνών KLK3 και KLK4 στη διευκόλυνση της μετάστασης των προστατικών καρκινικών κυττάρων στα οστά [79].

1.4.5.2 Ο ρόλος των καλλικρεϊνών στον καρκίνο του προστάτη

Η ενεργοποίηση του άξονα των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων κατέχει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη. Αυξημένα επίπεδα του IGF1 στην κυκλοφορία έχουν συνδεθεί με την παρουσία προστατικού καρκίνου καθώς και με προχωρημένα στάδια της νόσου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών (KLK2, KLK3, KLK4, KLK11) μπορούν να διασπάσουν τις πρωτεΐνες IGFBP και να αυξήσουν τα επίπεδα των διαθέσιμων IGF στο μικροπεριβάλλον του όγκου, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλοντας την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [79, 101]. Όσον αφορά το ρόλο των υποδοχέων PAR στον καρκίνο του προστάτη, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση των PAR1, PAR2 και PAR4 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε καρκινικούς σε σχέση με καλοήθεις ιστούς. Η πρωτεολυτική ενεργοποίηση των PAR1 και PAR2, η οποία επάγει την ανάπτυξη των προστατικών καρκινικών κυττάρων, είναι δυνατόν να γίνει από τις KLK2 και KLK4, δύο καλλικρεΐνες που υπερεκφράζονται στον καρκίνο του προστάτη. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι η KLK2- και η KLK4- εξαρτώμενη ενεργοποίηση των PAR2 και PAR1, αντίστοιχα, επάγει τον πολλαπλασιασμό των προστατικών καρκινικών κυττάρων DU145, ενώ παρόμοια φαινόμενα έχουν καταγραφεί για τα προστατικά καρκινικά κύτταρα PC3 όπου η ενεργοποίηση του PAR1 από την KLK4 επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία [79, 104, 111]. Επίσης, Η KLK4 έχει τη δυνατότητα να επάγει τον πολλαπλασιασμό των προστατικών καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης σημαντικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου. Η KLK3 επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου σε προστατικά καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την προαγωγή του οξειδωτικού στρες, γενετικών μεταλλάξεων και της καρκινογένεσης [79, 101].

Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας αποτελούν ένα φυσικό φραγμό τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να υπερβούν για να μετακινηθούν προς τους γειτονικούς ιστούς, να βρεθούν στη μικροκυκλοφορία και να εγκατασταθούν σε απομακρυσμένα όργανα [112]. Όπως προαναφέρθηκε, οι καλλικρεΐνες μπορούν άμεσα ή έμμεσα να αποικοδομήσουν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας. Οι καλλικρεΐνες που βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του προστάτη και μπορούν να διασπάσουν σημαντικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας είναι οι

KLK2, KLK3 και KLK14. Αξίζει να αναφερθεί ότι η διηθητική ικανότητα των προστατικών κυττάρων LNCaP μειώνεται με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της KLK3 [79, 104].

Οι καλλικρεΐνες εμπλέκονται και στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή των προστατικών καρκινικών κυττάρων. Πειράματα επιμόλυνσης της καρκινικής κυτταρικής σειράς PC3 με τα γονίδια *KLK3* και *KLK4* οδήγησαν σε αυξημένη κινητικότητα των κύτταρων αυτών, επαγωγή μορφολογίας μεσεγχυματικού τύπου, μειωμένη έκφραση της E-καδερίνης και αυξημένη έκφραση της βιμεντίνης. Οι αλλαγές αυτές πιθανόν να πραγματοποιούνται μέσω του παράγοντα TGF- β 2 οποίος είναι γνωστό ότι προάγει τέτοιες αλλαγές και ενεργοποιείται από την KLK3, η οποία με τη σειρά της είναι υπόστρωμα για την KLK4. Επιπρόσθετα, η KLK7 προάγει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή στην καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145 αυξάνοντας επίσης τη διηθητική τους ικανότητα. Η KLK1 αυξάνει την επιθετικότητα των κυττάρων DU145 μέσω ενεργοποίησης του PAR-1 σηματοδοτικού μονοπατιού [79, 101, 104, 111].

Η συμμετοχή των καλλικρεϊνών στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων στα οστά έχει καταγραφεί για τις KLK3 και KLK4. Η KLK3 επάγει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την απόπτωση των οστεοκλαστών γεγονός που διευκολύνει την μετάσταση των καρκινικών προστατικών κυττάρων στα οστά. Η υπερέκφραση της KLK3 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και την υιοθέτηση μιας οστεοβλαστικής μορφολογίας. Η ικανότητα διάσπασης της πρωτεΐνης σχετιζόμενης με την παραθυρεοειδική ορμόνη (Parathyroid hormone-related protein- PTHrP) και της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης του όψιμου TGF- β 2 από την KLK3 ενδεχομένως να ευνοεί την αναδόμηση των οστών και τη μετάσταση των καρκινικών προστατικών κυττάρων σε αυτά. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η αναστολή της έκφρασης της KLK3 αναστέλλει τη δέσμευση των καρκινικών κυττάρων στα οστά. Η KLK4 είναι, επίσης, υπεύθυνη για τη δημιουργία οστικών μεταστάσεων, καθώς η ενζυμική ενεργότητα της είναι απαραίτητη για τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων προς τα οστά και την σύνδεσή τους σε πρωτεΐνες του οστικού στρώματος όπως το κολλαγόνο I και το κολλαγόνο IV [79, 101, 104].

1.4.6 Οι καλλικρεΐνες ως καρκινικοί δείκτες

1.4.6.1 Γενικά στοιχεία

Καλύτερο παράδειγμα για την ανάδειξη της σημασίας της οικογένειας των καλλικρεϊνών ως καρκινικών δεικτών δε θα μπορούσε να είναι άλλο από το PSA (KLK3). Η χρησιμότητα του PSA στην πρώιμη διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας ασθενών με καρκίνο του προστάτη έχει μελετηθεί διεξοδικά [13, 27, 73]. Ωστόσο, εκτός από το ευρέως γνωστό παράδειγμα του PSA, δε θα ήταν υπερβολή να αναφέρουμε ότι το σύνολο των καλλικρεϊνών έχουν προταθεί ως καρκινικοί δείκτες για τουλάχιστον μια ανθρώπινη νεοπλασία [80, 113]. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, οι καλλικρεΐνες εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της νεοπλασίας από τη δημιουργία του όγκου μέχρι την εξάπλωσή του. Ίσως αυτό αποτελεί μια εξήγηση για το πολλά υποσχόμενο ρόλο των καλλικρεϊνών ως βιοδείκτες του καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι καρκίνοι της ωοθήκης, του μαστού και του προστάτη. Στον καρκίνο του προστάτη οι καλλικρεΐνες που έχουν κλινική αξία σε επίπεδο πρόγνωσης ή/και διάγνωσης είναι οι KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK11, KLK14 και KLK15, στον καρκίνο του μαστού οι KLK3, KLK4, KLK5, KLK7, KLK9, KLK10, KLK13, KLK14, KLK15 και στον καρκίνο της ωοθήκης οι KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14 και KLK15 [79, 80, 110].

Ο ευρύς ρόλος των καλλικρεϊνών ως μοριακοί δείκτες πρόγνωσης των ανθρωπίνων νεοπλασιών φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2. Οι καλλικρεΐνες ως δείκτες πρόγνωσης των ανθρωπίνων νεοπλασιών [80].

Καλλικρεΐνη	Τύπος Νεοπλασίας	Βιολογικό μόριο που μελετήθηκε	Τύπος πρόγνωσης (Ευμενής – Δυσμενής)
KLK2	Καρκίνος του προστάτη	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
KLK3	Καρκίνος του προστάτη	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του μαστού	Πρωτεΐνη	Ευμενής
KLK4	Καρκίνος του μαστού	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του προστάτη	mRNA	Δυσμενής

KLK5	Καρκίνος του μαστού	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του προστάτη	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος του παχέος εντέρου	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος των όρχεων	mRNA	Ευμενής
KLK6	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του πνεύμονα	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του παχέος εντέρου	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του στομάχου	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του ενδομητρίου	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του παγκρέατος	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του νεφρού	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
KLK7	Καρκίνος του μαστού	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του παχέος εντέρου	mRNA	Δυσμενής
	Όγκοι του εγκεφάλου	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
KLK8	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος του πνεύμονα	mRNA	Ευμενής
KLK9	Καρκίνος του μαστού	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA	Ευμενής
KLK10	Καρκίνος της ωοθήκης	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του παχέος εντέρου	mRNA	Δυσμενής

	Καρκίνος του στομάχου	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του μαστού	Μεθυλίωση του DNA (απώλεια έκφρασης)	Δυσμενής
		Πρωτεΐνη	Ευμενής
	Οξεία Λευμοβλαστική Λευχαιμία	Μεθυλίωση του DNA (απώλεια έκφρασης)	Δυσμενής
KLK11	Καρκίνος του εντέρου	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του νεφρού	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA	Δυσμενής
		Πρωτεΐνη	Ευμενής
	Καρκίνος του πνεύμονα	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος του προστάτη	mRNA	Ευμενής
KLK13	Καρκίνος του πνεύμονα	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του μαστού	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος του στομάχου	mRNA	Ευμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	Πρωτεΐνη	Ευμενής
		mRNA	Δυσμενής
KLK14	Καρκίνος του μαστού	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του προστάτη	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του πνεύμονα	mRNA και Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Πρωτεΐνη	Δυσμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA	Ευμενής
KLK15	Καρκίνος του προστάτη	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος της ωοθήκης	mRNA	Δυσμενής
	Καρκίνος του μαστού	mRNA	Ευμενής

1.4.6.2 Οι καλλικρεΐνες ως μοριακοί δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη

Είναι γεγονός ότι η διάγνωση του καρκίνου του προστάτη καθοδηγείται σχεδόν αποκλειστικά από τις μετρήσεις των επιπέδων KLK3-PSA στον ορό, που πραγματοποιούνται κατά τον έλεγχο του ασυμπτωματικού πληθυσμού [28]. Ωστόσο εκτός από το PSA σημαντική διαγνωστική αξία φαίνεται να έχουν και άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεΐνών όπως οι KLK2 και KLK11. Έχει αναφερθεί ότι η αναλογία KLK2/ελεύθερο PSA στον ορό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ ασθενών με καρκίνο του προστάτη και των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιείται ο λόγος KLK2/ελεύθερο PSA, μπορεί να επιτευχθεί αυξημένη διαγνωστική ειδικότητα στις περιοχές συγκεντρώσεων PSA: 2 – 4 ng/mL και 4 – 10 ng/mL. Η KLK11 έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στον ορό ασθενών με καρκίνο του προστάτη και η μέτρηση του λόγου KLK11/ολικό PSA μπορεί να βοηθήσει στον καλύτερο διαχωρισμό των καλοηθών περιπτώσεων από τις νεοπλασίες, όπως και στη μείωση των μη απαραίτητων βιοψιών [79, 80, 110, 114].

Στον τομέα της πρόγνωσης και της παρακολούθησης της θεραπευτικής ανταπόκρισης η KLK3-PSA και πάλι κατέχει το σημαντικότερο ρόλο, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Μάλιστα, η κλινική της αξία στο τομέα της πρόγνωσης είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στον τομέα της διάγνωσης. Εκτός από την KLK3, οι καλλικρεΐνες που έχουν προγνωστική αξία για τον καρκίνο του προστάτη είναι οι KLK2, KLK4, KLK5, KLK11, KLK14, και KLK15 [79, 110]. Η παρουσία υψηλών επιπέδων της KLK2 στον ορό σε συνδυασμό με χαμηλό ποσοστό ελεύθερου PSA αποτελούν ισχυρό δείκτη υποτροπής της νόσου. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα της KLK14 σε ιστούς προστάτη έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για βιοχημική υποτροπή. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK4* και αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης του γονιδίου *KLK15*, συνδέονται με επιθετική νόσο και δυσμενή πρόγνωση. Αντιθέτως, αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK5* και *KLK11* έχουν συσχετισθεί με αρχικά στάδια της νόσου. Τέλος, νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η χημειοθεραπεία αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK5* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη [79, 80, 110]. Ο κλινικός ρόλος των καλλικρεΐνών στον καρκίνο του προστάτη παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.3) [79].

Πίνακας 1.3. Η κλινική αξία των καλλικρεϊνών στον καρκίνο του προστάτη [79].

Καλλικρεΐνη	Κλινική σημασία ως βιοδείκτης
KLK2	Διάγνωση, Δυσμενής Πρόγνωση
PSA/KLK3	Έλεγχος ασυμπτωματικού πληθυσμού, Διάγνωση, Δυσμενής πρόγνωση, Παρακολούθηση θεραπευτικής ανταπόκρισης
KLK4	Δυσμενής πρόγνωση
KLK5	Ευμενής πρόγνωση
KLK11	Διάγνωση, Ευμενής Πρόγνωση
KLK14	Δυσμενής πρόγνωση
KLK15	Δυσμενής πρόγνωση

1.4.6 Η καλλικρεΐνη 13

Το γονίδιο *KLK13*, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη KLK13, αρχικά ήταν γνωστό με το όνομα *KLK-L4* (kallikrein-like gene 4) [115]. Το γονίδιο *KLK13* εντοπίζεται ανάμεσα στα γονίδια των καλλικρεϊνών *KLK12* και *KLK14* και έχει μέγεθος 8,9 kb. Αποτελείται από πέντε κωδικεύοντα εξώνια και τέσσερα εσώνια, ενώ υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα την ανίχνευση τουλάχιστον εννέα διαφορετικών μεταγράφων mRNA (Εικόνα 1.8) [89, 100, 115, 116]. Οι δύο κυριότερες mRNA ισομορφές της καλλικρεΐνης 13 είναι η κλασική mRNA ισομορφή, ή πλήρους μήκους ισομορφή, και η βραχεία ισομορφή. Το κλασσικό μετάγραφο του γονιδίου *KLK13* εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον προστάτη, στο μαστό, στους σιελογόνους αδένες, στις αμυγδαλές, στους πνεύμονες, στο θυρεοειδή αδένα και στους όρχεις [108, 115-118]. Η κωδική περιοχή του γονιδίου αντιστοιχεί σε 831 bp και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 277 αμινοξέων. Η βραχεία ισομορφή διαφέρει από την κλασσική ισομορφή, καθώς είναι κατά 214 bp μικρότερη, ως αποτέλεσμα μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης. Η πρωτεΐνη που δημιουργείται δεν είναι λειτουργική, καθώς δεν περιέχει το κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό της κέντρο, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των καλλικρεϊνών [98, 100, 115]. Σύμφωνα

με τους Chang *et al* [116] πέντε από τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *KLK13* εκφράζονται αποκλειστικά σε φυσιολογικό ιστό όρχεως. Τέλος, υπάρχουν και δύο εναλλακτικά μετάγραφα, η έκφραση των οποίων περιορίζεται σε ιστούς δέρματος [100, 116]. Μελέτες που έγιναν στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού BT-474 αποδεικνύουν ότι η έκφραση του γονιδίου της καλλικρεΐνης 13, ρυθμίζεται από στεροειδείς ορμόνες. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το γονίδιο *KLK13* υπερεκφράζεται μετά από επίδραση με προγεστερόνη και ανδρογόνα, ενώ η έκφρασή του επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από τα οιστρογόνα [99, 115, 119].

Καταγραφή



Εικόνα 1.8. Διαγραμματική απεικόνιση των μέχρι σήμερα γνωστών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *KLK13* [100].

Η *KLK13* θεωρείται ότι είναι εκκρινόμενη πρωτεΐνη, λόγω της παρουσίας του πεπτιδίου σηματοδότη και της ανίχνευσής της σε βιολογικά υγρά. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης αυτής είναι 29 kDa. Έχει αναφερθεί ότι η *KLK13* υφίσταται συχνά γλυκοζυλίωση, γεγονός που αυξάνει το μοριακό βάρος της γλυκοζυλιωμένης ισομορφής στα 50 kDa. Η γλυκοζυλιωμένη μορφή απαντάται πιο συχνά από τη μη γλυκοζυλιωμένη. Η *KLK13* συντίθεται ως προ-προένζυμο, που με την ενεργοποίηση του παράγεται η ώριμη πρωτεΐνη, η οποία έχει δράση θρυψίνης [120]. Η *KLK13* χαρακτηρίζεται από πέντε συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς και το ενεργό της κέντρο εντοπίζεται μεταξύ δύο δομών β-πτυχωτής επιφάνειας [121]. Η

καλλικρεΐνη 13 έχει ανιχνευθεί στο πλάσμα του σπέρματος, στο μητρικό γάλα και στο αμνιακό υγρό, γεγονός που υποδεικνύει ότι εκφράζεται και εκκρίνεται κυρίως από τα κύτταρα του ανδρικού και του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί σε μεγάλο βαθμό στον οισοφάγο και την αμυγδαλή. Σε αντίθεση με τις άλλες καλλικρεΐνες η KLK13 βρίσκεται σε πολύ χαμηλές ποσότητες στον ορό αίματος φυσιολογικών ανδρών και γυναικών [93]. Ο φυσιολογικός ρόλος που έχει αποδοθεί στην καλλικρεΐνη 13 είναι η αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου, καθώς έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει την ικανότητα να διασπά τις παρακάτω ουσίες: κολλαγόνο I, κολλαγόνο II, κολλαγόνο III, φμπρονεκτίνη και λαμινίνη [122]. Επίσης, έχουν αναγνωριστεί τρεις αναστολές πρωτεασών που μπορούν να προσδεθούν στην καλλικρεΐνη 13: η α-2 αντιπλάσμινη, η α-2 μακροσφαιρίνη και η α-1 αντιχυμοτρυψίνη [121]. Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν ότι η KLK13 ενεργοποιείται από το κιτρικό νάτριο, το οποίο βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στον προστατικό ιστό και στο σπερματικό υγρό. Η έντονη παρουσία της KLK13 καθώς και των πιθανών υποστρωμάτων της στους αναπαραγωγικούς ιστούς του άνδρα υποδεικνύουν ότι η KLK13 ενδεχομένως να εμπλέκεται στη φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της από το κιτρικό νάτριο. Επιπλέον, η KLK13 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους σιελογόνους αδένες όπου συμμετέχει στην ενεργοποίηση, μέσω υδρόλυσης, των ιστατινών, πρωτεϊνών με αντιμικροβιακή δράση, συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο, πιθανώς, στους μηχανισμούς άμυνας του ανώτερου πεπτικού συστήματος [123].

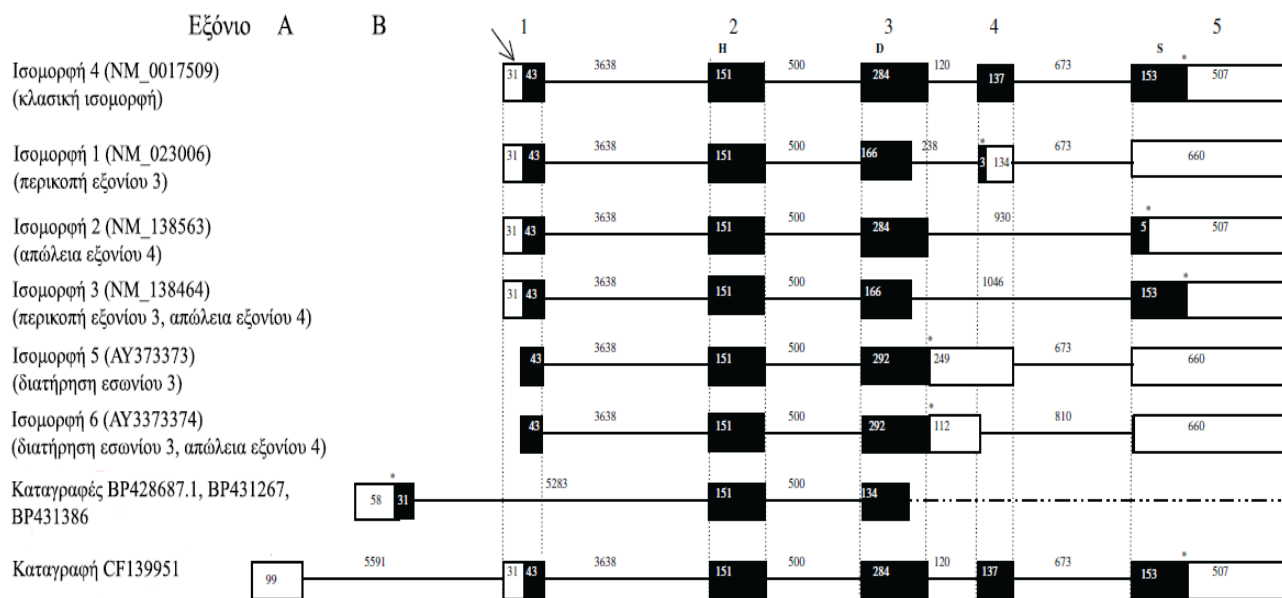
Η KLK13, εκτός από φυσιολογικές διεργασίες στον ανθρώπινο οργανισμό φαίνεται να εμπλέκεται και σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις. Η ικανότητα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας από την KLK13 σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση της στον καρκίνο της ωοθήκης την έχουν κατατάξει στην ομάδα εκείνη των πρωτεασών σερίνης που λαμβάνουν μέρος στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων της ωοθήκης [122]. Για την απόδειξη της υπόθεσης αυτής, χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη καρκινική σειρά ωοθήκης OV-90 και αντισώματα έναντι της KLK13. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος έδειξαν μείωση κατά 40%, στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων στα οποία είχε προστεθεί αντίσωμα για την KLK13, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες [122]. Επιπρόσθετα υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK13* συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο της ωοθήκης [124]. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα, έχει δείχθει ότι υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης KLK13 έχουν συσχετισθεί με καλύτερη επιβίωση και μειωμένη πιθανότητα

υποτροπής στον καρκίνο της ωοθήκης [125] και θεωρείται ότι η KLK13 μπορεί να αναστείλει την αγγειογένεση παράγοντας θραύσματα με ενεργότητα αγγειοστατινών από το πλασμινογόνο [104]. Τα αντιφατικά αυτά δεδομένα θα μπορέσουν ίσως να εξηγηθούν με την καλύτερη κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου της καλλικρεΐνης 13. Επιπρόσθετα, αυξημένη έκφραση του γονιδίου *KLK13* σε επίπεδο mRNA έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ευμενής προγνωστικός δείκτης [119]. Το αντίθετο ισχύει στον καρκίνο των πνευμόνων όπου η έκφραση του γονιδίου *KLK13* θεωρείται ως δυσμενής προγνωστικός δείκτης [126] και η υπερέκφρασή του, που είναι αποτέλεσμα απομεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου, αυξάνει την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα *in vitro* [127]. Τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης KLK13 οδηγούν σε αυξημένη αποικοδόμηση των συστατικών του εξωκυττάριου χώρου (κυρίως της λαμινίνης) και σε αυξημένο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα *in vivo*. Επίσης προάγεται και η έκφραση της N-καδερίνη με αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας των προαναφερθέντων καρκινικών κυττάρων [127]. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί στον καρκίνο των σιελογόνων αδένων [118]. Το γονίδιο της καλλικρεΐνης 13 εμπλέκεται και στον καρκίνο των όρχεων, καθώς έχουν ανακαλυφθεί πέντε εναλλακτικές ισομορφές που εκφράζονται μόνο σε φυσιολογικό ιστό όρχεως αλλά όχι στον αντίστοιχο καρκινικό [116]. Επιπρόσθετα, το γονίδιο *KLK13* εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα στους καρκινικούς ιστούς στομάχου σε σχέση με το μη καρκινικό μέρος του ιστού, η έκφρασή του μειώνεται με την πρόοδο της νόσου και τα υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK13* αποτελούν δείκτη ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με γαστρικό καρκίνο [128]. Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν ότι η έκφραση του γονιδίου *KLK13* αυξάνεται μετά τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε καρκινικά κύτταρα στομάχου [129].

1.4.7 Η καλλικρεΐνη 15

Το γονίδιο *KLK15* αποτελεί το πιο πρόσφατα κλωνοποιημένο μέλος της οικογένειας των καλλικρεΐνών του ανθρώπου. Η ταυτοποίησή του πραγματοποιήθηκε από την ομάδα Yousef-Scorilas-Diamandis το 2001 [130]. Βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *KLK1* και *KLK3*, έχει μέγεθος περίπου 6.2 kb, με μια κωδική περιοχή 771 bp. Εμφανίζει μεγάλη δομική ομοιότητα με το γονίδιο *KLK3*, καθώς και με άλλα γονίδια των καλλικρεΐνών. Αποτελείται από 5 εξώνια και 4 εσώνια [130]. Έχουν αναγνωριστεί αρκετά εναλλακτικά mRNA μετάγραφα του *KLK15*, χωρίς να έχει χαρακτηριστεί ακόμα η πλήρης αλληλουχία τους (Εικόνα 1.9). Όλα τα εναλλακτικά

μετάγραφα, εκτός του κλασικού, το οποίο κωδικοποιεί την ενεργή μορφή της καλλικρεΐνης 15, θεωρείται ότι κωδικοποιούν για πρωτεΐνες περιορισμένου μήκους χωρίς ενεργότητα [100, 131]. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου εντοπίζονται στο θυρεοειδή αδένα με μικρότερα επίπεδα να εμφανίζονται στον προστάτη, στους σιελογόνους αδένες και στα επινεφρίδια [93, 130]. Ενδέχεται η έκφραση του γονιδίου *KLK15* να ρυθμίζεται θετικά από τα ανδρογόνα μέσω του υποδοχέα των ανδρογόνων [130].



Εικόνα 1.9. Διαγραμματική απεικόνιση των μέχρι σήμερα γνωστών μεταγραφών mRNA του γονιδίου *KLK15* [131].

Η προβλεπόμενη κωδική περιοχή του γονιδίου παράγει ένα πολυπεπτίδιο 256 αμινοξέων με μοριακό βάρος 28 kDa, ενώ έχει ανιχνευθεί και μια γλυκοζυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 38 kDa. Η πρωτεΐνη *KLK15* παρουσιάζει 40% ταυτότητα και 53% ομοιότητα με την *KLK3* και έχει αναμενόμενη ενζυμική ενεργότητα όμοια με αυτή της χυμοθρυψίνης [132, 133]. Ανιχνεύεται κυρίως στο θυρεοειδή, στον προστάτη, στο πλάσμα του σπέρματος και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό [93]. Στην ώριμη μορφή της πρωτεΐνης είναι παρόντα 15 κατάλοιπα κυστεΐνης από τα οποία 10 είναι διατηρημένα σε όλες τις καλλικρεΐνες και αναμένεται να σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο φυσιολογικός ρόλος της καλλικρεΐνης 15 θεωρείται ότι είναι η ενεργοποίηση του προ-PSA και η ρευστοποίηση του σπέρματος [101, 132, 133].

Αυξημένη έκφραση του γονιδίου *KLK15* έχει βρεθεί στον καρκίνο του προστάτη και ιδιαίτερα σε προχωρημένες και πιο επιθετικές μορφές της ασθένειας [130, 134-136] καθώς και

στον καρκίνο της ωοθήκης [137]. Στις δύο αυτές περιπτώσεις η έκφραση του γονιδίου *KLK15* θεωρείται δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης [134-137]. Αντιθέτως, τα επίπεδα του γονιδίου *KLK15* έχουν συσχετισθεί με ευμενή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού [133]. Πρόσφατα δεδομένα συσχετίζουν την παρουσία πολυμορφισμών (SNPs) στην περιοχή του γονιδίου *KLK15* με την επιθετικότητα του καρκίνου του προστάτη [138] και την πορεία επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο της ωοθήκης [131].

1.5 ΜίκροRNA (microRNAs, miRNAs) και καρκίνος

1.5.1 Γενικά στοιχεία. Ο διττός ρόλος των miRNAs στον καρκίνο

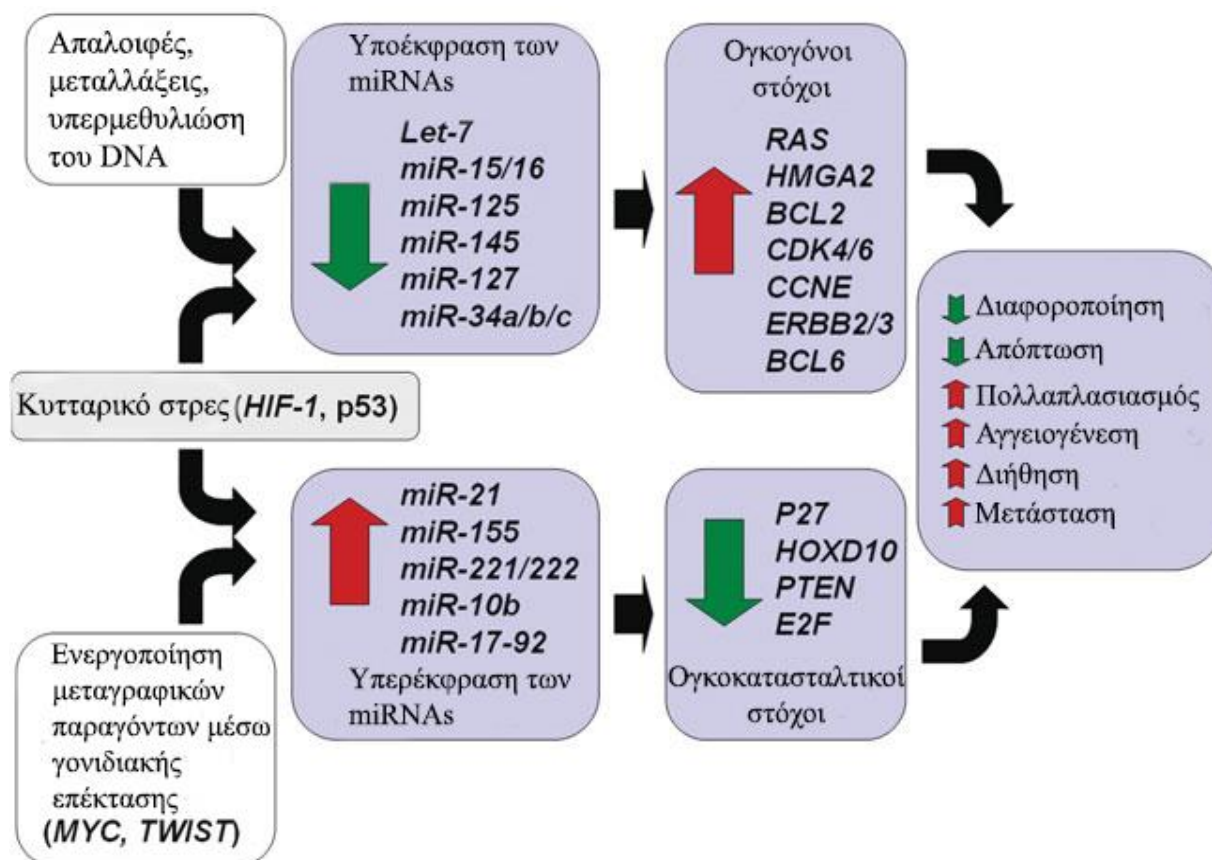
Τα miRNAs είναι μια ομάδα μη κωδικών, φυλογενετικά διατηρημένων, μορίων RNA μεγέθους 19-24 νουκλεοτιδίων με ρυθμιστικές ιδιότητες. Ανακαλύφθηκαν το 1993 στον οργανισμό *C. elegans* και λίγο αργότερα ανιχνεύτηκαν στο βασίλειο των φυτών και των ζώων. Σήμερα, έχουν καταγραφεί πάνω από 15.000 miRNAs με παραπάνω από 1.000 miRNAs να ανήκουν στον άνθρωπο. Η βιοσύνθεση των miRNAs είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός του μορίου pri-miRNA. Στη συνέχεια το ένζυμο Drosha και η πυρηνική πρωτεΐνη DGCR8 διασπούν το μόριο αυτό με αποτέλεσμα τη παραγωγή ενός προδρόμου μορίου, του pre-miRNA το οποίο μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης εξαπορτίνης 5. Στο κυτταρόπλασμα το pre-miRNA διασπάται περαιτέρω από την πρωτεΐνη Dicer και με την βοήθεια επιπλέον παραγόντων σχηματίζεται το σύμπλοκο miRNA:miRNA*, το οποίο αποτελείται από το ώριμο miRNA και το συμπληρωματικό μόριο miRNA*. Το ώριμο miRNA ενσωματώνεται στο το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex), ενώ το μόριο miRNA* συνήθως υφίσταται αποικοδόμηση. Το ώριμο miRNA επιτυγχάνει το ρυθμιστικό του ρόλο καθοδηγώντας το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) έναντι των μορίων mRNA-στόχων με αποτέλεσμα την αποαδενυλίωση-αποικοδόμηση ή την αναστολή της μετάφρασης των mRNAs. Κάθε miRNA μπορεί να στοχεύει παραπάνω από ένα διαφορετικά mRNAs με αποτέλεσμα να επιτυγχάνει την άμεση ή έμμεση ρύθμιση της έκφρασης πολλών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, ένας τύπος mRNA μπορεί να στοχεύεται από διαφορετικά μόρια miRNA [139-144].

Η πρώτη ένδειξη εμπλοκής των miRNA στις ανθρώπινες νεοπλασίες ήταν μη αναμενόμενη. Καθώς εξετάζονταν μια απαλοιφή της χρωμοσωμικής περιοχής 13q14 στη χρόνια

λεμφογενή λευχαιμία από τους Calin *et al* το 2002 [145] βρέθηκε ότι το κοινό σημείο αυτής της περιοχής κωδικοποιούσε για δύο miRNAs τα miR-15a and miR-16-1, τα οποία υποτέθηκε, μετά από αυτές τις παρατηρήσεις ότι είχαν ογκοκατασταλτικό ρόλο. Περεταίρω έρευνες απέδειξαν την ογκοκατασταλτική ιδιότητα αυτών των miRNAs στη λευχαιμία και σε άλλες νεοπλασίες, όπως στον καρκίνο του προστάτη, ανοίγοντας το δρόμο για την ταυτοποίηση επιπρόσθετων miRNA τόσο με ογκοκατασταλτικές όσο και με ογκογόνες ιδιότητες (Εικόνα 1.10). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η οικογένεια των let-7 miRNAs. Έχει αποδειχθεί ότι τα μέλη της οικογένειας let-7 ανιχνεύονται συχνά σε μειωμένα επίπεδα στον καρκίνο, οδηγώντας στην υπερέκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων *RAS*, *HMGA2*, *MYC* και *IMP-1*, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων ρυθμίζουν σε φυσιολογικές καταστάσεις. Τα miRNAs είναι δυνατόν να έχουν και δράση ογκογονιδίων όταν εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Η οικογένεια miR-17-92 αποτελεί το πιο καλά μελετημένο παράδειγμα αυτής της περίπτωσης. Η οικογένεια miR-17-92 αποτελείται από 14 ομόλογα miRNAs τα οποία κωδικοποιούνται από τρεις ομάδες γονιδίων στα χρωμοσώματα 7, 13 και X. Το κλάσμα των γονιδίων στο χρωμόσωμα 13 υφίσταται γονιδιακή επέκταση σε λεμφώματα με αποτέλεσμα την υπερέκφραση πολλών miRNA της προαναφερθείσας οικογένειας, τα οποία σε ταυτόχρονη δράση με το ογκογονίδιο *MYC* επιταχύνουν την ανάπτυξη του όγκου, ενώ έχει καταγραφεί ότι η μεταγραφή αυτού του κλάσματος επάγεται από το *MYC*. Η υπερέκφραση των μελών της οικογένειας miR-17-92 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση καθώς αναστέλλεται η έκφραση των μορίων στόχων E2F, p21 και Bim. Συμπερασματικά τα miRNAs μπορούν να δράσουν ογκοκατασταλτικά αναστέλλοντας τη δράση ογκογονιδίων ή ως ογκογονίδια καταστέλλοντας τη δράση ογκοκατασταλτικών γονιδίων [139, 146-149].

Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs αποτελεί τον κύριο μηχανισμό πρόκλησης της ογκογόνου δράση τους (Εικόνα 1.10). Η ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο *MYC* που ρυθμίζει την οικογένεια miR-17-92, ο *MYCN* που ρυθμίζει την έκφραση του miR-221 και του *TWIST* που ρυθμίζει την έκφραση του miR-10b, αποτελεί ένα κύριο μηχανισμό υπεύθυνο για την απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs στον καρκίνο. Η παρουσία υποξικού περιβάλλοντος έχει φανεί να επάγει την έκφραση αρκετών miRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-21, 23, 24, 26, 27, 30, 93, 103, 106, 107, 181, 192, 195, 210 και 213. Κάποια από αυτά τα miRNAs αναστέλλουν την έκφραση των κασπασών με αποτέλεσμα να προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση. Πολλά από τα miRNAs που υπερεκφράζονται

στον καρκίνο επάγονται σε υποξικές συνθήκες και στοχεύουν προαποπτωτικά μόρια. Επομένως, μπορεί να υποτεθεί ότι η αύξηση της έκφρασης των miRNAs σε καρκινικά κύτταρα υπό συνθήκες στρες είναι ένας μηχανισμός κυτταρικής επιβίωσης, καθώς παρακάμπτεται η διαδικασία της απόπτωσης. Πρόσφατες μελέτες περιγράφουν ότι η έκφραση της οικογένειας miR-34 επάγεται από τη βλάβη στο DNA μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απευθείας ρύθμιση από τον p53 ογκοκατασταλτικό μεταγραφικό παράγοντα με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Εκτός από τα μέλη της οικογένειας miR-34 κι άλλα miRNAs ρυθμίζονται από τον p53 και μάλιστα πολλά από αυτά συνδέονται με τον καρκίνο. Τα πιο σημαντικά μόρια αυτής της κατηγορίας είναι τα miR-15/miR-16 τα οποία στοχεύουν τα mRNAs του ογκογονιδίου *BCL2* και το let-7 που στοχεύει τα mRNAs των ογκογονιδίων *RAS* και *HMGA2*. Επίσης ο p53 επάγει την έκφραση του miR-145 και θεωρείται ότι η απώλεια του miR-145 που παρατηρείται σε πολλές νεοπλασίες ακολουθεί την απενεργοποίηση του p53. Το ενδιαφέρον είναι ότι και το miR-145 μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του p53 και με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα κύκλωμα θετικής ανάδρασης. Η έκφραση των miRNAs δύναται να ρυθμίζεται και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο καθώς έχουν ανακαλυφθεί πρωτεΐνες (Lin28, Lin28b) οι οποίες αναστέλλουν την ωρίμανση των miRNAs. Οι γονιδιακές ανωμαλίες (απαλοιφές, διπλασιασμοί χρωμοσωμικών περιοχών, σημειακές μεταλλάξεις, μη φυσιολογική μεθυλίωση υποκινητών γονιδίων) που έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές νεοπλασίες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs [139, 146-149].



Εικόνα 1.10. Τα miRNAs μπορούν να δρουν είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια αναστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με ογκοκατασταλτική ή ογκογόνο δράση, αντιστοίχως [139].

1.5.2 MiRNAs και καρκίνος του προστάτη

1.5.2.1 Ο ρόλος των miRNAs στη μοριακή παθολογία του καρκίνου του προστάτη

Πληθώρα miRNA μορίων έχουν μελετηθεί όσον αφορά τη δράση τους στα διάφορα στάδια εξέλιξης του καρκίνου του προστάτη [63, 150, 151]. Παρακάτω ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των σημαντικότερων μορίων και του ρόλου τους κατατάσσοντας τα σε δυο κατηγορίες: σε miRNAs που εμφανίζουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και σε miRNAs που διαθέτουν ογκογόνο δράση.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν περιγράψει τις προ-αποπτωτικές ιδιότητες του miR-34a, το οποίο ρυθμίζεται από το p53 και στοχεύει την κινάση CDK6, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη. Ένα άλλο μέλος της οικογένειας miR-34, το miR-34c αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση ρυθμίζοντας την έκφραση των ογκογονιδίων *E2F3*

και *BCL-2*. Το μόριο *let-7a* αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση στη φάση G1/S σε καρκινικά κύτταρα προστάτη στοχεύοντας τα mRNAs των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *E2F2* και *CCND2*. Το *miR-16* αναστέλλει την ανάπτυξη των προστατικών όγκων στα οστά, πιθανώς μέσω της αναστολής της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες *CDK1* και *CDK2*. Η επαγωγή της έκφρασης του *miR-205* σε καρκινικά κύτταρα προστάτη επάγει την αναστροφή του φαινομένου EMT (επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή) αυξάνοντας τα επίπεδα της E-καδερίνη και μειώνοντας την κινητικότητα των κυττάρων, όπως και τη διηθητική τους ικανότητα. Το *miR-205* αναστέλλει την έκφραση αρκετών ογκογονιδίων όπως αυτά που κωδικοποιούν για την ιντερλευκίνη-6, την καβεολίνη-1 και τον παράγοντα *EZH2*. Επίσης το *miR-200* αναστέλλει το φαινόμενο EMT στοχεύοντας τα mRNAs των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μεταγραφικούς παράγοντες *ZEB1* και *ZEB2* με αποτέλεσμα τη μεταστροφή προς την επιθηλιακή μορφολογία και τη μείωση της επιθετικότητας των κυττάρων προστάτη. Τα *miR-143* και *miR-145* έχουν προταθεί και αυτά να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστροφή του φαινομένου EMT. Η υπερέκφραση των *miR-143* και *miR-145* σε καρκινικά κύτταρα προστάτη οδηγεί στην μείωση των επιπέδων των μεσεγχυματικών δεικτών βιμεντίνη και φιμπρονεκτίνη και στην αύξηση των επιπέδων της E-καδερίνης [63, 146, 150-152]. Ογκοκατασταλτικές ιδιότητες κατέχουν επίσης τα παρακάτω miRNAs: το *miR-126** το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *SLC45A3* που διαφυλάσσει την κινητικότητα και την επιθετικότητα των προστατικών καρκινικών κυττάρων, τα *miR-373* και *miR-520c* που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα κυτταρικής προσκόλλησης *CD44* και το *miR-146a* που στοχεύει τα mRNAs του γονιδίου της Rho-εξαρτώμενη κινάσης *ROCK1* [63, 150, 152].

Στον αντίποδα του ογκοτασταλτικού ρόλου των miRNAs που προαναφέρθηκαν έχουν αναγνωριστεί και συγκεκριμένα miRNAs με ογκογόνο δράση στον καρκίνο του προστάτη. Πειράματα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη έδειξαν ότι η ομάδα *miR-106b-25* και *miR-32* κατέχει ογκογόνο δράση καθώς αναστέλλει την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *E2F1*, *P21* και *BIM* και καταστέλλει την ενεργοποίηση των κασπασών και την απόπτωση. Η ομάδα *miR-17-92* αναστέλλει και αυτή τη διαδικασία της απόπτωσης σε καρκινικές σειρές προστάτη μέσω της αναστολής των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *E2F2* και *E2F3*. Τα *miR-221* και *miR-222* θεωρούνται ογκογόνα, καθώς σχετίζονται με την ανάπτυξη μεταστάσεων στον καρκίνο του προστάτη. Το *miR-21* θεωρείται ότι κατέχει

σημαντικό ρόλο στην αναστολή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, ενώ έχει προταθεί ότι ρυθμίζεται από το μονοπάτι του υποδοχέα των ανδρογόνων. Το miR-125b έχει συσχετιστεί με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων προστάτη [63, 151-153].

1.5.2.2 Τα miRNAs ως μοριακοί δείκτες για τον καρκίνο του προστάτη: Πιθανές εφαρμογές στη διάγνωση και την πρόγνωση της νόσου

Οι αρχικές μελέτες σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs σε ιστούς προστάτη, βασιζόμενες στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays), παρήγαγαν αντιφατικά αποτελέσματα, καθώς κάποιες από αυτές ανέφεραν ότι τα miRNAs γενικά εμφανίζονται σε μειωμένα επίπεδα στον καρκίνο του προστάτη, ενώ άλλες υπεδείκνυν μια γενική υπερέκφραση των miRNAs [150, 151]. Η μελέτη των Porkka *et al* [152] οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός προφίλ miRNA το οποίο είναι ικανό να ξεχωρίσει τους καρκινικούς ιστούς από την καλοήγη προστατική υπερπλασία και να κατατάξει τα δείγματα των καρκινικών ιστών προστάτη σε σχέση με την εξάρτησή τους από τα ανδρογόνα [152]. Οι Tong *et al* [154] χρησιμοποίησαν καρκινικά και μη καρκινικά μέρη από δείγματα ιστού ασθενών με καρκίνο του προστάτη και κατάφεραν να αναγνωρίσουν πέντε miRNAs (miR-23b, miR-100, miR-145, miR-221, και miR-222) τα οποία υποεκφράζονται στο καρκινικό μέρος του ιστού [154], ενώ η ομάδα των Schaefer *et al* [155], χρησιμοποιώντας παρόμοια προσέγγιση, κατέληξε ότι τα miR-16, miR-31, miR-125b, miR-145, miR-149, miR-181b, miR-184, miR-205, miR-221 και miR-222 υποεκφράζονται και τα miR-96, miR-182, miR-182*, miR-183 και miR-375 υπερεκφράζονται στον καρκίνο του προστάτη [155]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα miRNAs των οποίων τα επίπεδα διαφοροποιούνται στον ορό ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σχέση με υγιή άτομα ή ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία, καθώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ως διαγνωστικά εργαλεία. Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι το miR-141 αποτελεί ένα από τα miRNA με τις σημαντικότερες μεταβολές, εμφανίζοντας 46 φορές αύξηση στον ορό ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Επιπλέον, ο προσδιορισμός του miR-141 στον ορό μπορεί να ανιχνεύσει ασθενείς με καρκίνο του προστάτη με 60% ευαισθησία, 100% ειδικότητα και με AUC = 0,907 στην καμπύλη ευαισθησίας-ειδικότητας ROC [156, 157]. Η μελέτη των Lodes *et al* [158] πρότεινε ότι τα miR-16, miR-92a, miR-103, miR-107, miR-197, miR-34b, miR-328, miR-485-3p, miR-486-5p, miR-92b, miR-574-3p, miR-636, miR-640, miR-766, και miR-885-5p είναι αυξημένα στον ορό ασθενών με καρκίνο

του προστάτη ωστόσο τα συμπεράσματα αυτά έχουν βασιστεί σε μικρό αριθμό δειγμάτων [158]. Η ερευνητική ομάδα των Mahn *et al* [159] έδειξε ότι τα miR-26a, miR-195 και let-7i παρουσιάζονται σε αυξημένα επίπεδα στον ορό ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σχέση με τον ορό ατόμων που πάσχουν από καλοήγη προστατική υπερπλασία. Μάλιστα όταν αυτά τα miRNAs χρησιμοποιηθούν σε κατάλληλους συνδυασμούς μπορούν να επιτευχθούν αυξημένες τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας [159].

Εκτός από τις πιθανές εφαρμογές τους στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη τα miRNAs έχουν μελετηθεί και ως δείκτες εξέλιξης της νόσου συγκρίνοντας δείγματα ιστών από πρωτογενείς όγκους, διάφορα στάδια της νόσου και από σημεία μετάστασης [160]. Έχει βρεθεί ότι τα let-7c, miR-100, miR-101 και miR-218 υποεκφράζονται στο στάδιο της μετάστασης. Τα επίπεδα των miR-145, miR-221, miR-34c και miR-96 μειώνονται σε ασθενείς που παρουσιάζουν υποτροπές ή/και μεταστάσεις και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες εξέλιξης της νόσου [153, 155, 160-162]. Ενδιαφέρουσες μελέτες για την προγνωστική αξία των miRNAs έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας δείγματα ορού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Ο προσδιορισμός του miR-375 είναι χρήσιμος για τον προσδιορισμό ατόμων με μεταστατική νόσο, ενώ τα επίπεδα των miR-141, miR-221 και miR-21 στον ορό αυξάνονται σε επιθετικούς όγκους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του miR-21 καθώς τα επίπεδα του στον ορό σχετίζονται με ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία [156, 157, 162]. Τέλος, η ερευνητική ομάδα των Moltzahn *et al* [163] παρατήρησε ότι τα επίπεδα των miR-93, miR-106a και miR-24 παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στη μεταστατική νόσο [163].

1.5.3 miRNA και καλλικρεΐνες

1.5.3.1 Ο ρόλος του άξονα αλληλεπίδρασης miRNA-KLKs στον καρκίνο

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι τα γονίδια των καλλικρεϊνών ρυθμίζονται εκτενώς από συγκεκριμένα miRNAs (Πίνακας 1.4). Η συμμετοχή των miRNAs στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των καλλικρεϊνών αποτελεί μια ενδιαφέρουσα υπόθεση καθώς μπορεί να εξηγήσει αρκετά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν την έκφραση των καλλικρεϊνών όπως είναι οι ασυμφωνίες μεταξύ των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης, η παράλληλη έκφραση καλλικρεϊνών στον ίδιο τύπο ιστού και η κοινή απορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων καλλικρεϊνών σε παθολογικές καταστάσεις [164]. Η ομάδα των Chow *et al* [165], το 2008, ήταν η πρώτη που περιέγραψε τη σχέση miRNAs-καλλικρεϊνών, καθώς με τη

χρήση αλγορίθμων βιοπληροφορικής ανέδειξε 96 πιθανές αλληλεπιδράσεις, ενώ επιβεβαίωσε και πειραματικά τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *KLK6* και *KLK10* από το *let-7f*. Το πιο συχνά στοχευόμενο μέλος της οικογένειας των καλλικρεϊνών είναι η *KLK10* και ακολουθούν οι *KLK5* και *KLK13* [165]. Η έκφραση κάθε γονιδίου της οικογένειας των καλλικρεϊνών μπορεί να ρυθμίζεται από παραπάνω ένα miRNA, αλλά και ένα miRNA μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση παραπάνω από ενός γονιδίων καλλικρεϊνών. Οι κανόνες που διέπουν τη λειτουργία του μηχανισμού που περιγράφεται ως άξονας miRNAs-KLKs περιπλέκονται ακόμα περισσότερο όταν ληφθεί υπόψη ότι οι καλλικρεΐνες μπορούν κι αυτές με τη σειρά τους να ελέγχουν τα επίπεδα των miRNAs, επιδρώντας σε κατάλληλους υποκινητές. Προκαταρκτικά αποτελέσματα προτείνουν ότι ορισμένες καλλικρεΐνες ανιχνεύονται στον πυρήνα, όπου δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Επίσης, ένας εναλλακτικός τρόπος ρύθμισης της βιοδιαθεσιμότητας των miRNAs από τις καλλικρεΐνες είναι η κατανάλωση της πεπερασμένης ποσότητας των miRNAs από τα mRNA μόρια στόχους μέσω της πρόσδεσής των miRNAs σε αυτά. Η υπόθεση αυτή προσδίδει κι έναν επιπλέον ρόλο για τα εναλλακτικά μετάγραφα των καλλικρεϊνών. Μια πρόσφατη θεωρία προτείνει ότι γονίδια με μεγάλο βαθμό ομολογίας στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή και σε σχετιζόμενα στοιχεία απόκρισης στα miRNAs, όπως τα γονίδια *KLKs*, μπορούν να επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των miRNAs. Η απορρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου *KLK* σε επίπεδο mRNA μπορεί να επηρεάσει τη βιοδιαθεσιμότητα των miRNAs που στοχεύουν άλλα μέλη της γονιδιακής οικογένειας των καλλικρεϊνών και επομένως να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης τους [105, 164, 165].

Ο άξονας miRNAs-KLKs έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής στους καρκίνους του προστάτη, της ωοθήκης και του νεφρού [105, 164]. Η μελέτη των White *et al* [166] παρείχε τις πρώτες πληροφορίες για την απορρύθμιση του προαναφερθέντος άξονα στον καρκίνο του νεφρού αναφέροντας ότι 61 από τα 117 miRNAs που απορρυθμίζονται στη νεοπλασία αυτή στοχεύουν mRNA γονιδίων της οικογένειας των καλλικρεϊνών [166]. Τα πιο συχνά απορρυθμισμένα miRNAs στον καρκίνο του νεφρού, δηλαδή τα miR-122, miR-210 και miR-224 στοχεύουν τα mRNA των γονιδίων *KLK1*, *KLK2*, *KLK5*, *KLK7*, *KLK10*, *KLK11*, και *KLK15*. Επίσης η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *KLK1* από το miR-224 και η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *KLK10* από το *let-7f* έχουν επιβεβαιωθεί και πειραματικά. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί και για τον καρκίνο της ωοθήκης. Το 63% των miRNAs που παρουσιάζουν απορρυθμισμένη έκφραση στον καρκίνο της ωοθήκης στοχεύουν mRNA των γονιδίων της

οικογένειας των καλλικρεϊνών. Τα επίπεδα έκφρασης του 49% των miRNAs των οποίων η έκφραση απορρυθμίζεται στον καρκίνο της ωοθήκης συσχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης των καλλικρεϊνών, δηλαδή αυξημένη έκφραση των miRNAs αυτών σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης των *KLK* γονιδίων στόχων. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί πειραματικά η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *KLK10* από τα miR-224, miR-516a και let-7f σε καρκινικά κύτταρα ωοθήκης. Η επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς OVCAR-5 με τα προαναφερθέντα miRNAs οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης *KLK10*. Το φαινόμενο αυτό συνοδεύτηκε και από παράλληλη μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [166, 167]. Όσον αφορά τον καρκίνο του προστάτη, από το σύνολο των miRNAs που απορρυθμίζονται στη νόσο τα 55 στοχεύουν mRNAs καλλικρεϊνών και 7 από αυτά στοχεύουν παραπάνω από μια καλλικρεΐνες. Η υπερέκφραση των miRNAs αυτών συσχετίστηκε και στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη με μείωση των επιπέδων έκφρασης των καλλικρεϊνών-στόχων. Ενδεικτικά αναφέρεται η σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ miR-143 – *KLK2*, miR-331 – *KLK4* και miR-21 – *KLK10*. Η αλληλεπίδραση miRNA– *KLKs* επιβεβαιώθηκε και στην καρκινική σειρά προστάτη DU-145. Η επιμόλυνση των κυττάρων DU-145 με τα miR-331 και miR-143 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των *KLK4* και *KLK10*, αντίστοιχα και συνοδεύτηκε, και στις δύο περιπτώσεις, από μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων [105, 164]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των miRNAs και του PSA (*KLK3*) ανακαλύφθηκε πρόσφατα από τους Sun *et al* [168], οι οποίοι απέδειξαν ότι τα miR-99a, miR-100 και miR-125b ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *KLK3*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα miRNAs που στοχεύουν την οικογένεια των καλλικρεϊνών και απορρυθμίζονται στον καρκίνο του προστάτη συμμετέχουν σε σημαντικά μονοπάτια σηματοδότησης της νόσου, όπως αυτό του υποδοχέα των ανδρογόνων [168]. Ο άξονας miRNA-*KLKs* αποδείχτηκε πρόσφατα ότι έχει και κλινική αξία, καθώς ο παράλληλος προσδιορισμός των επιπέδων του PSA με τα επίπεδα των miR-141 και miR-21 αυξάνει την ικανότητα ανίχνευσης του καρκίνου του προστάτη [169].

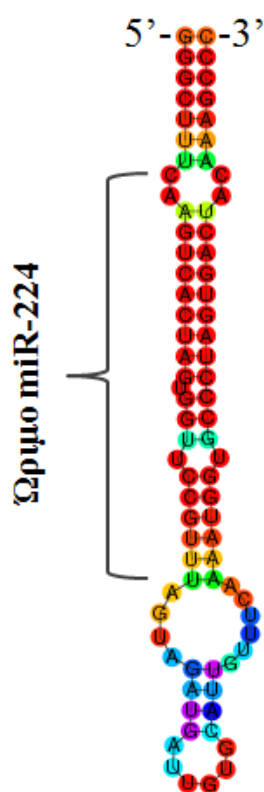
Πίνακας 1.4. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων της οικογένειας των καλλικρεϊνών που έχουν βρεθεί ότι απορρυθμίζονται σημαντικά στον καρκίνο του προστάτη και miRNAs όπως έχουν προβλεφθεί από κατάλληλους αλγόριθμους βιοπληροφορικής [164].

Καλλικρεΐνη	miRNA	Αριθμός αλγορίθμων	Θέσεις στόχευσης
KLK2	hsa-miR-211	2	1
	hsa-miR-324	2	1

	hsa-miR-337	2	1
	hsa-miR-502	2	4
KLK4	hsa-miR-422	2	1
	hsa-miR-548d	2	1
	hsa-miR-637	2	5
	hsa-miR-765	2	10
	hsa-miR-106a-b	2	1
KLK5	hsa-miR-122a	2	1
	hsa-miR-125a-b	2	2
	hsa-miR-143	2	1
	hsa-miR-17	2	1
	hsa-miR-185	3	1
	hsa-miR-20b	2	1
	hsa-miR-299	2	1
	hsa-miR-326	2	1
	hsa-miR-491	2	2
	hsa-miR-519d-e	2	1
	hsa-miR-199a-b	2	1
	hsa-miR-30a	2	1
KLK7	hsa-miR-33a	2	1
	hsa-miR-338	2	1
	hsa-miR-369	2	1
	hsa-miR-509	2	1
	hsa-miR-519a,c	2	1
	hsa-miR-591	2	1
	hsa-miR-628	2	1
	hsa-let-7a-g	3	1
	hsa-miR-148a-b	2	1
KLK10	hsa-miR-197	2	2
	hsa-miR-214	2	2
	hsa-miR-224	2	1
	hsa-miR-326	2	2
	hsa-miR-377	2	1
	hsa-miR-496	2	2
	hsa-miR-516a-b	2	3
	hsa-miR-598	2	1
	hsa-miR-98	3	1
	hsa-miR-186	2	1
	hsa-miR-409	2	1
	hsa-miR-495	2	1
KLK11	hsa-miR-511	2	1
	hsa-miR-542	2	1
	hsa-miR-612	2	1
KLK14	hsa-miR-612	2	1

	hsa-miR-661	2	1
KLK15	hsa-miR-224	3	1
	hsa-miR-498	2	1
	hsa-miR-552	2	1
	hsa-miR-608	2	1
	hsa-miR-638	2	1
	hsa-miR-663	2	1

1.5.3.2 Το μικροRNA 224 (miRNA-224): Ένα miRNA ρυθμιστής της έκφρασης των καλλικρεϊνών με σημαντική συμμετοχή στις ανθρώπινες νεοπλασίες



Εικόνα 1.11.

Η δευτεροταγής δομή του pre-miR-224 σύμφωνα με το πρόγραμμα RNAfold (ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το miR-224 (Εικόνα 1.11) στοχεύει αρκετά μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών και συγκεκριμένα τα γονίδια *KLK1*, *KLK10* αλλά και το γονίδιο *KLK15* [164, 165]. Το miR-224 εμπλέκεται στη ρύθμιση αρκετών φυσιολογικών διαδικασιών όπως είναι η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων του δέρματος, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων και η ρύθμιση της διαδικασίας της απόπτωσης [170-172]. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση του με αρκετές νεοπλασίες όπου ενδέχεται να παρουσιάζει ογκοκατασταλτική ή ογκογόνο δράση ανάλογα με τον τύπο της νεοπλασίας [173-188].

Το miR-224 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στους καρκινικούς όγκους του θυρεοειδή αδένα [182, 189], στον επιθετικό καρκίνο του παγκρέατος [181], στον καρκίνο του νεφρού [179], στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [177, 178, 186, 190], στον καρκίνο του παχέος εντέρου [191, 192], σε μια υποομάδα ασθενών με λευχαιμία, και σε μια υποομάδα καρκινικών όγκων προστάτη που παρουσιάζουν περινευρική διήθηση. Έχει βρεθεί ότι η κινάση τυροσίνης Src επάγει την έκφραση του miR-224 και την επακόλουθη αύξηση των καρκινικών κυττάρων [193]. Επίσης, το miR-224 μεταβάλλει το φαινότυπο των ηπατικών κυττάρων σε καρκινικό και αυξάνει την

κινητικότητα και τη διηθητική ικανότητά τους [178, 190]. Η σαφής υπερέκφραση του miR-224 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αρκετών διαφορετικών

μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων αυτών της επιγενετικής τροποποίησης και της συμμετοχής του μοριακού μονοπατιού p65/NFκappaB [185].

Μια εντελώς διαφορετική εικόνα έχει περιγραφεί στις περιπτώσεις του καρκίνου της ωοθήκης [176], του καρκίνου του πνεύμονα [194], του καρκίνου του μαστού [174, 195], του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας [184] και του καρκίνου του προστάτη [180] όπου το miR-224 φαίνεται να υποεκφράζεται σε σχέση με αντίστοιχους μη καρκινικούς ιστούς. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το miR-224 μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από την πρωτεΐνη Ubc9 κυτταρική αύξηση στοχεύοντας απευθείας τα σχετιζόμενα με τη μετάσταση γονίδια *CDC42* και *CXCR4* σε καρκινικά κύτταρα μαστού [195]. Επιπρόσθετα, το miR-224 μπορεί να επάγει απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα μέσω της στόχευσης του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον αναστολέα απόπτωσης-5 (apoptosis inhibitor-API5) [171], καθώς και να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να αυξήσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου στη ακτινοβολία [175]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η επιμόλυνση καρκινικών κυττάρων ωοθήκης με το miR-224 μειώνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, ενώ παράλληλα μειώνει και τα επίπεδα της *KLK10* [167]. Το miR-224 σχετίζεται με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία καθώς τα επίπεδα του μειώνονται δραματικά μετά από την επώαση καρκινικών σειρών παχέος εντέρου με τη 5-φλουοουρακίλη [196], ενώ έχει αποδειχτεί ότι υποεκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν αντίσταση στη μεθοτρεξάτη [197].

Η σημαντική και πολύπλευρη συσχέτιση του miR-224 με τις ανθρώπινες νεοπλασίες μπορεί να εξηγηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, από το γεγονός ότι στοχεύει και ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που συνδέονται με τον καρκίνο. Οι στόχοι του miR-224 είναι τα mRNAs των γονιδίων *API5*, *AP2M1*, *CDC42*, *CXCR4*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SLMAP*, *H3.3B*, *DIO1*, *DMN1*, *VHL*, *HIF1A*, *KLK1*, *KLK10*, και *KLK15*, τα οποία σχετίζονται ποικιλοτρόπως με την ανάπτυξη και την εξέλιξη κακοήθων όγκων [167, 170-175, 178-181, 185, 187, 189, 193, 195, 198]. Όσον αφορά τον καρκίνο του προστάτη το γονίδιο *CXCR4* υπερεκφράζεται, πιθανώς μέσω μετα-μεταγραφικών μηχανισμών, και σχετίζεται με την ανάπτυξη μεταστατικής νόσου [199, 200], ενώ και το γονίδιο *HIF1A* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε επιθετικούς όγκους του αδένου [61]. Το γονίδιο *KLK15*, όπως αποδεικνύουν και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, υπερεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη και μάλιστα τα επίπεδα έκφρασής του συσχετίζονται αντιστρόφως με τα επίπεδα του miR-224.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί την πιο συχνή νεοπλασία του ανδρικού πληθυσμού στις ανεπτυγμένες χώρες. Το PSA κατέχει κυρίαρχο ρόλο στο τομέα της διάγνωσης και της πρόγνωσης των προστατικών νεοπλασιών. Ωστόσο, οι αυξημένες τιμές του PSA στην καλοήγη υπερπλασία μειώνουν σημαντικά τη διαγνωστική του ειδικότητα, ενώ η εκτεταμένη χρήση του μπορεί να οδηγήσει σε διάγνωση «αθώων» όγκων του αδένα και την επεμβατική θεραπεία τους, χωρίς σημαντικά οφέλη για τους ασθενείς. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η ταυτοποίηση νέων μοριακών δεικτών για τον καρκίνο του προστάτη.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο την ανάλυση της έκφρασης, μέσω ανάπτυξης ευαίσθητων μεθοδολογιών, τη μελέτη και την κλινική αξιολόγηση, των γονιδίων των καλλικρεϊνών *KLK13*, *KLK15* καθώς και του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη ως νέων μοριακών δεικτών για τη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου, καθώς και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών. Οι καλλικρεΐνες αποτελούν μια οικογένεια από 15 γονίδια εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης, οι οποίες έχουν συνδεθεί επανειλημμένως με τον καρκίνο. Απορρυθμισμένη έκφραση των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* έχει βρεθεί σε πληθώρα νεοπλασιών. Ένα ιδιαίτερα γρήγορα αναπτυσσόμενο πεδίο όσον αφορά την έρευνα για τον καρκίνο είναι η μελέτη των miRNAs τα οποία θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενοι καρκινικοί δείκτες. Το miR-224 στοχεύει μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου *KLK15*, και σχετίζεται με την εξέλιξη αρκετών νεοπλασιών. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία ενός σημαντικού μεγέθους δείγματος καρκινικών και καλοηθών ιστών προστάτη. Αναλύθηκε η έκφραση των κλασικών και εναλλακτικών mRNA μεταγράφων των γονιδίων *KLK15* και *KLK13*, σε ιστούς και καρκινικές σειρές προστάτη, μέσω συμβατικής PCR, ενώ πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης *KLK13* σε ιστούς προστάτη. Αναπτύχθηκε ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK15* και *KLK13* μέσω ειδικών ιχνηθετών TaqMan στους ιστούς προστάτη. Επίσης, αναπτύχθηκε ποσοτική PCR, με τη χρήση της SYBR Green, και εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων του miR-224, σε ιστούς προστάτη. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση της επίδρασης χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προστάτη και στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκτενής βιοστατιστική ανάλυση για την εκτίμηση της κλινικής αξίας των μελετώμενων βιομορίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής συλλέχθηκαν 150 δείγματα ιστού συνολικά. Από αυτά, 78 δείγματα προήλθαν από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και 72 από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Α' Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Λαϊκό» υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Κωνσταντίνου Στραβοδήμου. Τα δείγματα των ιστών προέκυψαν από επεμβάσεις διουρηθρικής προστατεκτομής ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία και ριζικής προστατεκτομής ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Η διαδικασία εξαίρεσης του καρκινικού μέρους του ιστού έγινε με βάση τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του όγκου και τα αποτελέσματα της βιοψίας. Κατά τη συλλογή των δειγμάτων κάθε ιστός χωρίστηκε σε δύο όμοια μέρη (mirror-images). Το ένα μέρος από κάθε ιστό εξετάστηκε για την επιβεβαίωση της παρουσίας καρκίνου και την καταγραφή των ιστολογικών χαρακτηριστικών. Το δεύτερο μέρος από κάθε ιστό καταψύχθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκε μέχρι την επεξεργασία του, στους -80 °C. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του προστάτη και των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία που συμπεριλήφθησαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

<i>Ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (n = 78)</i>	
Ηλικία (έτη)^a	65 (52 – 76)
PSA (ng/ml)^a	7,65 (2,20 – 41,8)
Χρόνος παρακολούθησης (follow-up) σε μήνες^a	31 (1 – 74)
DRE	N (%)
Αρνητική	32 (41,0)
Θετική	44 (56,4)
Αμφίβολη	2 (2,6)

Gleason score	N (%)
5	2 (2,6)
6	23 (29,5)
7	43 (55,1)
8	6 (7,7)
9	3 (3,8)
x	1 (1,3)
Παθολογοανατομικό Στάδιο	N (%)
pT2a	18 (23,1)
pT2b	19 (24,4)
pT2c	12 (15,4)
pT3a	16 (20,5)
pT3b	11 (14,1)
pT4	2 (2,6)
Βιοχημική υποτροπή	N (%)
Παρουσία	23 (29,5)
Απουσία	39 (50,0)
x^β	16 (20,5)
Χρόνος έως τη βιοχημική υποτροπή (μήνες)^α	18 (1 – 69)
<i>Ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (n = 72)</i>	
Ηλικία (έτη)^α	70 (48 – 86)
PSA (ng/ml)^α	4,00 (0,500 – 25,6)

DRE	N (%)
Αρνητική	62 (86,1)
Θετική	2 (2,8)
Αμφίβολη	8 (11,1)

^α Διάμεση τιμή (Εύρος).

^β Ασθενείς που δεν ήταν διαθέσιμοι για follow-up είτε έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία μετά το χειρουργείο.

Η διάμεση τιμή της ηλικίας των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία ήταν 70 έτη (εύρος = 48 – 86 έτη, μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα = $70 \pm 0,9$), ενώ η αντίστοιχη τιμή για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη υπολογίστηκε στα 65 έτη (εύρος = 52 – 76 έτη, μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα = $65 \pm 0,7$).

Η διάμεση τιμή για τα προεγχειρητικά επίπεδα PSA στους ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία υπολογίστηκε στα 4,00 ng/mL (εύρος 0,500 – 25,6 ng/mL, μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα = $5,26 \pm 0,68$ ng/mL), ενώ η αντίστοιχη τιμή για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη υπολογίστηκε στα 7,65 ng/mL (εύρος = 2,20 – 41,8 ng/mL, μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα = $9,11 \pm 0,66$).

Το 32,1 % των ασθενών με καρκίνο του προστάτη εμφάνισε Gleason score ≤ 6 , το 55,1 % εμφάνισε Gleason score = 7 και το 11,5 % εμφάνισε Gleason score > 7 . Οι ασθενείς με πρώιμο παθολογικό στάδιο ($< pT2c$) ανήλθαν στο 47,5 %.

Στην ανάλυση επιβίωσης συμπεριλήφθησαν 62 από τους 78 ασθενείς. Οι υπόλοιποι 16 αποκλείστηκαν καθώς είτε δεν ήταν διαθέσιμοι κατά τη διαδικασία του follow-up είτε διότι έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία αμέσως μετά το χειρουργείο, εξαιτίας υψηλού κινδύνου εμφάνισης υποτροπής. Ο χρόνος της βιοχημικής υποτροπής ορίστηκε, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ως το διάστημα που μεσολάβησε από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου έως ότου σημειωθούν δύο διαδοχικές μετρήσεις $PSA \geq 0,2$ ng/mL για τους ασθενείς που εμφάνισαν υποτροπή, ενώ για τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν βιοχημική υποτροπή ως ο χρόνος που μεσολάβησε από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου έως την τελευταία μέτρηση του PSA. Η διάμεση τιμή του χρόνου παρακολούθησης ήταν 31 μήνες (εύρος = 1 – 74 μήνες).

2.2 Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145

2.2.1 Ιδιότητες των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής καλλιεργήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145, με σκοπό:

- i) την ανάλυση έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στις τρεις κλασικές καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη.
- ii) την επιλογή κυτταρικών σειρών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή δειγμάτων θετικού ελέγχου για τις μεθοδολογίες ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.
- iii) την επιλογή της καταλληλότερης κυτταρικής σειράς για περεταίρω πειράματα που αφορούν την επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*.

Οι κυτταρικές σειρές LNCaP, PC-3, και DU145 αποτελούν τις περισσότερο διαδεδομένες κυτταρικές σειρές στην έρευνα του καρκίνου του προστάτη. Οι τρεις αυτές κλασικές κυτταρικές σειρές προστάτη διαφέρουν μεταξύ τους όχι μόνο μορφολογικά αλλά και σε μοριακό επίπεδο. Η κυριότερη διάκριση που μπορεί να γίνει σχετικά με τις τρεις αυτές κυτταρικές σειρές είναι ότι η σειρά LNCaP θεωρείται ορμονο-εξαρτώμενη, ενώ οι κυτταρικές σειρές PC-3 και DU145 θεωρούνται ορμονο-ανεξάρτητες και αποτελούν πειραματικό μοντέλο για τα επιθετικά στάδια της νόσου [201]. Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της κάθε κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιήθηκε αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 2.2).

Η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη LNCaP (κλώνος Fast Growing Colony-FGC, ATCC Number: CRL-1740) προέρχεται από τον αριστερό υποκλείδιο λεμφαδένα Καυκάσιου ανδρός ηλικίας 50 ετών, ο οποίος έπασχε από μεταστατική νόσο. Η κυτταρική σειρά LNCaP εμφανίζει επιθηλιακή μορφολογία και σχετικά αργό ρυθμό διπλασιασμού (περίπου 40 ώρες). Χαρακτηριστικά της κυτταρικής αυτής σειράς αποτελούν η χαλαρή προσκόλληση στο στερεό υπόστρωμα της φιάλης καλλιέργειας, η δημιουργία ανομοιόμορφης μονοστιβάδας, η απουσία δημιουργίας πλήρους ταπητίου και η αποκόλληση της πλειονότητας των κυττάρων μετά την πλήρωση της επιφάνειας καλλιέργειας. Κατά την ανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς LNCaP είναι απαραίτητο τα κύτταρα να μείνουν ανέπαφα για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 48 ωρών ούτως ώστε να είναι δυνατή η προσκόλληση τους στη φιάλη. Η θρυψινοποίηση και η

αποκόλληση της κυτταρικής σειράς LNCaP από τη φιάλη καλλιέργειας οδηγεί σε κυτταρικά συσσωματώματα, γεγονός που δυσκολεύει τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων. Σε μοριακό επίπεδο, τα κύτταρα LNCaP παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ανευπλοειδίας διαθέτοντας από 33 έως 91 χρωμοσώματα. Εκφράζουν, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, το PSA και η έκφραση αυτή επάγεται από φυσιολογικές συγκεντρώσεις διϋδροτεστοστερόνης. Τα κύτταρα LNCaP εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων, ο οποίος φαίνεται να είναι λειτουργικός, και για το λόγο αυτό η κυτταρική σειρά LNCaP είναι η μοναδική από τις κλασικές καρκινικές σειρές προστάτη που θεωρείται ορμονοεξαρτώμενη. Τέλος, τα LNCaP εκφράζουν την KLK2 και τις κυτοκερατίνες 8 και 18, ενώ δεν εκφράζουν τις κυτοκερατίνες 5 και 14 [201, 202].

Η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη PC-3 (ATCC Number: CRL-1435) έχει απομονωθεί από οστική μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος Καυκάσιου άνδρα ηλικίας 62 ετών. Τα κύτταρα PC-3 έχουν επιθηλιακή μορφολογία, προσκολλώνται σταθερά στο στερεό υπόστρωμα της φιάλης καλλιέργειας και δημιουργούν αποικίες σε μονόστιβη στρώση. Όσον αφορά τα μοριακά τους χαρακτηριστικά, εμφανίζουν τριπλοειδία (περίπου 62 χρωμοσώματα), εκφράζουν τις κυτοκερατίνες 5, 8 και 18, ενώ δεν εκφράζουν το μόριο p53. Η κυτταρική σειρά PC-3 θεωρείται ορμονο-ανεξάρτητη καθώς δεν παρουσιάζει έκφραση του υποδοχέα των ανδρογόνων. Επίσης παρατηρείται απουσία έκφρασης των μορίων PSA και KLK2 [201, 202].

Η κυτταρική σειρά DU145 (ATCC Number: HTB-81) αποτελεί την πρώτη καρκινική σειρά προστάτη που απομονώθηκε και αναπτύχθηκε σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας. Πρόκειται για κύτταρα επιθηλιακής μορφολογίας που προήλθαν από σημείο μετάστασης καρκινικού όγκου προστάτη στον εγκέφαλο Καυκάσιου άνδρα ηλικίας 69 ετών. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι περίπου 23 ώρες και αναπτύσσονται, αφού έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια ανάπτυξης, σε μονόστιβη καλλιέργεια δημιουργώντας αποικίες. Είναι μια υποτριπλοειδής κυτταρική σειρά που φέρει 61 χρωμοσώματα. Όπως και τα κύτταρα PC-3, τα κύτταρα DU145 δεν παρουσιάζουν έκφραση του υποδοχέα των ανδρογόνων, του PSA και της KLK2. Επίσης, εκφράζουν τις κυτοκερατίνες 7, 8 και 18, ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των κυτοκερατινών 14, 19 και 20. Επίσης, φέρουν μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 [201, 202].

Πίνακας 2.2. Γενικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών προστάτη DU145, PC-3 και LNCaP [201].

Κύρια Χαρακτηριστικά	Καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη		
	DU145	PC-3	LNCaP
Θέση απομόνωσης	Μετάσταση στον εγκέφαλο	Μετάσταση στα οστά	Μετάσταση στους λεμφαδένες
Εξάρτηση από τα ανδρογόνα	Όχι	Όχι	Ναι
Έκφραση PSA	Όχι	Όχι	Ναι
Έκφραση KLK2	Όχι	Όχι	Ναι
Έκφραση υποδοχέα των ανδρογόνων	Όχι	Όχι	Ναι
Έκφραση του ογκοκατασταλτικού μορίου p53	Παρουσία μεταλλαγμένης ισομορφής	Απουσία έκφρασης	Φυσιολογική ισομορφή

2.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη LNCaP, PC-3, και DU145

Οι κυτταρικές σειρές LNCaP, PC-3, και DU145 καλλιεργήθηκαν σε φιάλες 75 cm², τοποθετημένες σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας με περιεκτικότητα 95% σε αέρα και 5% σε CO₂. Τα κύτταρα PC3 και LNCaP καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute - 1640), εμπλουτισμένο με 2 mM L-γλουταμίνη, 2,0 g/L διττανθρακικό νάτριο, 25 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum, βόειος εμβρυϊκός ορός), 100 U/mL πενικιλίνη και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη, ενώ τα κύτταρα DU145 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), εμπλουτισμένο με 1,5 g/L διττανθρακικό νάτριο, 10% (v/v) FBS, 100 U/mL πενικιλίνη και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη (PAA Laboratories GmbH).

Το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας που ακολουθήθηκε ήταν κοινό για τις κυτταρικές σειρές LNCaP, PC-3, και DU145 και αρχικά περιελάμβανε αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τη φιάλη της καλλιέργειας και πλύσεις με στείρο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (Phosphate Buffered Saline) (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) (Sigma Aldrich, Co.) με σκοπό την απομάκρυνση του ορού FBS, ο οποίος αναστέλλει

τη δράση της θρυψίνης. Ακολουθεί απόρριψη του διαλύματος PBS, προσθήκη 2,0 mL διαλύματος αποκόλλησης κυττάρων (0,5 mg/mL θρυψίνη, 0,22 mg/mL EDTA, διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων-PBS, pH = 7,4, ελεύθερο από Ca^{2+} και Mg^{2+} ,) (PAA Laboratories GmbH) και επώαση στους 37°C για 10 min, με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης. Στη συνέχεια προστίθενται 8,0 mL θρεπτικού μέσου, ακολουθεί ήπια ανάδευση και μεταφορά του συνολικού όγκου (10 mL) του εναιωρήματος των κυττάρων σε στείρους σωλήνες κατάλληλους για φυγοκέντρηση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό $1.000 \times g$ για 5 min, απόρριψη του υπερκειμένου διαλύματος και διαλυτοποίηση του εναπομείναντος ιζήματος σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου, ούτως ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία ανακαλλιέργειας (συνήθως 1:3 – 1:8). Τέλος, μέρος από το προκύπτον κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύεται μέχρι τελικού όγκου 20 mL, αναδεύεται σχολαστικά και επωάζεται σε νέες φιάλες υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες καλλιέργειας έως ότου επιτευχθεί προσκόλληση των κυττάρων (12 – 48 h, αναλόγως με τις ιδιότητες της εκάστοτε κυτταρικής σειράς).

2.2.3 Συνθήκες διατήρησης των κυτταρικών σειρών σε υγρό άζωτο και συνθήκες απόψυξης

Η δημιουργία τραπεζών ανανεώσιμων κυτταρικών σειρών μπορεί να επιτευχθεί αποθηκεύοντας τα κύτταρα σε υγρό άζωτο (θερμοκρασία = -196°C). Ωστόσο θα πρέπει να αποφευχθεί ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων, οι οποίοι καταστρέφουν τις κυτταρικές δομές. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται κοινές κρυοπροστατευτικές ουσίες όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η γλυκερόλη.

Αρχικά, ακολουθείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας, που προαναφέρθηκε έως και την φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων, τα οποία θα πρέπει να βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Στη συνέχεια, το ίζημα διαλύεται εκ νέου σε 1 mL διαλύματος ψύξης κυττάρων το οποίο αποτελείται από 90% v/v FBS και 10% v/v στείρου DMSO (PAA Laboratories GmbH) σε τελική συγκέντρωση $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ κύτταρα/mL και το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικά, ανθεκτικά κρυοφιαλίδια. Ακολουθώντας, τα κρυοφιαλίδια καταψύχονται σε θερμοκρασία -80°C για 24 h, κι έπειτα αποθηκεύονται στο υγρό άζωτο.

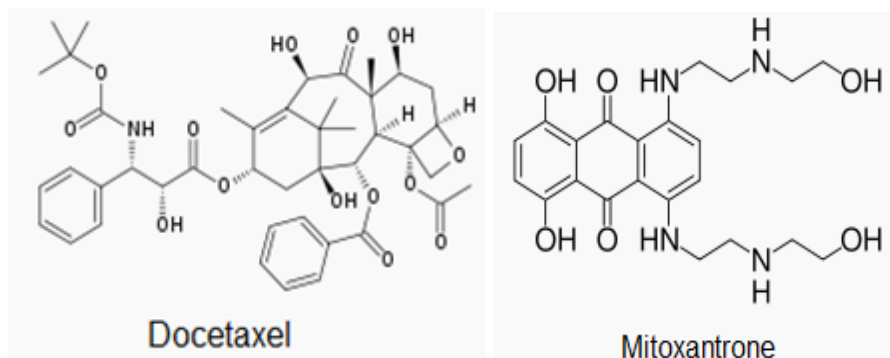
Η διαδικασία επαναφοράς των κυττάρων από το υγρό άζωτο θα πρέπει να ολοκληρωθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε να διασφαλιστεί ότι οι κυτταρικές πρωτεΐνες δε θα μετουσιωθούν. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται απόψυξη του κρυοφιαλιδίου

χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση με σκοπό την απομάκρυνση του DMSO. Το προκύπτον ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε 20 mL θρεπτικού μέσου και μεταφέρεται σε φιάλες, οι οποίες φυλάσσονται στις συνθήκες καλλιέργειας που προαναφέρθηκαν. Ακολουθούν 3 έως 5 ανακαλλιέργειες έως ότου επανέλθει ο αναμενόμενος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

2.3 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας και της πολλαπλασιαστικής ικανότητας της καρκινικής κυτταρικής σειράς DU145 προστάτη υπό την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων

Η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145 επιλέχθηκε για τη μελέτη της επίδρασης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων docetaxel και mitoxantrone καθώς εκπληρώνει δύο απαραίτητα κριτήρια. Το πρώτο κριτήριο είναι η απουσία έκφρασης λειτουργικού υποδοχέα των ανδρογόνων με αποτέλεσμα να θεωρείται ένα ικανοποιητικό μοντέλο μελέτης της ορμονοανεξάρτητης, επιθετικής μορφής της νόσου, για την αντιμετώπιση της οποίας η χορήγηση χημειοθεραπείας αποτελεί τη μόνη θεραπευτική επιλογή. Το δεύτερο αναγκαίο κριτήριο που εκπληρώνεται είναι ότι στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά εκφράζονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα και τα δύο υπό μελέτη γονίδια, *KLK13* και *KLK15*.

Τα κυτταροστατικά φάρμακα docetaxel και mitoxantrone (Εικόνα 2.1) που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν τις σημαντικότερες χημειοθεραπευτικές ουσίες που χορηγούνται για την αντιμετώπιση του επιθετικού καρκίνου του προστάτη, ο οποίος δεν ανταποκρίνεται στην ορμονοθεραπεία. Το docetaxel ανήκει στην κατηγορία των ταξανών και αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση καθώς προσδένεται στους μικροσωληνίσκους με υψηλή συγγένεια και σταθεροποιεί τη μιτωτική άτρακτο. Το mitoxantrone ανήκει στην οικογένεια των ανθρακινονών και επιτυγχάνει την αντικαρκινική του δράση κυρίως μέσω της αναστολής της τοποϊσομεράσης τύπου II, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA. Παρά το γεγονός ότι τα προαναφερθέντα χημειοθεραπευτικά φάρμακα δρουν μέσω ανόμοιων μοριακών μηχανισμών το τελικό αποτέλεσμα, σε κάθε περίπτωση, είναι η επαγωγή της απόπτωσης [14, 45, 47, 48].



Εικόνα 2.1. Οι χημικές δομές των αντικαρκινικών φαρμάκων docetaxel και mitoxantrone.

Η κατασκευή του κυτταροστατικού προφίλ των προαναφερθέντων χημειοθεραπευτικών παραγόντων μπορεί να επιτευχθεί μέσω διερεύνησης της ικανότητας αύξησης και της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των παραγόντων και διαφορετικών χρόνων επώασης.

2.3.1 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT.

Ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων DU145 υπό την επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων έγινε μέσω του ελέγχου της μιτοχονδριακής τους δραστηριότητας εφαρμόζοντας τη χρωματομετρική μέθοδο MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide].

Η βασική αρχή της μεθόδου MTT βασίζεται στο ότι η ηλεκτρική αφυδρογονάση των κυττάρων που παρουσιάζουν μεταβολική δραστηριότητα και χαρακτηρίζονται βιώσιμα διαθέτει την ικανότητα να ανάγει το αντιδραστήριο MTT που έχει κίτρινο χρώμα και μέγιστο απορρόφησης τα 400 nm στην ιώδη ουσία φορμαζάνη με μέγιστο απορρόφησης τα 550 nm [203]. Επομένως, ο φωτομετρικός προσδιορισμός της φορμαζάνης μπορεί να αναχθεί σε προσδιορισμό του ποσοστού των ζώντων κυττάρων που απομένουν μετά την επίδραση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα σε σχέση με τον κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου στον οποίο δεν προστίθεται ο παράγοντας αυτός. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = 100 \times (\text{Απορρόφηση}_{550\text{nm}} \text{ κυττάρων υπό την επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα} / \text{Απορρόφηση}_{550\text{nm}} \text{ κυττάρων χωρίς την επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα}).$$

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας ξεκινά με την εμφύτευση των κυττάρων DU145 σε μικροπλακίδια πολλαπλών θέσεων. Χρησιμοποιείται ένα μικροπλακίδιο για κάθε χρονικό διάστημα επώασης που μελετάται (24 h, 48 h και 92 h). Τα κύτταρα εμφυτεύονται σε συγκέντρωση 4×10^4 κύτταρα/mL (τελικός όγκος 100 μ L) και αφήνονται να προσκολληθούν στην επιφάνεια των μικροπλακιδίων, επωαζόμενα 18 h σε σταθερές συνθήκες (37°C και 5% CO₂). Ακολουθεί η προσθήκη των χημειοθεραπευτικών παραγόντων (χρονικό σημείο = 0 h) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (0,1 – 10 nM για το docetaxel και 5 – 400 nM για το mitoxantrone) σε διαφορετικές θέσεις των μικροπλακιδίων, ενώ σε μια σειρά θέσεων δεν προστίθεται ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας (κύτταρα ελέγχου). Μετά το πέρας του κάθε χρονικού διαστήματος προστίθενται 10 μ L διαλύματος MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (PAA Laboratories GmbH) διαλυμένο σε στείρο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl], συγκέντρωσης 5 mg/ml, και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 4 h. Στη συνέχεια απορρίπτεται το διάλυμα από την κάθε θέση του μικροπλακιδίου, προστίθεται διάλυμα λύσης [12,5% w/v SDS, 45% v/v Dimethylformamide (DMF) σε dH₂O, pH = 4,70] και ακολουθεί επώαση για 12 h. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακιδίων (τύπου ELISA plate reader) χρησιμοποιώντας τα 550 nm ως μήκος κύματος προσδιορισμού. Το πείραμα επαναλαμβάνεται εις τριπλούν. Χρησιμοποιώντας τον τύπο της % βιωσιμότητας προσδιορίζεται για κάθε χημειοθεραπευτικό παράγοντα η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο IC₅₀ (half maximal Inhibitory Concentration), δηλαδή η συγκέντρωση που είναι τοξική για το 50% του κυτταρικού πληθυσμού.

2.3.2 Προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και διερεύνηση τυχόν φαινομένων νέκρωσης. Συλλογή των κυττάρων για την ομογενοποίησή τους

Αφού προσδιοριστεί η συγκέντρωση IC₅₀ για κάθε χημειοθεραπευτική ουσία, τα κύτταρα DU145 καλλιεργούνται σε φιάλες 75 cm² (συγκέντρωση εμφύτευσης = 4×10^4 κύτταρα/mL, σε 20 mL θρεπτικού υλικού). Μετά την προσκόλλησή των κυττάρων προστίθεται η προσδιορισθείσα συγκέντρωση του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα για 24 h, 48 h και 72 h ενώ παράλληλα επωάζονται αντίστοιχες φιάλες οι οποίες περιέχουν τον κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου (control) στον οποίο δεν έχει γίνει προσθήκη χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Μετά από κάθε χρονικό διάστημα μετρίεται ο αριθμός των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και εκτιμάται η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων

με την κατασκευή καμπυλών του κυτταρικού πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο παρουσία και παρουσία του χημειοθεραπευτικού παράγοντα.

Κατά τη διαδικασία της μέτρησης των κυττάρων ακολουθείται, επιπρόσθετα, χρώση με μπλε του τρυπανίου (Trypan Blue) για τη διερεύνηση της ύπαρξης νεκρωτικών φαινομένων. Κατά τη διαδικασία της νέκρωσης οι κυτταρικές μεμβράνες διαρρηγνύονται, με αποτέλεσμα η χρωστική μπλε του τρυπανίου να εισχωρεί στο κυτταρόπλασμα, να προσδένεται σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και να αποδίδεται στο κύτταρο μια χαρακτηριστική μπλε χροιά [204]. Για τη διαδικασία της χρώσης με μπλε του τρυπανίου, το εναιώρημα των κυττάρων αραιώνεται 10 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH = 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), 18 μL του αραιωμένου εναιωρήματος αναμειγνύονται με 2,0 μL διαλύματος χρώσης μπλε του τρυπανίου (0,40% w/v χρωστική μπλε του τρυπανίου, 0,85% w/v NaCl, 0,06% w/v K_2PO_4) (Sigma Chemical Co.) και το μίγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου πριν εκτιμηθεί με τη χρήση φωτονικού μικροσκοπίου. Το % ποσοστό της νέκρωσης προσδιορίζεται διαιρώντας τον αριθμό των χρωματισμένων κυττάρων με το συνολικό αριθμό των κυττάρων και πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα $\times 100$.

Παράλληλα με τις προαναφερθείσες διαδικασίες, το αρχικό εναιώρημα των κυττάρων, από το οποίο έχει ήδη ληφθεί δείγμα για τον προσδιορισμό της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και για τη διερεύνηση τυχόν νεκρωτικών φαινομένων, φυγοκεντρείται σε $1.000 \times g$ για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που απομένει ομογενοποιείται και απομονώνεται από αυτό ολικό RNA με τις διαδικασίες που αναφέρονται παρακάτω.

2.4 Ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστού προστάτη και των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη. Απομόνωση ολικού RNA

2.4.1 Ομογενοποίηση

Αρχικά, τα δείγματα ιστού του προστάτη ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό και 50 – 100 mg ιστού τοποθετούνται στον κονιορτοποιητή BioPulverizer (BioSpec Products Inc.) όπου και συνθλίβονται μέχρι να μετατραπούν σε σκόνη, ενώ έχουν παγώσει σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, η σκόνη μεταφέρεται σε φιαλίδια τύπου Eppendorf 2,0 mL και προστίθεται 1,0 mL αντιδραστηρίου TRI® (Molecular Research Center, Inc.) το οποίο περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη (30% v/v) και φαινόλη (50% v/v). Ακολουθεί σχολαστική ανάδευση μέχρις ότου διαλυθούν τα εναπομείναντα μέρη του ιστού. Στην περίπτωση της ομογενοποίησης δειγμάτων

από κυτταρικές σειρές προστίθεται το αντιδραστήριο TRI® απευθείας στο ίζημα των κυττάρων που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση και ακολουθεί σχολαστική ανάδευση.

2.4.2 Απομόνωση ολικού RNA

Μετά την ανάδευση, το ομογενοποίημα επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Στο σημείο αυτό το υλικό μπορεί να αποθηκευτεί προσωρινά στους -80°C μέχρι την περεταίρω ανάλυσή του.

Μετά την επώαση του ομογενοποιημάτος, ή αφού το ομογενοποίημα ξεπαγώσει από τους -80°C, προστίθενται σε αυτό 200 μ L χλωροφορμίου. Ακολουθεί ανάδευση για 15 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Το μίγμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου που δημιουργείται βοηθά στη λύση των κυττάρων, στην αποδιάταξη των στεροδομών των πρωτεϊνών ενώ παράλληλα αναστέλλεται η αποικοδόμηση του, ελεύθερου πλέον, RNA από τις RNAσες, το οποίο απομονώνεται μέσω της μεθόδου Chomczynski [205, 206]. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στους 4°C για 15 min σε 12.000 $\times$ g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης μεταφέρεται η υδατική φάση σε νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf 2,0 mL όπου και προστίθενται 500 μ L ισοπροπανόλης και πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C, για 8 min σε 12.000 $\times$ g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθενται στο εναπομείναν ίζημα 1 mL αιθανόλης 75% v/v και ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στους 4°C, για 5 min σε 12.000 $\times$ g.

Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το εναπομείναν ίζημα διαλυτοποιείται σε 10 – 30 μ L διαλύματος «RNA Storage Solution» (Ambion Inc.) (1,0 mM κιτρικό νάτριο, pH = 6,4). Το χαμηλό pH και η δέσμευση των δισθενών κατιόντων από το κιτρικό νάτριο ελαχιστοποιούν την υδρόλυση του RNA. Το ολικό RNA που απομονώνεται με την παραπάνω διαδικασία φυλάσσεται στους -80°C.

2.4.3 Προσδιορισμός της ποσότητας, της καθαρότητας και της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA: Φασματοφωτομετρία υπεριώδους και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 254 nm που αποδίδεται στους αρωματικούς δακτυλίους της πυριμιδίνης και του ιμιδαζολίου, ενώ οι

πρωτεΐνες απορροφούν σε μήκος κύματος 280 nm λόγω της παρουσίας του δακτυλίου των αρωματικών αμινοξέων.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA λαμβάνονται τιμές απορρόφησης και στα δύο προαναφερθέντα μήκη κύματος. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm αποτελεί κριτήριο καθαρότητας του απομονωμένου RNA. Οι τιμές του προαναφερθέντος λόγου θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1,6 – 1,9, καθώς μικρότερες τιμές υποδεικνύουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών ενώ μεγαλύτερες είναι ενδεικτικές παρουσίας DNA στο εκχύλισμα του RNA. Η συγκέντρωση του RNA σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας την τιμή της απορρόφησης στα 260 nm με τον παράγοντα της αραίωσης και με την τιμή 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, η οποία είναι η συγκέντρωση του RNA που αντιστοιχεί σε μια μονάδα απορρόφησης.

Ο προσδιορισμός της ποιότητας του απομονωμένου RNA πραγματοποιείται με την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 % (w/v). Το πήκτωμα παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας διάλυμα TBE 1× (89 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 89 mM βορικό οξύ και 2,0 mM EDTA) και προσθέτοντας βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για την προετοιμασία των δειγμάτων RNA προς ηλεκτροφόρηση αναμιγνύεται όγκος διαλύματος RNA που περιέχει 1 μg RNA με DEPC- H_2O (Diethyl pyrocarbonate-treated H_2O) (Ambion Inc.) και διάλυμα φόρτωσης 2× (Fermentas International Ltd.), το οποίο περιέχει 95% (v/v) φορμαμίδιο, 0,025% (w/v) SDS, 0,025% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% (w/v) κυανό του ξυλενίου, 0,025% (v/v) βρωμιούχο αιθίδιο, και 0,50 mM EDTA), σε τελικό όγκο φόρτωσης 6 μL . Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης που εφαρμόζονται στο πήκτωμα το οποίο έχει τοποθετηθεί σε διάλυμα TBE 0,5× είναι εφαρμογή σταθερής τάσης 50 V για 50 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας όπου λαμβάνονται φωτογραφίες μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής. Το απομονωμένο RNA το οποίο είναι ακέραιο παρουσιάζει δύο ευδιάκριτες ζώνες που αντιστοιχούν στο 28S και 18S ριβοσωμικό RNA (rRNA), οι οποίες ιδανικά θα πρέπει να παρουσιάζονται με αναλογία έντασης σήματος 2:1. Η μη επιτυχής απομόνωση του RNA μπορεί να διαπιστωθεί μέσω παρουσίας προϊόντων αποικοδόμησης κατά μήκος της διαδρομής ηλεκτροφόρησης.

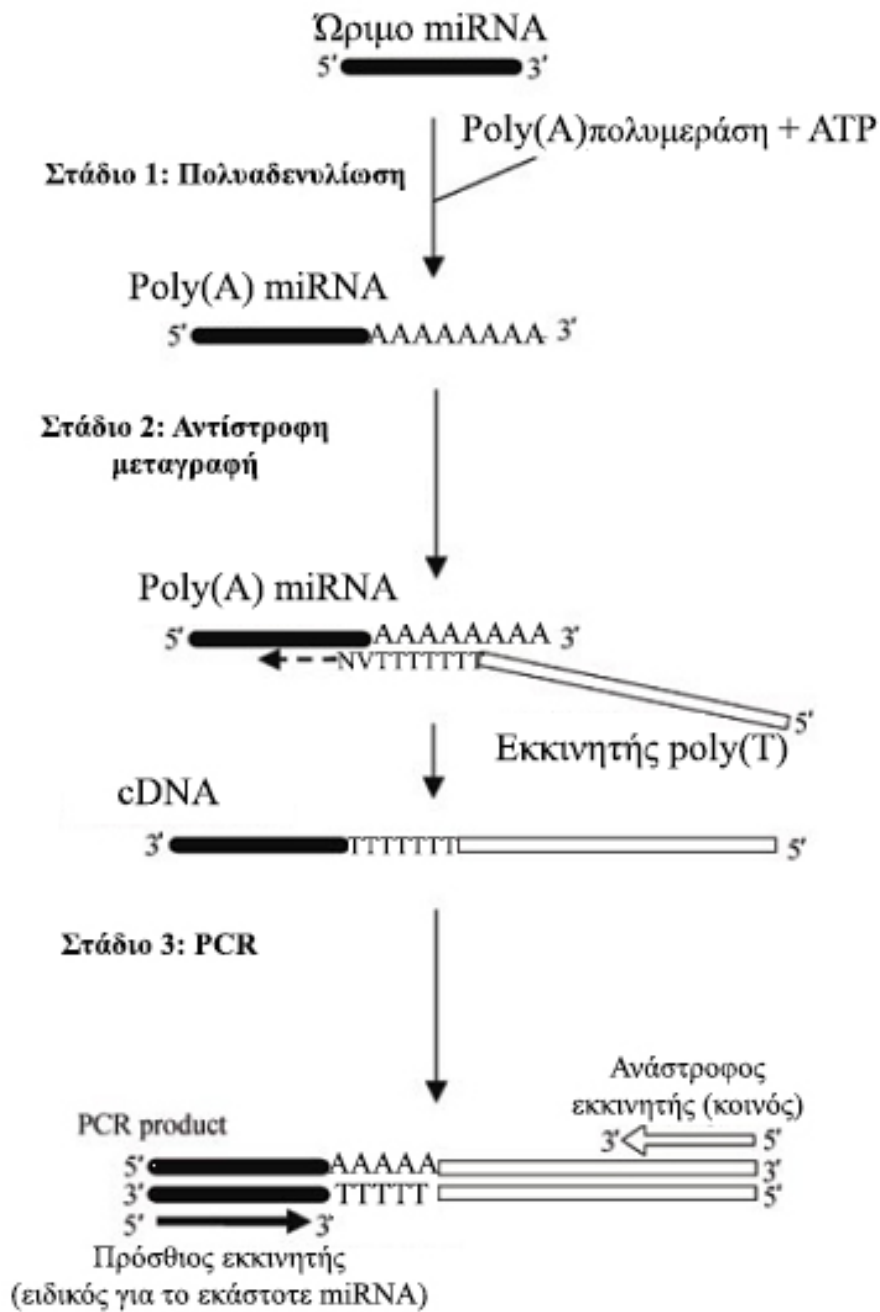
2.5 Πολυαδενυλίωση του ολικού RNA για την ανάλυση των μορίων miRNAs

Η αντίδραση πολυαδενυλίωσης χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη περίπτωση για να προστεθούν κατάλοιπα αδενοσίνης στο 3' άκρο των ωρίμων μορίων miRNA, τα οποία φυσιολογικά στερούνται poly(A) ουράς, ούτως ώστε να είναι ικανή η πρόσδεση του τροποποιημένου poly(T) εκκινητή που χρησιμοποιείται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθεί (Εικόνα 2.2). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνονται τέσσερεις βασικοί στόχοι:

- i) Η αύξηση του μεγέθους των συμπληρωματικών μορίων DNA (cDNA) που παράγονται, ούτως ώστε να είναι εφικτή η ενίσχυσή τους μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR).
- ii) Η ταυτόχρονη αντίστροφη μεταγραφή του συνόλου των μικρομοριακών RNAs χωρίς να απαιτείται ειδική αντίδραση για κάθε μόριο ξεχωριστά.
- iii) Η αποφυγή προσδιορισμού μορίων pre-miRNA καθώς η δομή θηλιάς-μίσχου που διαθέτουν αναστέλλει την ενεργότητα της poly(A) πολυμεράσης που χρησιμοποιείται στην αντίδραση της πολυαδενυλίωσης.
- iv) Η μείωση του κόστους προσδιορισμού, καθώς αποφεύγονται οι επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής και η χρήση ειδικών εκκινητών σε αυτές όπως και η χρήση ειδικών ανιχνευτών στην αντίδραση PCR.

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται στην αντίδραση πολυαδενυλίωσης απομονώνεται από το βακτήριο *Escherichia coli* και ονομάζεται poly(A) πολυμεράση (PAP). Το ένζυμο αυτό καταλύει την προσθήκη μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), στο 3' άκρο του RNA, χωρίς να απαιτεί την παρουσία κάποιου μορίου εκκινητή.

Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει 1 μg ολικού RNA, 0,80 mM rATP, 1,0 U poly(A) πολυμεράσης (New England Biolabs, Inc.), ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (50 mM Tris-HCl, pH = 7,9, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο 10 μL. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 °C για 1 h και τερματίζεται μέσω θέρμανσης στους 65 °C για 10 min.



Εικόνα 2.2. Γραφική απεικόνιση της πορείας του ωρίμου miRNA από το στάδιο της πολυαδενυλίωσης έως και την PCR [207].

2.6 Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription-RT) του mRNA και των πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs με σκοπό τη σύνθεση συμπληρωματικών μορίων DNA (cDNA)

2.6.1 Αρχή της μεθόδου RT

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σε επίπεδο mRNA και miRNA μέσω της τεχνικής PCR απαιτεί την παραγωγή μορίων cDNA τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως αρχικό υπόστρωμα για την αντίδραση PCR.

Η παραγωγή cDNA από το RNA επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός ενζύμου που απομονώνεται, συνήθως, από ρετροϊούς και ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase). Πρόκειται για μια DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιεί το RNA ως υπόστρωμα για να δημιουργήσει συμπληρωματικά μόρια DNA. Απαραίτητο στοιχείο για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι η ύπαρξη ενός συμπληρωματικού μορίου εκκινητή το οποίο καθορίζει και την ειδικότητα της αντίδρασης. Ως εκκινητές στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυχαία εξαμερή μόρια τα οποία υβριδοποιούνται τυχαία στο RNA κι έτσι μεταγράφεται όλος ο πληθυσμός των μορίων RNA, ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) τα οποία υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των mRNAs με αποτέλεσμα την επιλεκτική μεταγραφή των mRNAs, ή ειδικοί εκκινητές οι οποίοι σχεδιάζονται για να υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένα RNA μόρια τα οποία και μεταγράφονται επιλεκτικά [208].

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής. Ο πρώτος είχε ως σκοπό την αντίστροφη μεταγραφή του συνόλου των μορίων mRNA και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης ως εκκινητές και ο δεύτερος τύπος αποσκοπούσε στη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων μικρομοριακών RNA μέσω της χρήσης ενός τροποποιημένου poly(T) εκκινητή.

2.6.2 Αντίστροφη μεταγραφή του mRNA

Η αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής του mRNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο αναμιγνύεται όγκος ολικού RNA που αντιστοιχεί σε 2 μg με 0,5 μg μορίων oligo-dT αποτελούμενα από 18 θυμιδίνες, και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο αντίδρασης 15,0 μL. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 5 min και γρήγορη μεταφορά των μιγμάτων στους 4°C, μετά το τέλος της επώασης. Στο πρώτο αυτό στάδιο επιτυγχάνεται η αποδιάταξη των δευτεροταγών

δομών του RNA και η πρόσδεση των μορίων εκκινητών oligo-dT. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή καθαυτή καθώς προστίθενται στο μίγμα 200 U αντίστροφης μεταγραφάσης M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase), 40 U αναστολέα RNασών RNase Inhibitor (Finnzymes, Inc), το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης [(50 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol-DTT (τελικές συγκεντρώσεις)] καθώς και 0,5 mM (τελική συγκέντρωση) από κάθε dNTP. Συμπληρώνεται κατάλληλος όγκος DEPC-H₂O έως τα 20 μL του τελικού όγκου της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h και η αντίδραση τερματίζεται με επώαση στους 70°C για 10 min.

2.6.3 Αντίστροφη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων μορίων miRNAs

Οι συνθήκες και τα συστατικά της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή των πολυαδενυλιωμένων miRNAs, και των μικρομοριακών RNA μορίων εν γένει, διαφέρουν από αυτές που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο (2.6.2) μόνο στα παρακάτω σημεία:

i) Στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0,25 μM ένα τροποποιημένος poly(T) εκκινητής οποίος διαθέτει την παρακάτω νουκλεοτιδική αλληλουχία: 5'GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTVN-3'. Τα 12 κατάλοιπα θυμιδίνης υβριδοποιούνται με τις αντίστοιχες αδενοσίνες που έχουν προστεθεί κατά την πολυαδενυλίωση, τα δύο τελευταία νουκλεοτίδια είναι εκφυλισμένα (V = G, A, C και N = G, A, T, C). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υβριδοποιούνται με τα τελευταία νουκλεοτίδια του μικρομοριακού RNA, καθώς το νουκλεοτίδιο V δε μπορεί να προσδεθεί σε αδενοσίνη και το νουκλεοτίδιο N μπορεί να προσδεθεί σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η τυχαία πρόσδεση του εκκινητή στην poly(A) περιοχή.

ii) Χρησιμοποιείται 1,0 μg πολυαδενυλιωμένου RNA ως αρχικό υπόστρωμα.

2.7 Συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

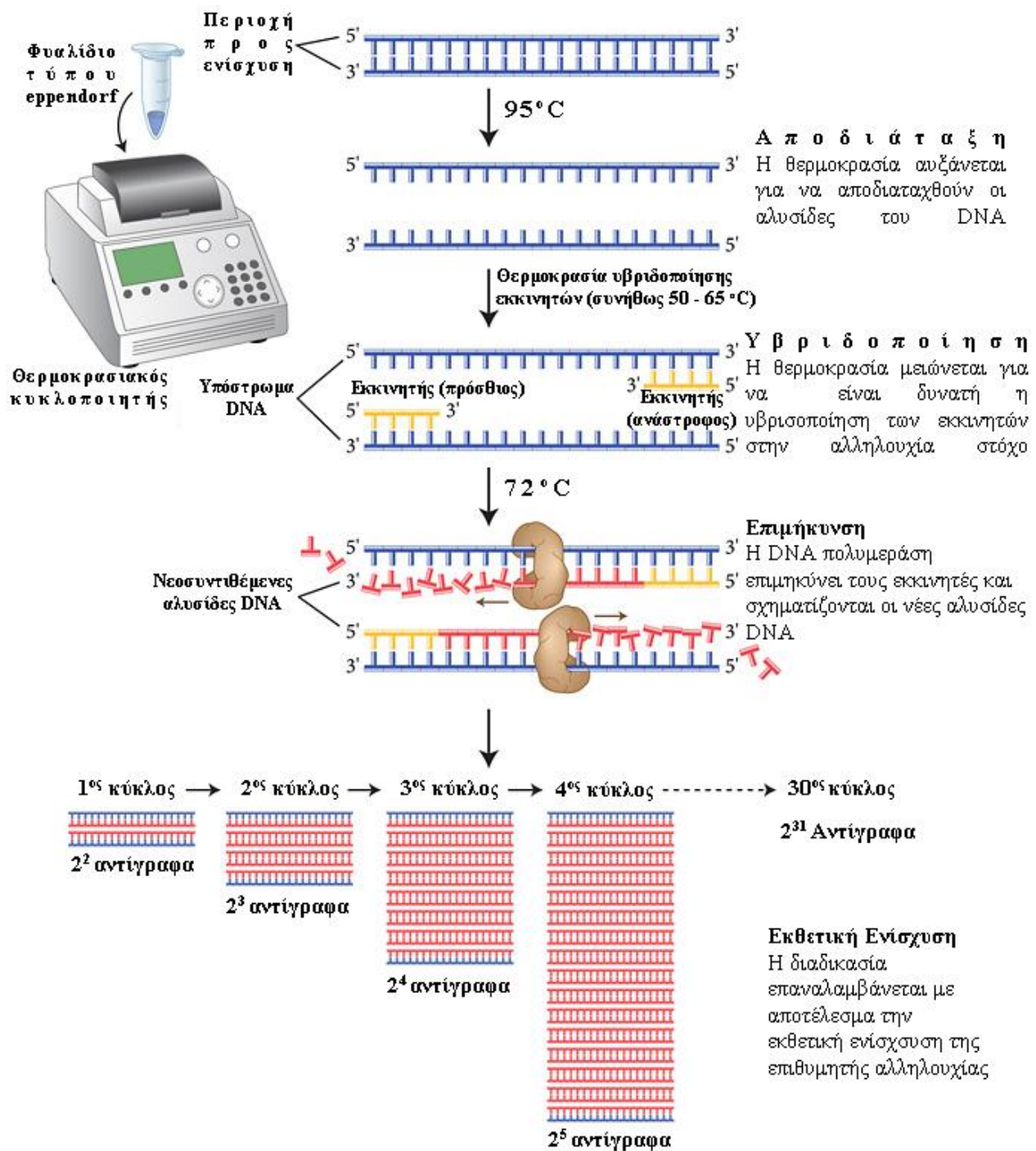
2.7.1 Αρχή της μεθόδου PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) θα μπορούσε να οριστεί ως μια *in vitro* διαδικασία επιλεκτικής ενίσχυσης αλληλουχιών DNA (Εικόνα 2.3) [209].

Η PCR αποτελεί, μεταξύ άλλων, βασικό εργαλείο για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης καθώς το cDNA, το οποίο αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό των μορίων RNA ενός δείγματος μετά από μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα της αντίδρασης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της PCR είναι η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα του προσδιορισμού των επιθυμητών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών [208, 209].

Τα απαραίτητα συστατικά για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας είναι η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, δύο ολιγονουκλεοτίδια που κατέχουν το ρόλο των εκκινητών της αντίδρασης και οριοθετούν την επιθυμητή αλληλουχία προς ενίσχυση, το μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει κατιόντα Mg^{2+} . Η PCR πραγματοποιείται σε «κύκλους» τριών επαναλαμβανόμενων σταδίων που περιλαμβάνουν την αποδιάταξη των μορίων DNA, την υβριδοποίηση των εκκινητών σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας DNA και την επιμήκυνση των εκκινητών μέσω πολυμερισμού. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε φιαλίδια τύπου Eppendorf που τοποθετούνται σε ένα θερμοκρασιακό κυκλοποιητή (thermal cycler) που στην ουσία χρησιμοποιείται για να επιτυγχάνεται η αυξομείωση και η ρύθμιση των συγκεκριμένων θερμοκρασιών του κάθε κύκλου της αντίδρασης (Εικόνα 2.3) [208, 209].

Από την ανακάλυψη της τεχνικής της PCR το 1983 από τον Kary Mullis (Nobel Χημείας 1993) μέχρι σήμερα έχει προταθεί μια πληθώρα παραλλαγών της αρχικής τεχνικής, συμπεριλαμβανομένης και της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο [208-210]. Η PCR κατέχει σήμερα κεντρικό ρόλο στο πεδίο της Κλινικής Βιοχημείας καθώς χρησιμοποιείται σε αρκετές εξετάσεις ρουτίνας όπως στον προσδιορισμό μοριακών δεικτών συγκεκριμένων ασθενειών, στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, στην ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε κληρονομικές ασθένειες, στον υπολογισμό του ιικού φορτίου και στην ιατροδικαστική για την ταυτοποίηση του γενετικού υλικού.



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της PCR [211].

2.7.2 Σχεδιασμός και σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές στη συμβατική PCR

Η παραγωγή των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές στις αντιδράσεις PCR αποτελεί κομβικό σημείο κατά το σχεδιασμό της τεχνικής. Οι βασικοί κανόνες που ακολουθούνται κατά το σχεδιασμό ενός ζεύγους εκκινητών είναι οι παρακάτω [209, 210]:

- i) Το μέγεθος τους θα πρέπει να κυμαίνεται από 18 – 25 νουκλεοτίδια, θα πρέπει να έχουν παρόμοια θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) και παρόμοια ποσοστά G+C βάσεων (περίπου 45-55%)
- ii) Θα πρέπει να αποφεύγονται διαδοχικές επαναλήψεις των ίδιων νουκλεοτιδίων, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για επαναλήψεις GC κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή.
- iii) Τα 3' άκρα των εκκινητών δε θα πρέπει να είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους ούτως ώστε να ελαχιστοποιείται η δημιουργία διμερών εκκινητών.
- iv) Θα πρέπει να ελέγχεται η ειδικότητα της υβριδοποίησης τους (ιδιαίτερα στο 3' άκρο) στη επιθυμητή αλληλουχία μέσω κατάλληλων αλγορίθμων (π.χ. nucleotide BLAST).
- v) Θα πρέπει να αποφεύγεται η ενίσχυση μορίων γενωμικού DNA που πιθανώς να έχουν απομονωθεί μαζί με το ολικό RNA. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω σχεδιασμού των εκκινητών σε περιοχές συρραφής εξονίων ή/και σε εξώνια που διαχωρίζονται μεταξύ τους από εσώνια μεγάλου μεγέθους (> 1000 νουκλεοτίδια).

Για το σχεδιασμό των εκκινητών στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των αλγορίθμων Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International) και Primer Blast (NCBI).

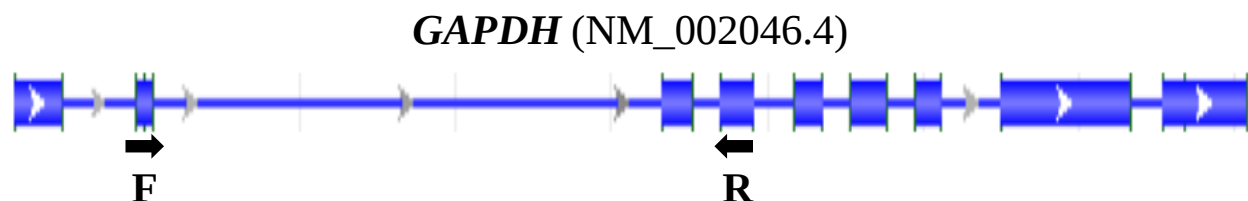
2.7.3 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR για τα γονίδια αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*

Η έκφραση των γονιδίων της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (*GAPDH*) και της φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης της υποξανθίνης-γουανίνης (*HPRT1*) χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων υπό μελέτη καθώς παρουσιάζουν σταθερή έκφραση στον καρκίνο του προστάτη χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις. Επομένως, όπως έχει προταθεί και από τη διεθνή βιβλιογραφία [212, 213], μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η κανονικοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως για να επιτευχθεί η

διόρθωση των διακυμάνσεων, που ενδεχομένως λαμβάνουν χώρα, στην απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής μεταξύ των δειγμάτων.

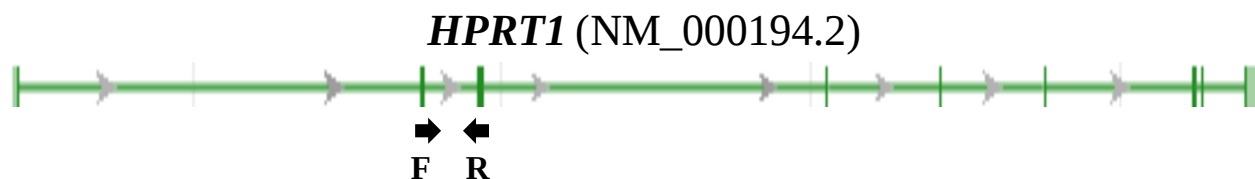
Το μίγμα των αντιδράσεων για την ενίσχυση τμημάτων των cDNAs των γονιδίων *GAPDH* και *HPRT1* αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (67 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20) (HyTest. Ltd), 0,20 mM από κάθε dNTP, 1,50 mM MgCl₂, 1 μM από κάθε εκκινητή, 1,25 U *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase-recombinant (HyTest, Ltd), 100 ng cDNA και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο 50 μL. Το στάδιο της αρχικής αποδιάταξης πραγματοποιείται στους 95°C για 2 min για να ακολουθήσουν στην συνέχεια 36 θερμοκρασιακοί κύκλοι, οι οποίοι ξεκινούν με το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης στους 60 °C για 30 sec και ολοκληρώνονται με το στάδιο της επέκτασης στους 72 °C για 1 min. Το στάδιο της τελικής επέκτασης πραγματοποιείται στους 72 °C για 5 min. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνεται και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου στο οποίο αντί για υπόστρωμα έχει προστεθεί ο αντίστοιχος όγκος από DEPC-H₂O.

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *GAPDH* (Πίνακας 2.3) σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number = NM_002046.4). Ο πρόσθιος εκκινητής (F) υβριδοποιείται στο δεύτερο εξώνιο κι ανάστροφος (R) υβριδοποιείται στο τέταρτο εξώνιο (Εικόνα 2.4), οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 223 bp.



Εικόνα 2.4. Οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών συμβατικής PCR για τη επιλεκτική ενίσχυση τμήματος των cDNA μορίων του γονιδίου *GAPDH*.

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *HPRT1* (Πίνακας 2.3) σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number = NM_000194.2). Ο πρόσθιος εκκινητής (F) υβριδοποιείται στο δεύτερο εξώνιο και ο ανάστροφος (R) υβριδοποιείται στο τρίτο εξώνιο (Εικόνα 2.5), οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 151 bp.



Εικόνα 2.5. Οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών συμβατικής PCR για τη επιλεκτική ενίσχυση τμήματος των cDNA μορίων του γονιδίου *HPRT1*.

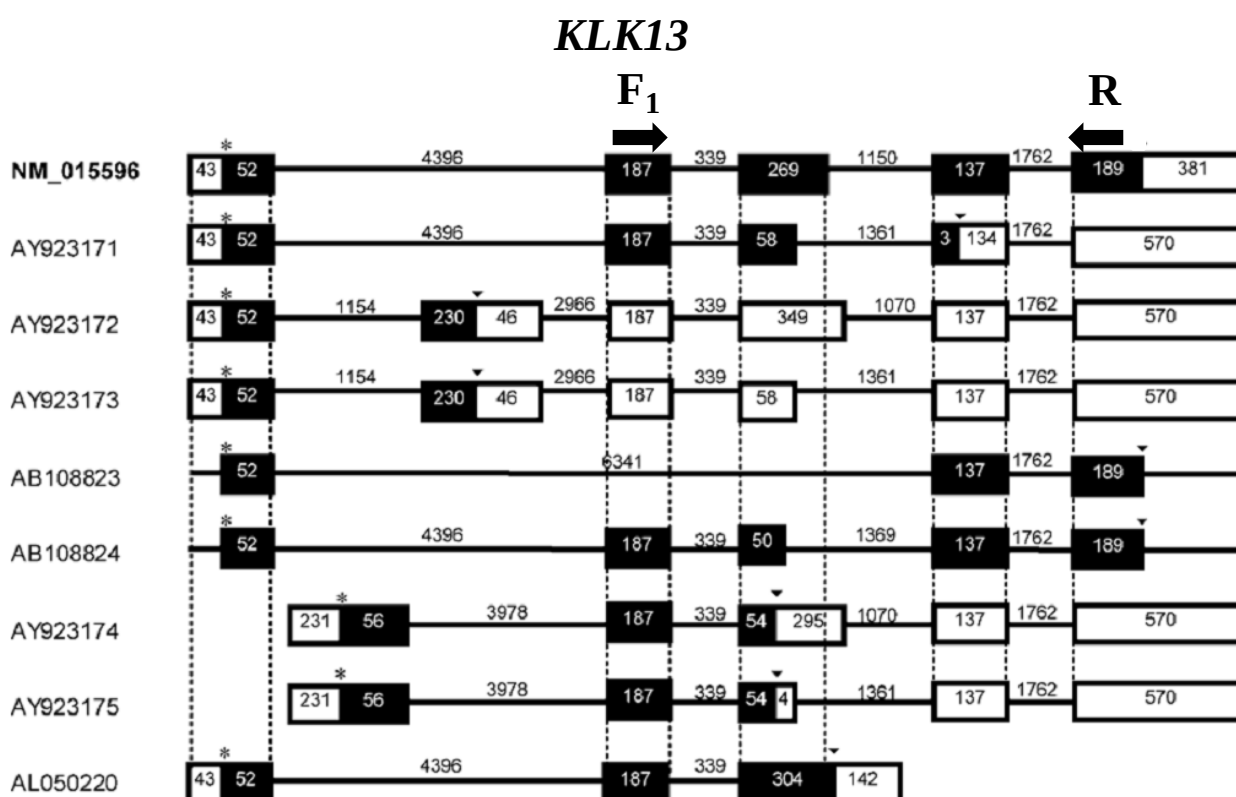
Πίνακας 2.3. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος των cDNA μορίων των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*.

Εκκινητής	Εξώνιο υβριδοποίησης (καταγραφή)	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (bp)	% GC	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<i>GAPDH</i> F	2° (NM_002046.4)	CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT	20	55,0	59,4	223
<i>GAPDH</i> R	4° (NM_002046.4)	TGA CAA GCT TCC CGT TCT CA	20	50,0	59,6	
<i>HPRT1</i> F	2° (NM_000194.2)	TGG AAA GGG TGT TTA TTC CTC AT	23	39,1	60,5	151
<i>HPRT1</i> R	3° (NM_000194.2)	ATG TAA TCC AGC AGG TCA GCA A	22	45,5	60,6	

2.7.4 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR για το γονίδιο *KLK13*

Το μίγμα της αντίδρασης για την ενίσχυση τμημάτων του cDNAs του γονιδίου *KLK13* αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (67 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20), 0,20 mM από κάθε dNTP, 1,50 mM MgCl₂, 1 μM από κάθε εκκινητή, 1,25 U Taq DNA polymerase-recombinant, 100 ng cDNA και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο 50 μL. Το στάδιο της αρχικής αποδιάταξης πραγματοποιείται στους 95 °C για 2 min για να ακολουθήσουν στην συνέχεια 40 θερμοκρασιακοί κύκλοι, οι οποίοι ξεκινούν με το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης στους 59 °C για 30 sec και ολοκληρώνονται με το στάδιο της επέκτασης στους 72 °C για 1 min. Το στάδιο της τελικής επέκτασης πραγματοποιείται στους 72 °C για 5 min. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνεται και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου στο οποίο αντί για υπόστρωμα έχει προστεθεί ο αντίστοιχος όγκος από DEPC-H₂O.

Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *KLK13* (Πίνακας 2.4) σχεδιάστηκαν με βάση τις δημοσιευμένες αλληλουχίες mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Numbers = NM_015596, AY923171, AY923173, AB108824, AY923172, AY923174, AY923175). Ο πρόσθιος εκκινητής (F₁) υβριδοποιείται στο δεύτερο εξώνιο και ο ανάστροφος (R) υβριδοποιείται στο πέμπτο εξώνιο (Εικόνα 2.6), οριοθετώντας πολλαπλά προϊόντα PCR μήκους 472 bp για την κλασική ισομορφή, 261 bp για τα μετάγραφα AY923171, AY923173 και AY923175, 253 bp για το μετάγραφο AB108824 και 552 bp για τα μετάγραφα AY923172 και AY923174.



Εικόνα 2.6. Οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών συμβατικής PCR για τη επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων των cDNA μορίων του γονιδίου *KLK13* [100].

Πίνακας 2.4. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος των cDNA μορίων του γονιδίου *KLK13*.

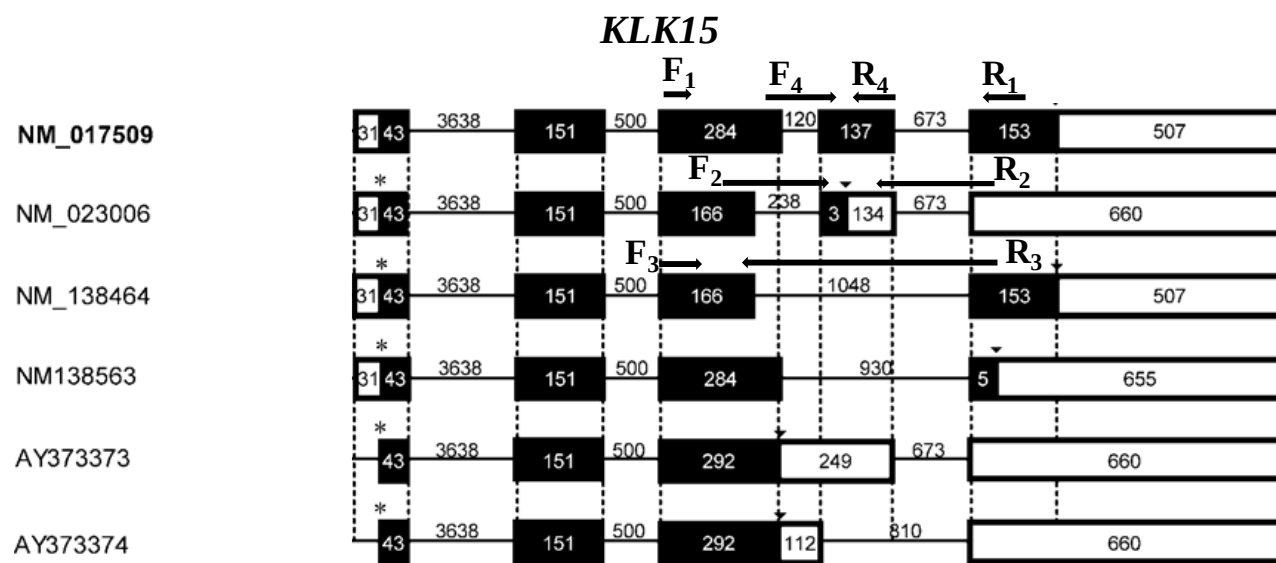
Εκκινητής	Εξώνιο υβριδοποίησης (καταγραφή)	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (bp)	% GC	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντων PCR (bp)
<i>KLK13</i> F1	2° (NM_015596)	GTC TAA AGG AGG GGC TCA AA	20	57,9	50,0	253 – 552
<i>KLK13</i> R	5° (NM_015596)	CAG GAG ACG ATG CCA TAC AGT	21	59,1	52,4	

2.7.5 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR για το γονίδιο *KLK15*

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *KLK15* μέσω συμβατικής PCR σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 2.5) με βάση τις δημοσιευμένες αλληλουχίες NM_017509, NM_023006, NM_138563, NM_138564, AY_373373 και AY_373374. Το ζεύγος F1-R1 υβριδοποιείται στα εξώνια 3 και 5, αντίστοιχα, οριοθετώντας πολλαπλά προϊόντα PCR μήκους 391 bp για την κλασική ισομορφή (NM_017509), 273/254 bp για τα μετάγραφα 1 και 2 αντίστοιχα (NM_023006 και NM_138563 αντίστοιχα) και 136 bp για το μετάγραφο 3 (NM_138563). Το ζεύγος F2-R2 υβριδοποιείται στη συρραφή των εξονίων 3-4 (NM_023006) και στη συρραφή των εξονίων 4-5, αντίστοιχα, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μεγέθους 160 bp που προκύπτει από την επιλεκτική ενίσχυση του εναλλακτικού μεταγράφου 1. Το ζεύγος F3-R3 υβριδοποιείται στο εξώνιο 3 και στη συρραφή των εξονίων 3-4 (καταγραφή NM_138464), αντίστοιχα, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR που προκύπτει από την επιλεκτική ενίσχυση του εναλλακτικού μεταγράφου 2. Το ζεύγος F4-R4 υβριδοποιείται στη συρραφή των εξονίων 3-4 και στο εξώνιο 4, αντίστοιχα, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR 229 bp που προκύπτει από την επιλεκτική ενίσχυση του κλασικού mRNA μεταγράφου (Εικόνα 2.7).

Το μίγμα των αντιδράσεων για την ενίσχυση τμημάτων του cDNAs του γονιδίου *KLK15* αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (67 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20), 0,20 mM από κάθε dNTP, 1,50 mM MgCl₂ για το ζεύγος εκκινητών F1-R1, 2,0 mM MgCl₂ για τα ζεύγη F2-R2 και F4-R4, 2,5 mM MgCl₂ για το ζεύγος F3-R4, 1 μM από κάθε εκκινητή, 1,25 U Taq DNA polymerase-recombinant, 150 ng cDNA και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο 50 μL. Το στάδιο της αρχικής αποδιάταξης πραγματοποιείται στους 95 °C για 2 min για να ακολουθήσουν στην συνέχεια 40 θερμοκρασιακοί κύκλοι, οι οποίοι ξεκινούν με το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ακολουθεί το στάδιο της

υβριδοποίησης στους 59 °C για το ζεύγος εκκινήτων F1-R1, 60 °C για τα ζεύγη F2-R2 και F3-R3 και 58 °C για το ζεύγος F4-R4 για 30 sec, και ολοκληρώνονται με το στάδιο της επέκτασης στους 72 °C για 1 min. Το στάδιο της τελικής επέκτασης πραγματοποιείται στους 72 °C για 5 min. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνεται και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου στο οποίο αντί για υπόστρωμα έχει προστεθεί ο αντίστοιχος όγκος από DEPC-H₂O.



Εικόνα 2.7. Οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινήτων συμβατικής PCR για τη επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων των cDNA μορίων του γονιδίου *KLK15* [100].

Πίνακας 2.5. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση τμήματος των cDNA μορίων που αντιστοιχούν στα διάφορα μεταγράφα του γονιδίου *KLK15*.

Εκκινητής	Εξώνιο υβριδοποίησης (καταγραφή)	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (bp)	% GC	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<i>KLK15</i> F1	3° (NM_017509)	CAT CAT GTT GCT GCG CCT AGT	21	52,4	61,7	136-391
<i>KLK15</i> R1	5° (NM_017509)	CAG GCT TGG TGG TGT TGT CA	20	55,0	60,1	
<i>KLK15</i> F2	3°-4° (NM_023006)	CCT GAA CCC CCA GTG AGT CT	20	60,0	60,8	160
<i>KLK15</i> R2	4°-5° (NM_023006)	CAG AGT CAC CCT CAC AGG ATT C	22	54,5	60,1	
<i>KLK15</i> F3	3° (NM_138464)	CAG CCA CCG CAA CGA CAT	18	61,1	61,1	193
<i>KLK15</i> R3	3°-4° (NM_138464)	CCC CCA GAG TCA CCC TTG T	19	63,2	60,9	
<i>KLK15</i> F4	3°-4° (NM_017509)	CAC GTC TCG GGT CAT TCC AC	20	60,0	61,4	229
<i>KLK15</i> R4	4° (NM_017509)	TGG GAG ACT CAC TTG TGA CCG	21	57,1	61,2	

2.7.6 Ηλεκτροφόρηση, ανίχνευση και ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανίχνευση, η ανάλυση και ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων PCR μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ηλεκτροφόρησης τους σε πήκτωμα αγαρόζης, στο οποίο έχει προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο, και της φωτογράφισης του πηκτώματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV), μετά την ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα που παρουσιάζουν τα προϊόντα PCR εξαρτάται από το μέγεθός τους. Πιο αναλυτικά, τα αρνητικά φορτισμένα προϊόντα PCR μετακινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη με το δεκαδικό λογάριθμο του μοριακού τους βάρους προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευδιάκριτων ζωνών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο μοριακό βάρος [209].

Για την ανάλυση των προϊόντων PCR που προήλθαν από την ενίσχυση των μεταγράφων των γονιδίων *GAPDH*, *HPRT1*, *KLK13* και *KLK15* πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5 – 3,0% (w/v) που περιείχε TBE 1× (89 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 89 mM βορικό οξύ και 2,0 mM EDTA) και 1 μg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης

που εφαρμόζονται στο πήκτωμα, το οποίο έχει τοποθετηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5×, περιλαμβάνουν εφαρμογή σταθερής τάσης 100 V για 50 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την ηλεκτροφόρηση ως εξής: 15 μ L προϊόντος PCR αναμίχθηκαν με 3 μ L διαλύματος χρωστικής φόρτωσης (Fermentas International Ltd.), το οποίο απέκτησε τελική συγκέντρωση 1,66 mM Tris-HCl, pH = 7,6, 10 mM EDTA, 10% v/v γλυκερόλη, 0,005% w/v χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,005% w/v χρωστικής κυανολικού ξυλενίου.

Ταυτόχρονα, σε κάθε πήκτωμα αγαρόζης ηλεκτροφορείται και ο μάρτυρας DNA τμημάτων με γνωστά μεγέθη (DNA Ladder) GeneRuler™ 100 bpDNA Ladder (Fermentas International Ltd.), οποίος περιείχε τμήματα DNA μεγέθους 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, και 100 bp.

Για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό της έντασης των ζωνών που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J 1.3v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχή λειτουργίας του παραπάνω λογισμικού βασίζεται στην απομόνωση μιας περιοχής της φωτογραφίας που θέλουμε να αναλύσουμε, που αντιστοιχεί στην αναμενόμενη περιοχή της επιθυμητής ζώνης στην ηλεκτροφόρηση, και στη μέτρηση της φωτεινότητας της περιοχής αυτής μέσω του υπολογισμού του αριθμού των ενεργών pixels. Η ένταση της ζώνης είναι ανάλογη της ποσότητας του εκάστοτε προϊόντος PCR.

Για κάθε δείγμα μετράται η ένταση της εκάστοτε ζώνης που προκύπτει από τα προϊόντα PCR του γονιδίου στόχου (*KLK13*, *KLK15*) και διαιρείται με την αντίστοιχη ένταση που προκύπτει από τα προϊόντα PCR του γονιδίου αναφοράς (*GAPDH* ή *HPRT1*). Με τον τρόπο αυτό υπολογίζονται οι μονάδες ημιποσοτικής έκφρασης για κάθε μετάγραφο σε όλα τα δείγματα προς ανάλυση.

2.8 Απομόνωση και καθαρισμός προϊόντων της αντίδρασης PCR για τα γονίδια *KLK13*, *KLK15* και *HPRT1* με σκοπό την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

2.8.1 Απομόνωση και καθαρισμός των προϊόντων PCR από το πήκτωμα αγαρόζης

Ένας τρόπος παρασκευής διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης μεταγράφων είναι η απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων PCR από το πήκτωμα αγαρόζης και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους. Τα διαλύματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή

προτύπων καμπυλών κατά την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο, με σκοπό τον υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων (copies) των μεταγράφων των υπό μελέτη γονιδίων σε άγνωστα δείγματα.

Η παραλαβή των προϊόντων PCR από το πήκτωμα αγαρόζης και ο καθαρισμός τους πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Inc). Μετά το πέρας της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης αποκόπτεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία η περιοχή του πηκτώματος που περιέχει την επιθυμητή ζώνη. Το κομμάτι του πηκτώματος που αποκόπτεται ζυγίζεται και μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 2,0 mL. Στη συνέχεια προστίθενται στο φιαλίδιο 200 μ L αντιδραστηρίου NT για κάθε 100 mg πηκτώματος που αποκόπηκε. Το μίγμα επωάζεται στους 50°C σε θερμαινόμενο, ανακινούμενο επωαστήριο σωληναρίων, μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης των κομματιών αγαρόζης. Στη συνέχεια το διάλυμα του πηκτώματος προστίθεται σε μια ειδική στήλη NucleoSpin Extract II κι αυτή με τη σειρά της μεταφέρεται σε ένα νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf 2,0 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε $11.000 \times g$ για 1 min, και απόρριψη του όγκου που διέτρεξε τη στήλη κατά τη φυγοκέντρωση και προσθήκη 600 μ L αντιδραστηρίου NT3 (Macherey-Nagel, Inc) στη στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε $11.000 \times g$ για 1 min και το υγρό που είχε διατρέξει τη στήλη απορρίπτεται και πάλι και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση σε $11.000 \times g$ για 2 min. Στη συνέχεια η στήλη θερμαίνεται για 2-5 min και τοποθετείται σε ένα νέο φιαλίδιο τύπου Eppendorf 1,5 mL. Προστίθενται 30 μ L από το αντιδραστήριο Elution Buffer NE (5 mM Tris-HCl, pH = 8,5), το φιαλίδιο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε $11.000 \times g$ για 1 min. Τέλος, το διάλυμα που διατρέχει τη στήλη αυτή τη φορά συλλέγεται και αποθηκεύεται.

Για την αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή των προϊόντων PCR που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν: cDNA από την κυτταρική σειρά LNCaP για τα γονίδια *KLK15* και *HPRT1*, cDNA από την κυτταρική σειρά DU145 για το γονίδιο *KLK13* καθώς και οι εκκινητές *HPRT1* F – *HPRT1* R, *KLK13* F2 – *KLK13* R και *KLK15* F5 – *KLK15* R5 (όπως περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο της ποσοτικής PCR). Το μίγμα των αντιδράσεων αποτελούνταν από ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (67 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % (v/v) Tween 20) (HyTest. Ltd), 0,20 mM από κάθε dNTP, 1,50 mM MgCl_2 , 1 μ M από κάθε εκκινητή, 1,25 U *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase-recombinant (HyTest, Ltd), 150 ng cDNA και DEPC- H_2O σε τελικό όγκο 50 μ L. Το στάδιο της

αρχικής αποδιάταξης πραγματοποιήθηκε στους 95 °C για 2 min για να ακολουθήσουν στην συνέχεια 40 θερμοκρασιακοί κύκλοι, οι οποίοι ξεκινούν με το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης στους 60 °C για 30 sec και ολοκληρώθηκε με το στάδιο της επέκτασης στους 72 °C για 1 min. Το στάδιο της τελικής επέκτασης πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 5 min.

2.8.2 Προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων των προϊόντων PCR και παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση των δειγμάτων που παραλήφθηκαν από τη διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο (2.8.1) στα 260 nm. Ο υπολογισμός του αριθμού των αντιγράφων στο αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης προκύπτει ως εξής: Το τμήμα του DNA που έχει απομονωθεί (προϊόν PCR) έχει γνωστό μοριακό βάρος το οποίο μπορεί να υπολογιστεί από το γινόμενο: $MW = \text{μέγεθος προϊόντος PCR (bp)} \times 660 \text{ daltons (g/mol)/ bp}$. Η συγκέντρωση του διαλύματος παρακαταθήκης σε αντίγραφα (copies)/μL υπολογίζεται ως εξής:

$$C = \frac{6,023 \times 10^{23} \text{ copies/mol} \times A_{260} \times 50 \times 10^{-9} \text{ g/μL} \times \text{Αραίωση}}{MW \text{ (g/mol)}}$$

Με διαδοχικές (σειριακές) αραιώσεις 1:10 του PCR προϊόντος προκύπτει μια σειρά προτύπων διαλυμάτων γνωστού αριθμού αντιγράφων, τα οποία καλύπτουν την περιοχή από $1,9 \times 10^{11}$ -190 copies/μL για το γονίδιο *HPRT1*, $2,9 \times 10^{11}$ – 29,6 copies/μL για το γονίδιο *KLK15* και $1,23 \times 10^{11}$ – 12,3 copies/μL για το γονίδιο *KLK13*. Τα πρότυπα αυτά διαλύματα περιλαμβάνονται σε κάθε σειρά αντιδράσεων ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την κατασκευή προτύπων καμπυλών (standard curves), με σκοπό την αντιστοίχιση των εξαγόμενων τιμών Ct σε αριθμό αντιγράφων.

2.9 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR, qPCR)

2.9.1 Αρχές της μεθόδου qPCR

Από την ανακάλυψη της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο το 1993 (Higuchi *et al.*) [214] μέχρι σήμερα, η τεχνική αυτή έχει εξελιχθεί και έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος ερευνητικών εργασιών που έχουν δημοσιευτεί σε διεθνή περιοδικά υψηλού κύρους. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως, προσφέροντας αποτελέσματα με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, σε

εξετάσεις ρουτίνας που περιλαμβάνουν από τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου και την ανίχνευση σπάνιων πολυμορφισμών έως την κατασκευή μοριακών προφίλ έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με τον καρκίνο [210, 215-217].

Από το σύνολο των κλινικών εφαρμογών της qPCR, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαγνωστική δοκιμασία Oncotype DX η οποία αποτελεί, ουσιαστικά, μια πολλαπλή ποσοτική PCR για την ταυτόχρονη ανάλυση της έκφρασης συγκεκριμένων ογκογονιδίων σε επίπεδο mRNA. Το Oncotype DX χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη υποτροπών σε συγκεκριμένες υποομάδες ασθενών με καρκίνο του μαστού [218]. Επιπρόσθετα, η ανίχνευση των επιπέδων mRNA του γονιδίου που κωδικοποιεί το PCA3 πραγματοποιείται μέσω qPCR σε εξετάσεις ρουτίνας και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση ανάγκης διενέργειας βιοψίας στον καρκίνο του προστάτη [28, 81].

Η qPCR παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη συμβατική PCR, αλλά και σε σχέση με άλλες μεθόδους ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η γρήγορη ανάκτηση αποτελεσμάτων, η αυξημένη ευαισθησία, η αυξημένη ειδικότητα, η επαναληψιμότητα και η δυνατότητα αυτοματοποιημένης ανάλυσης. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν η ετερογένεια στις διαδικασίες συλλογής των δειγμάτων, στις μεθόδους εκχύλισης του RNA και η μεταβλητότητα στην απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής. Τα μειονεκτήματα αυτά, ωστόσο, μπορούν όμως να αποφευχθούν ακολουθώντας τις κατάλληλες διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου [210, 216, 217, 219].

Η τεχνική qPCR βασίζεται σε δύο βασικές διαδικασίες που συνδυάζονται ιδανικά: τον *in vitro* πολλαπλασιασμό μιας οριοθετημένης αλληλουχίας DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και την παράλληλη και συνεχή ανίχνευση των προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μέσω επαναλαμβανόμενων μετρήσεων φθορισμού. Το μέρος του πολυμερισμού ακολουθεί τις ίδιες περίπου αρχές με τη συμβατική PCR. Ωστόσο, η qPCR βασίζεται στην ικανότητα των μορίων ανιχνευτών να προσδένονται, ειδικά ή μη ειδικά, στα προϊόντα της αντίδρασης με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού ο οποίος μπορεί να μετρηθεί αποτελεσματικά. Όταν η αντίδραση βρίσκεται στους πρώτους κύκλους πολυμερισμού ο φθορισμός που παράγεται είναι ιδιαίτερα μικρός με αποτέλεσμα να μην ξεχωρίζει από το σήμα υποβάθρου (background noise). Καθώς η αντίδραση φτάνει σε μεγαλύτερο αριθμό κύκλων το προϊόν DNA συσσωρεύεται εκθετικά (εκθετική φάση) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο

φθορισμός να ξεπερνά το σήμα υποβάθρου. Ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο ο φθορισμός ξεκινά να ξεχωρίζει από το σήμα υποβάθρου ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (Threshold Cycle-Ct). Η τιμή Ct κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την qPCR, καθώς σχετίζεται με την αρχικής ποσότητα του υποστρώματος της αντίδρασης. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του προς ενίσχυση υποστρώματος τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για να ξεχωρίσει ο φθορισμός από το σήμα υποβάθρου, χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς ένα προκαθορισμένο κατώφλι φθορισμού (threshold). Μετά την εκθετική φάση, λαμβάνει χώρα η γραμμική φάση, όπου παρατηρείται ταχεία κατανάλωση των συστατικών της αντίδρασης για να ακολουθήσει η τελευταία φάση της αντίδρασης, η φάση κορεσμού (plateau). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της qPCR σε σχέση με τη συμβατική PCR είναι ότι η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται στην εκθετική φάση της αντίδρασης (μέσω του προσδιορισμού της τιμής του Ct) και όχι στη φάση κορεσμού, όπου τα επίπεδα του σήματος μπορεί να φτάσουν να είναι παρόμοια και όχι ανάλογα της αρχικής ποσότητας υποστρώματος. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αξιόπιστα αποτελέσματα προσδιορισμού της αρχικής ποσότητας υποστρώματος [208, 210, 215-217, 219-221].

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην qPCR είναι παρόμοια με αυτά της συμβατικής PCR και περιλαμβάνουν το αρχικό υπόστρωμα, ειδικούς εκκινητές, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμερισμού με δισθενή ιόντα μαγνησίου, τα dNTPs, την Taq DNA πολυμεράση, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται επιπλέον φθορίζοντα μόρια που προσδένονται, είτε ειδικά είτε μη ειδικά, στην αλληλουχία που ενισχύεται [208, 210, 217, 220]. Οι κατηγορίες μορίων ανιχνευτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια αντίδραση PCR θα περιγραφούν αναλυτικά παρακάτω.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών-ανιχνευτών της αντίδρασης γίνεται ακολουθώντας τους γενικούς κανόνες που περιγράφηκαν για τη συμβατική PCR λαμβάνοντας υπόψη επιπλέον τα παρακάτω:

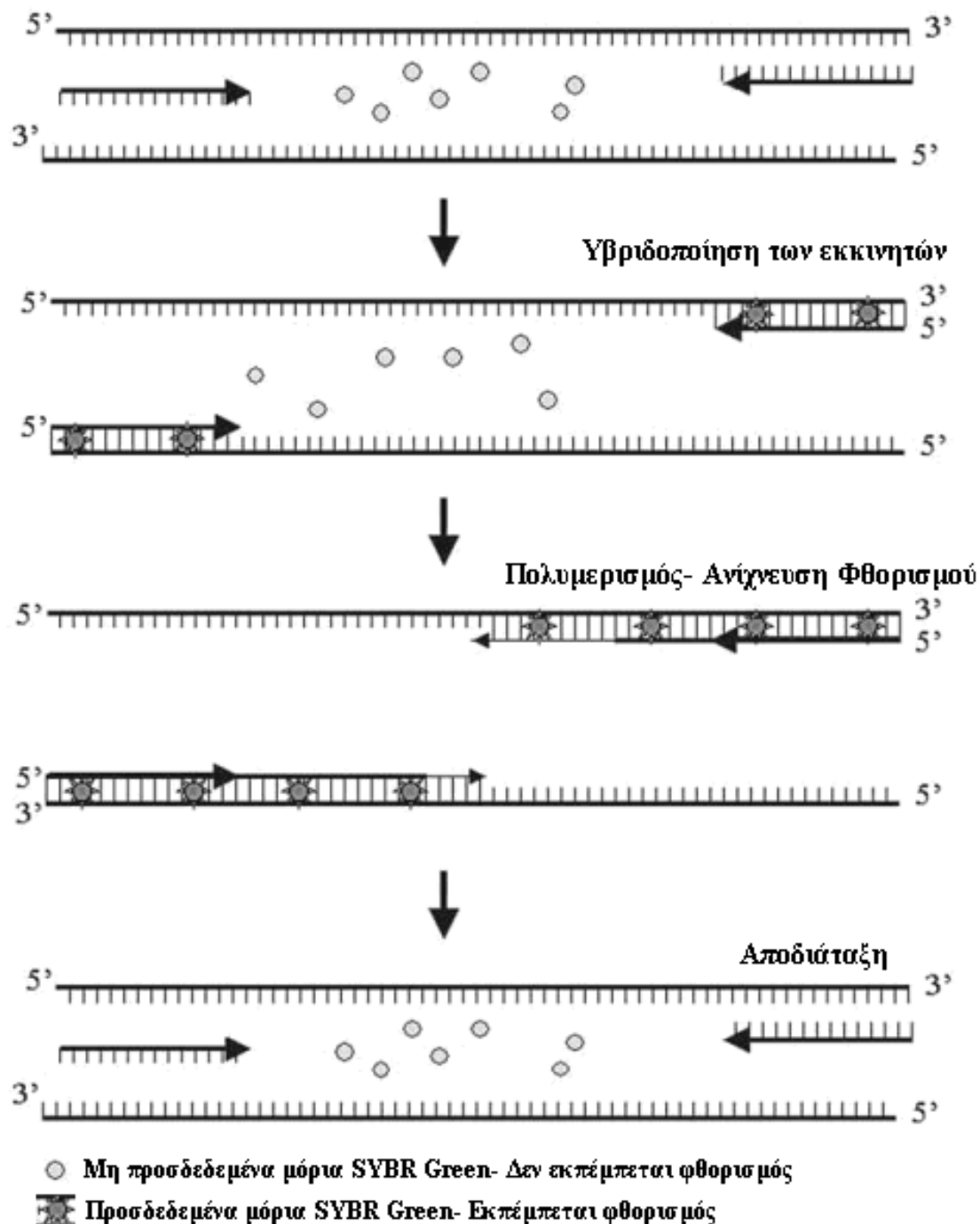
i) Οι εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ούτως ώστε να παρουσιάζουν T_m κοντά στους 60°C. Αυτό γίνεται γιατί στα περισσότερα πρωτόκολλα qPCR η υβριδοποίηση των εκκινητών και ο πολυμερισμός γίνεται σε ένα στάδιο, στους 60°C, καθώς αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού για την ειδική Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση.

ii) Σε περίπτωση επιλογής σχεδιασμού φθορίζοντος μορίου ανιχνευτή, το T_m του θα πρέπει να υπερβαίνει αυτό των εκκινήτων κατά 8-10°C. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι ο ανιχνευτής υβριδοποιείται πλήρως κατά το στάδιο επιμήκυνσης των εκκινήτων.

iii) Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η αντίδραση αποκτά τη μέγιστη απόδοσή της όταν ενισχύονται αλληλουχίες μικρού μεγέθους, το συνιστώμενο μέγεθος προϊόντων PCR είναι μεταξύ 60 και 300 bp.

Τα φθορίζοντα συστήματα ανίχνευσης κατέχουν κεντρικό ρόλο στην qPCR και κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: στα συστήματα που χρησιμοποιούν μόρια που προσδένονται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, και στα συστήματα που βασίζονται στην ειδική δέσμευση των μορίων ανιχνευτών σε συγκεκριμένο μέρος της ενισχυόμενης αλληλουχίας με αποτέλεσμα τη μετέπειτα εκπομπή φθορισμού [208, 210, 217, 220].

Στην πρώτη κατηγορία, αυτή των μη ειδικών μορίων, ανήκει το σύστημα ανίχνευσης που βασίζεται στη χρωστική SYBR Green και το οποίο είναι ιδιαίτερα διαδομένο στα ερευνητικά πρωτόκολλα παγκοσμίως. Σε αντίθεση με το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο προσδένεται μεταξύ των δύο αλυσίδων DNA και μπορεί να επηρεάσει τη δράση της DNA πολυμεράσης, η χρωστική SYBR προσδένεται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA και δεν παρεμποδίζει τον πολυμερισμό. Τα μόρια της χρωστικής SYBR Green δε φθορίζουν, τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, όταν βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα της αντίδρασης εξαιτίας αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων των μορίων της χρωστικής. Ωστόσο, όταν τα μόρια χρωστικής προσδεθούν στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA οι αλληλεπιδράσεις αυτές παύουν να υφίστανται με αποτέλεσμα την εκπομπή σημαντικών επιπέδων φθορισμού [208, 210, 217, 220] (Εικόνα 2.8).



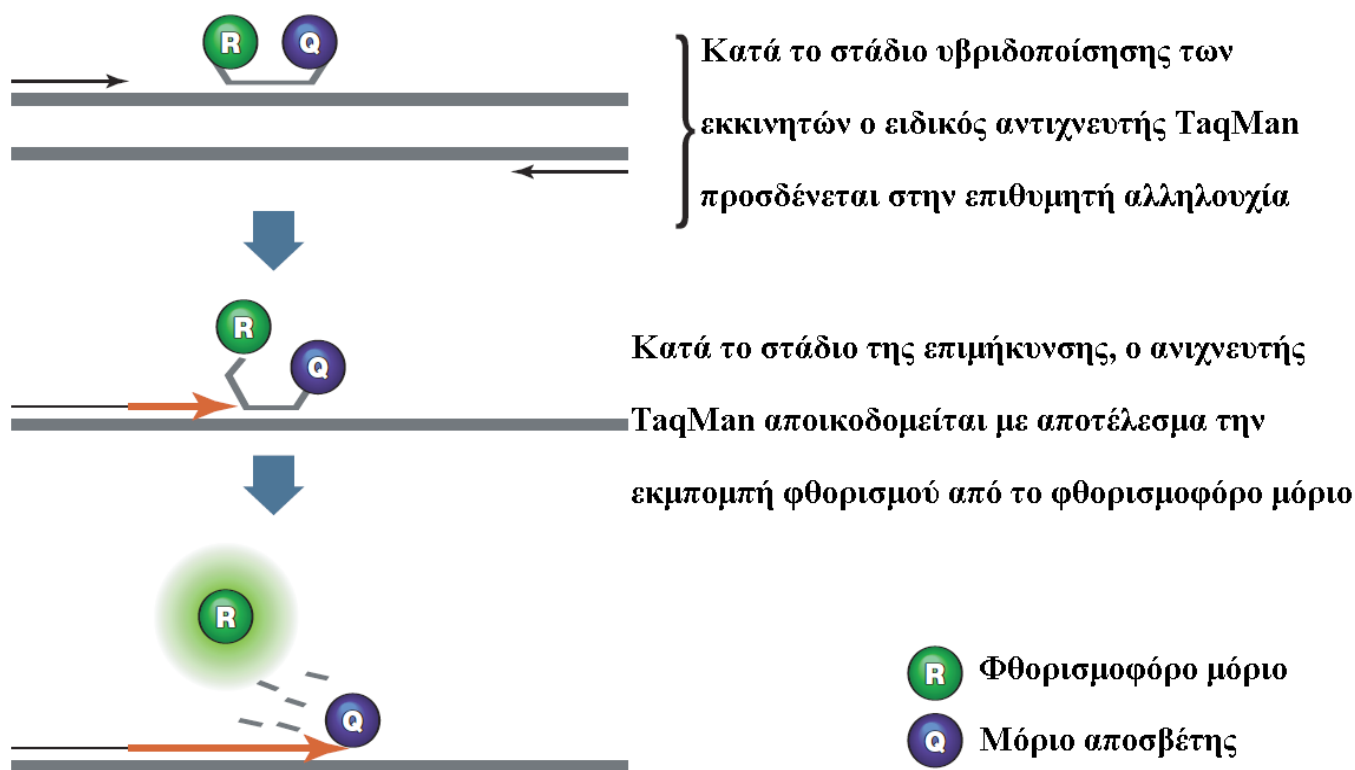
Εικόνα 2.8. Η αρχή της μεθόδου του συστήματος ανίχνευσης των προϊόντων της ποσοτικής PCR σε πραγματικό βασισμένο στη χρωστική SYBR Green.

Λόγω της μη ειδικής δέσμευσης της χρωστικής SYBR Green σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, μετά το τέλος κάθε αντίδρασης qPCR θα πρέπει να ακολουθεί ένα επιπλέον θερμικό πρωτόκολλο σταδιακής αποδιάταξης των προϊόντων που σχηματίζονται, ούτως ώστε να

κατασκευαστεί η λεγόμενη καμπύλη τήξης (melting curve). Μέσω της καμπύλης τήξης, υπολογίζεται το T_m των εκάστοτε προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των ειδικών προϊόντων και των μη ειδικών προϊόντων ή/και των διμερών των εκκινητών που πιθανώς σχηματίζονται κατά την αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη τήξης κατασκευάζεται, σε πραγματικό χρόνο, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται βαθμιαία από τους 60 °C έως τους 95 °C και λαμβάνονται παράλληλα επαναλαμβανόμενες μειούμενες τιμές φθορισμού καθώς τα προϊόντα PCR αποδιατάσσονται σταδιακά. Χρησιμοποιώντας την πρώτη αρνητική παράγωγο της καμπύλης φθορισμού-θερμοκρασίας απεικονίζονται γραφικά κορυφές που αντιστοιχούν στα εκάστοτε προϊόντα της αντίδρασης. Μέσω αυτών των κορυφών υπολογίζεται η μοναδική τιμή T_m για κάθε διαφορετικό προϊόν [210, 220].

Στη δεύτερη κατηγορία συστημάτων ανίχνευσης των προϊόντων της qPCR ανήκουν οι ειδικοί ανιχνευτές (probes), οι οποίοι είναι ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς το προϊόν που επιθυμείται να ανιχνευτεί, και στα άκρα των οποίων έχουν προσδεθεί μία ή δύο φθορίζουσες χρωστικές. Οι πιο συνήθεις ανιχνευτές είναι: το σύστημα ζεύγους ανιχνευτών (Hybridization Probes), οι ανιχνευτές Taqman (TaqMan Probes) και οι μοριακοί φάροι (Molecular Beacons). Οι ανιχνευτές Taqman να είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενοι. Όλα τα παραπάνω συστήματα βασίζουν τη λειτουργία τους σε ένα φυσικοχημικό φαινόμενο που ονομάζεται FRET (μεταφορά ενέργειας με φθορισμό, Fluorescence Resonance Energy Transfer). Σε κάθε μόριο ανιχνευτή TaqMan υπάρχει στο 5' άκρο της αλληλουχίας ομοιοπολικά προσδεδεμένο ένα φθορισμοφόρο μόριο (reporter dye) και στο 3' άκρο της αλληλουχίας ομοιοπολικά προσδεδεμένο ένα μόριο αποσβέτης (quencher dye). Μέσω του φαινομένου FRET ο φθορισμός που παράγεται από το φθορισμοφόρο μόριο απορροφάται από το γειτονικό μόριο αποσβέτη. Έτσι όταν τα μόρια του ανιχνευτή TaqMan βρίσκονται ελεύθερα στην αντίδραση η κοντινή απόσταση μεταξύ του φθορισμοφόρου μορίου και του μορίου αποσβέτη επιτρέπει την αναστολή οποιαδήποτε εκπομπής φθορισμού. Ωστόσο, καθώς παράγεται η επιθυμητή αλληλουχία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης τα μόρια του ανιχνευτή προσδένονται σε αυτή. Έτσι, όταν η Taq πολυμεράση συναντήσει κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού τον, προσδεδεμένο στην αλληλουχία, ανιχνευτή TaqMan τότε κινητοποιείται η ενεργότητα που διαθέτει ως 5'-3' εξωνουκλεάση και υδρολύει τον ανιχνευτή. Το αποτέλεσμα αυτής της υδρόλυσης είναι η απομάκρυνση του φθορισμοφόρου μορίου από το μόριο αποσβέτη, με επακόλουθο την αναστολή του φαινομένου FRET και την

εκπομπή μετρήσιμου φθορισμού. Είναι ευνόητο ότι και σε αυτήν την περίπτωση η εκπομπή του φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που σχηματίζεται κατά την αντίδραση, δηλαδή της αρχικής ποσότητας υποστρώματος (Εικόνα 2.9). Το πλεονέκτημα που προκύπτει από τη χρήση των ανιχνευτών TaqMan είναι η αυξημένη ειδικότητα της αντίδρασης καθώς επιπλέον του ζεύγους των εκκινητών χρησιμοποιείται ακόμα μια ειδική αλληλουχία για την ανίχνευση των επιθυμητών μεταγράφων, ενώ αποφεύγεται η όποια παρεμβολή φθορισμού από μη ειδικά προϊόντα ή/και διμερή εκκινητών. Επιπρόσθετα, με τη χρήση πολλαπλών ανιχνευτών TaqMan που εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικά μήκη κύματος καθίσταται δυνατός ο σχεδιασμός και η εκτέλεση πρωτοκόλλων πολλαπλής (multiplex) qPCR [210, 217, 220].

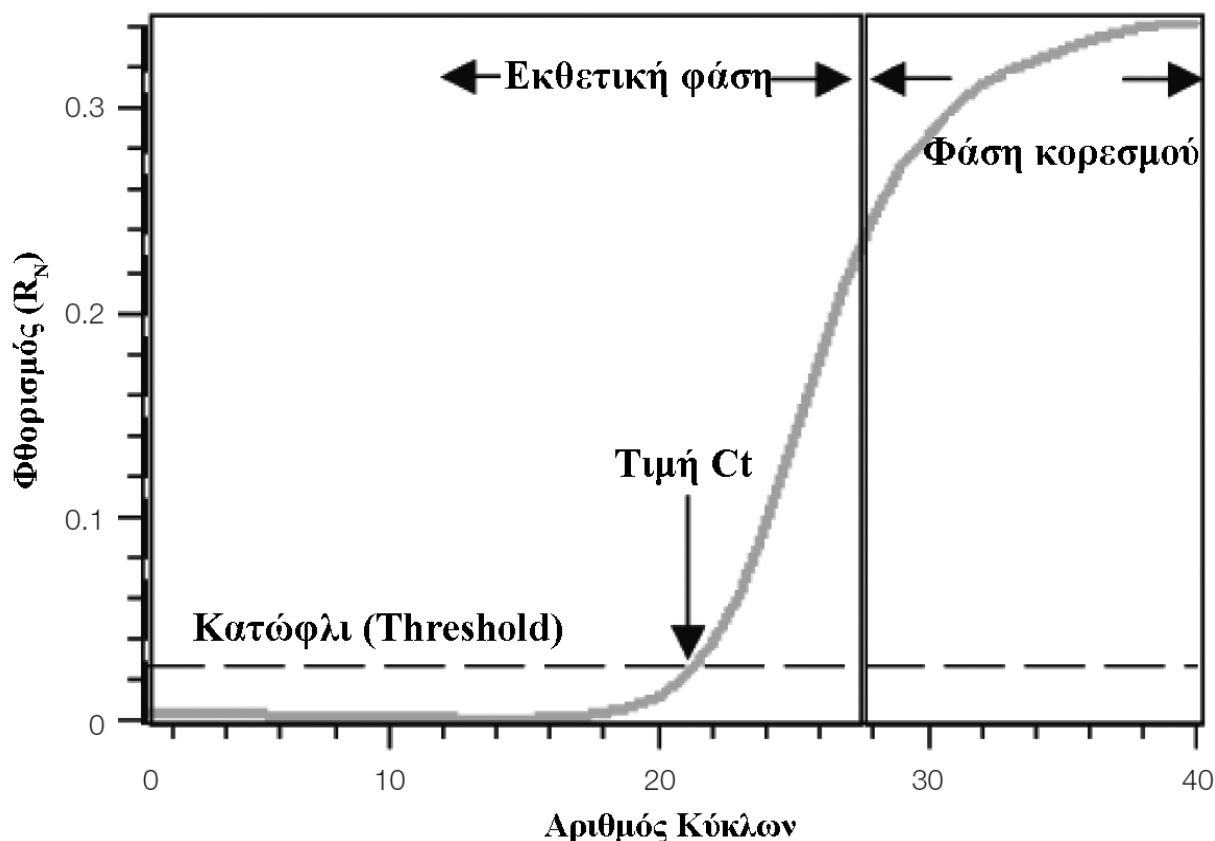


Εικόνα 2.9. Η αρχή της μεθόδου που βασίζεται στο σύστημα ανίχνευσης των προϊόντων της qPCR βασιζόμενο στους ειδικούς ανιχνευτές TaqMan [222].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε χρήση των συστημάτων ανίχνευσης προϊόντων της qPCR μέσω της χρωστικής SYBR Green αλλά και μέσω ειδικών ανιχνευτών TaqMan. Για την κανονικοποίηση του εκπεμπόμενου φθορισμού, και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς (Passive reference dye) ROX. Η χρωστική ROX περιέχεται στο μίγμα της αντίδρασης qPCR και χρησιμοποιείται για τη διόρθωση των τιμών

φθορισμού που ενδεχομένως να παρουσιάζουν μικρές διαφορές, μη σχετιζόμενες με την qPCR καθαυτή, από αντίδραση σε αντίδραση. Στο τέλος κάθε κύκλου αντίδρασης ο φθορισμός της χρωστικής αναφοράς διαιρείται με το φθορισμό της χρωστικής ROX, η οποία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος και παρουσιάζει αμετάβλητο φθορισμό κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι κανονικοποιημένες τιμές φθορισμού R_N . Οι τιμές αυτές τοποθετούνται στον κατακόρυφο άξονα σε κατάλληλο γράφημα με τους κύκλους της αντίδρασης να απεικονίζονται στον οριζόντιο άξονα. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάζεται η καμπύλη ενίσχυσης (amplification curve). Ένας εναλλακτικός τρόπος απεικόνισης είναι μέσω της χρήσης των τιμών ΔR_N που προκύπτουν από τις τιμές R_N μετά την αφαίρεση του φθορισμού του σήματος υποβάθρου (baseline) [217, 219, 220, 223].

Το σημαντικότερο σημείο στην ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η εξαγωγή των τιμών C_t η οποία γίνεται μέσω του ειδικού λογισμικού SDS 1.2.3. (Sequence Detection Systems 1.2.3.) (Applied Biosystems). Το λογισμικό αυτό διαθέτει επιλογή για την αυτόματη τοποθέτηση του κατωφλίου (threshold) στις καμπύλες ενίσχυσης και τον υπολογισμό μιας τιμής C_t για κάθε καμπύλη ενίσχυσης (Εικόνα 2.10). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το κατώφλι τοποθετείται στην εκθετική φάση της καμπύλης. Επιπρόσθετα, το κατώφλι μπορεί να διαφέρει μεταξύ σειρών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε διαφορετικό χρονικό σημείο. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα κοινό δείγμα (βαθμονομητής ή πρότυπα δείγματα) μεταξύ διαφορετικών σειρών αντιδράσεων, ούτως ώστε να μπορεί να γίνει διόρθωση αυτών των αναμενόμενων διακυμάνσεων στην τιμή του C_t . Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μεταβάλλεται η τιμή C_t , ωστόσο η διαφορά του C_t από το βαθμονομητή ή τα πρότυπα δείγματα παραμένει αμετάβλητη, καθώς οι καμπύλες ενίσχυσης, στην εκθετική φάση, είναι παράλληλες. Η κανονικοποιημένη αυτή τιμή χρησιμοποιείται εν τέλει στην ανάλυση των αποτελεσμάτων [216, 217, 219-221, 223].

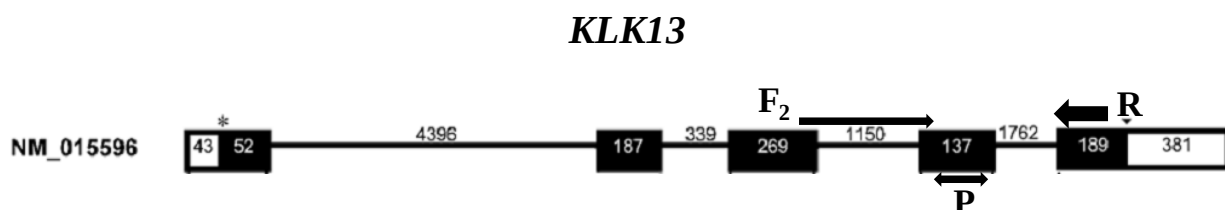


Εικόνα 2.10. Απεικόνιση μιας τυπικής καμπύλης ενίσχυσης. Στον οριζόντιο άξονα έχουν τοποθετηθεί οι κύκλοι της αντίδρασης qPCR και στον κάθετο άξονα οι μονάδες φθορισμού (R_N).

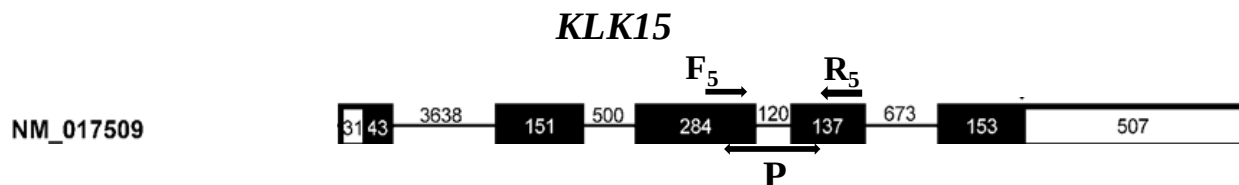
2.9.2 Σχεδιασμός και σύνθεση των εκκινητών και των μορίων ανιχνευτών (probes) TaqMan της qPCR

Για την ποσοτικοποίηση των επίπεδων έκφρασης των γονιδίων στόχων *KLK13* και *KLK15* και του γονιδίου αναφοράς *HPRT1* ακολουθήθηκε το σύστημα ειδικής ανίχνευσης των προϊόντων PCR μέσω της χρήσης ανιχνευτών TaqMan. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές, διαφορετικοί από αυτούς της συμβατικής PCR, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο, καθώς και ειδικοί ανιχνευτές TaqMan ούτως ώστε να επιτευχθεί η αποκλειστική ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των κλασικών μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Για το γονίδιο αναφοράς *HPRT1*, η έκφραση του οποίου χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της qPCR, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές της συμβατικής PCR και σχεδιάστηκε επιπλέον ένας ειδικός ανιχνευτής TaqMan. Πιο συγκεκριμένα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κλασικής mRNA ισόμορφης του γονιδίου *KLK13* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος

εκκινητών F2 –R (Πίνακας 2.6), το οποίο υβριδοποιείται στη συρραφή των εξονίων 3-4 και στο πέμπτο εξόνιο, αντίστοιχα, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 104 bp. Ο ειδικός ανιχνευτής TaqMan (P) διαθέτει το σύστημα φθορισμοφόρου-αποσβέτη CY5-BHQ3 και υβριδοποιείται μεταξύ των F2 και R εκκινητών στο τέταρτο εξόνιο (Εικόνα 2.11). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κλασικής ισόμορφης του γονιδίου *KLK15* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος F5-R5 (Πίνακας 2.6), το οποίο υβριδοποιείται στο τρίτο και στο τέταρτο εξόνιο, αντίστοιχα, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 104 bp. Ο ανιχνευτής TaqMan (P) διαθέτει το σύστημα φθορισμοφόρου-αποσβέτη FAM-TAMRA και υβριδοποιείται στην περιοχή συρραφής των εξονίων 3-4 (Εικόνα 2.12). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μεταγράφου του γονιδίου *HPRT1* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές της συμβατικής PCR *HPRT1* F και *HPRT1* R που υβριδοποιούνται στο δεύτερο και τρίτο εξόνιο (Εικόνα 2.5), οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 151 bp, ενώ σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ένας ειδικός ανιχνευτής TaqMan (P), ο οποίος διαθέτει το σύστημα φθορισμοφόρου-αποσβέτη JOE-BHQ1 και υβριδοποιείται μεταξύ των δύο εκκινητών σε μια περιοχή του τρίτου εξονίου (Πίνακας 2.6).



Εικόνα 2.11. Οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών qPCR και του ανιχνευτή TaqMan (P) για τη επιλεκτική ενίσχυση και ανίχνευση των cDNA μορίων του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK13*.



Εικόνα 2.12. Οι περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών qPCR και του ανιχνευτή TaqMan (P) για τη επιλεκτική ενίσχυση και ανίχνευση των cDNA μορίων του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15*.

Πίνακας 2.6. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών και των ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της PCR σε πραγματικό χρόνο για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *KLK13*, *KLK15* και *HPRT1*.

Εκκινητής	Εξώνιο υβριδοποίησης (καταγραφή)	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (bp)	% GC	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<i>KLK13</i> F2	3° -4° (NM_015596)	CAG CCC CCA GGT GAA TTA C	19	57,9	57,9	204
<i>KLK13</i> R	5° (NM_015596)	CAG GAG ACG ATG CCA TAC AGT	21	52,4	59,1	
<i>KLK13</i> P	4° (NM_015596)	CY5 - TGC CAA CAT CCA ACT TCG CTC AGA T - BHQ3	25	50,0	70,6	
<i>KLK15</i> F5	3° (NM_017509)	GCC TGG TGT CCC ACA ACG	18	66,7	60,9	104
<i>KLK15</i> R5	4° (NM_017509)	TGT GTC CGA GAT AAT GCT GAT GT	23	43,5	59,9	
<i>KLK15</i> P	3°-4° (NM_017509)	FAM - CCC CGG TCA CAA GTG AGT CTC CCA - TAMRA	24	63,0	72,1	
<i>HPRT1</i> F	2° (NM_000194.2)	TGG AAA GGG TGT TTA TTC CTC AT	23	39,1	60,5	151
<i>HPRT1</i> R	3° (NM_000194.2)	ATG TAA TCC AGC AGG TCA GCA A	22	45,5	60,6	
<i>HPRT1</i> P	3° (NM_000194.2)	JOE - CCA TCA CAT TGT AGC CCT CTG TGT GCT C - BHQ1	28	54,0	71,1	

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του miR-224 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης που βασίζεται στη χρωστική SYBR Green. Το μικρό πυρηνισκικό RNA 48 (Small nucleolar RNA 48, SNORD48, RNU48) χρησιμοποιήθηκε ως μόριο αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης του miR-224, λόγω της σταθερής και αμετάβλητης έκφρασής του σε δείγματα καρκίνου προστάτη, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία [224, 225]. Για την ενίσχυση των cDNAs που αντιστοιχούν στο miR-224 χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής miR-224 F και ο κοινός ανάστροφος εκκινητής (R) ο οποίος υβριδοποιείται στην περιοχή του poly(T) εκκινητή που χρησιμοποιείται στην αντίστροφη μεταγραφή με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος μεγέθους 65 bp. Για την ενίσχυση των cDNAs που αντιστοιχούν στο μόριο SNORD48 χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός πρόσθιος εκκινητής SNORD48 F και ο κοινός ανάστροφος εκκινητής (R) με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος 105 bp (Πίνακας 2.7).

Πίνακας 2.7. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της PCR σε πραγματικό χρόνο για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του miR-224.

Εκκινητής	Περιοχή υβριδοποίησης	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος (bp)	% GC	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
miR-224 F	Καταγραφή NR_029638	CAA GTC ACT AGT GGT TCC GTT AA	23	43,0	57,0	65
R	Poly(T) εκκινητής	GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA C	22	45,0	57,5	
SNORD48 F	Καταγραφή NR_002745	TGA TGA TGA CCC CAG GTA ACT CT	23	48,0	60,5	105
R	Poly(T) εκκινητής	GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA C	22	45,0	57,5	

2.9.3 Αντίδραση qPCR για τα γονίδια *KLK13*, *KLK15* και *HPRT1*

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών των αντιδράσεων qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγράφων των γονιδίων *KLK13*, *KLK15* και *HPRT1* δοκιμάστηκαν, για κάθε γονίδιο, ένα εύρος συγκεντρώσεων εκκινητών (250 – 1200 nM) και ανιχνευτών (50 – 350 nM).

Η βελτιστοποιημένη αντίδραση για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγράφων του γονιδίου *HPRT1* περιελάμβανε 5,0 μ L TaqMan Master Mix 2 $\times$ (Roche, Inc), 1000 nM από κάθε εκκινητή, 300 nM από τον ειδικό ανιχνευτή TaqMan, 20 ng cDNA ή 1,0 μ L από κάθε πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (αντίγραφα *HPRT1*/ μ L) και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 μ L. Η βελτιστοποιημένη αντίδραση για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK13* περιελάμβανε 5,0 μ L TaqMan Master Mix 2 $\times$ (Roche, Inc), 900 nM από κάθε εκκινητή, 300 nM από τον ειδικό ανιχνευτή TaqMan, 20 ng cDNA ή 1,0 μ L από κάθε πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (σε αντίγραφα *KLK13*/ μ L) και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 μ L. Η βελτιστοποιημένη αντίδραση για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* περιελάμβανε 5,0 μ L TaqMan Master Mix 2 $\times$ (Roche, Inc), 500 nM από κάθε εκκινητή, 250 nM από τον ειδικό ανιχνευτή TaqMan, 1,0 μ L προϊόντος PCR ή 1,0 μ L από κάθε πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (σε αντίγραφα *KLK15*/ μ L) και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 μ L. Σημειώνεται ότι για τη μελέτη της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15*, πραγματοποιήθηκε μια τροποποίηση

της μεθόδου, που βασίζεται προ-ενίσχυση (pre-amplification) των επιθυμητών αλληλουχιών λόγω των χαμηλών επιπέδων έκφρασης που παρατηρήθηκαν. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα στάδιο προ-ενίσχυσης με συμβατική PCR 15 κύκλων πριν το κάθε δείγμα χρησιμοποιηθεί στην ποσοτική PCR. Το μίγμα των αντιδράσεων προ-ενίσχυσης αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (67 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20), 0,20 mM από κάθε dNTP, 1,50 mM MgCl₂, 1 μM από κάθε εκκινητή (*KLK15* F5 και *KLK15* R5), 1,25 U Taq DNA polymerase-recombinant, 100 ng cDNA και DEPC-H₂O σε τελικό όγκο 50 μL. Το στάδιο της αρχικής αποδιάταξης πραγματοποιείται στους 95 °C για 2 min για να ακολουθήσουν στην συνέχεια 15 θερμοκρασιακοί κύκλοι, οι οποίοι ξεκινούν με το στάδιο της αποδιάταξης στους 95 °C για 30 sec, ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης στους 60 °C για 30 sec και ολοκληρώνονται με το στάδιο της επέκτασης στους 72 °C για 1 min. Το στάδιο της τελικής επέκτασης πραγματοποιείται στους 72 °C για 5 min. Για τη διασφάλιση του ελέγχου ποιότητας του απαιτούμενου αυτού σταδίου, περιλαμβάνεται σε κάθε σειρά αντιδράσεων συμβατικής PCR cDNA από την κυτταρική σειρά προστάτη LNCaP (θετικός μάρτυρας), καθώς και δείγμα αρνητικού ελέγχου. Τα δείγματα αυτά ελέγχονται με αντιδράσεις qPCR.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο είναι κοινό και για τους τρεις τύπους αντιδράσεων qPCR (ανίχνευση των μεταγράφων των γονιδίων *KLK13*, *KLK15* και *HPRT1*) και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: 95°C – 10min (αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης του ενζύμου AmpliTaq Gold), 40 κύκλοι: 95°C – 15 sec (στάδιο αποδιάταξης), 60 °C – 1 min (στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών και των ανιχνευτών, επιμήκυνσης και καταγραφής του εκπεμπόμενου φθορισμού).

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνονται εκτός από τα άγνωστα δείγματα και μια σειρά προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης τα οποία καλύπτουν τουλάχιστον 4 τάξεις μεγέθους, καθώς και δείγματα αρνητικού ελέγχου.

2.9.4 Αντίδραση qPCR για το miR-224 και το SNORD48 (RNU48)

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών των αντιδράσεων qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μορίων miR-224 και SNORD48 δοκιμάστηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων εκκινητών (50 – 350 nM).

Η βελτιστοποιημένη αντίδραση περιλαμβάνει σε κάθε περίπτωση 5,0 μL qPCR Master Mix Kapa SYBR 2× (Kapa Biosystems, Inc), 0,2 μL χρωστικής αναφοράς Rox (rhodamine-X,

ROX azide, 5- isomer) Low 50×, τους εκάστοτε εκκινητές σε συγκέντρωση 200 nM, 1,0 ng cDNA και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10 µL.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια: 95°C – 3 min ως αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης της Taq πολυμεράσης και 40 κύκλους των: 95°C – 15 sec (στάδιο αποδιάταξης) και 59°C – 1 min (στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών, επιμήκυνσης και καταγραφής του εκπεμπόμενου φθορισμού). Μετά από κάθε αντίδραση qPCR ακολουθεί η ανάλυση ειδικότητας των προϊόντων μέσω παραγωγής καμπυλών τήξης με βάση το παρακάτω θερμοκρασιακό πρωτόκολλο: σταδιακή ανύψωση θερμοκρασίας από 59°C έως 95°C με ρυθμό 0,1°C/sec και παράλληλη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού για κάθε 0,3 °C ανύψωσης.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται τουλάχιστον εις διπλούν. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνονται εκτός από τα άγνωστα δείγματα και ένα δείγμα βαθμονομητής (cDNA από την κυτταρική σειρά LNCaP) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών σειρών αντιδράσεων, καθώς και δείγματα αρνητικού ελέγχου.

2.9.5 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR για τα γονίδια *KLK13* και *KLK15* με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης μέσω της χρήσης προτύπων καμπυλών

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των κλασικών μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της απόλυτης ποσοτικοποίησης. Η γενική αρχή της μεθόδου είναι η αντιστοίχιση του σήματος φθορισμού που καταγράφεται με τη μορφή του Ct σε αριθμό αντιγράφων μέσω της χρήσης προτύπων καμπυλών. Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάζονται μέσω της ενίσχυσης διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης αντιγράφων των υπό μελέτη γονιδίων σε κάθε σειρά αντιδράσεων. Έτσι η μέση τιμή Ct για κάθε δείγμα αντιστοιχίζεται σε αριθμό αντιγράφων με την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη. Η διαδικασία κατασκευής της πρότυπης καμπύλης και του υπολογισμού του αριθμού των μεταγράφων στα άγνωστα δείγματα πραγματοποιείται αυτόματα μέσω του ειδικού λογισμικού SDS 1.2.3 [210, 223]. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι για κάθε σειρά αντιδράσεων συνεκτιμάται η εκάστοτε απόδοση της αντίδρασης, με αποτέλεσμα τον ακριβέστερο αριθμό των αντιγράφων.

Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται ο αριθμός των αντιγράφων για τα μετάγραφα των γονιδίων στόχων (*KLK13* και *KLK15*) και για το γονίδιο αναφοράς (*HPRT1*) στα άγνωστα δείγματα. Στη συνέχεια, για κάθε δείγμα διαιρείται ο αριθμός των αντιγράφων για τα μετάγραφα

του γονιδίου στόχου με τον αριθμό των μεταγραφών του γονιδίου αναφοράς [210, 223]. Η τιμή που προκύπτει αποτελεί την κανονικοποιημένη έκφραση του εκάστοτε γονιδίου στόχου και χρησιμοποιείται περεταίρω στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2.9.6 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR για το miR-224 με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της σύγκρισης των Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Για την ανάλυση της έκφρασης του miR-224 επιλέχθηκε η προσέγγιση της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω της μέθοδο σύγκρισης των Ct (Comparative Ct method, $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι το μόριο στόχος (το miR-224 στη συγκεκριμένη περίπτωση) και το μόριο αναφοράς (το SNORD48 εν προκειμένω) προσδιορίζονται, παράλληλα, στην ίδια σειρά αντιδράσεων. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής είναι η ενίσχυση των δύο αυτών μορίων με παρόμοιες αποδόσεις αντίδρασης. Επιπρόσθετα, επιβάλλεται σε κάθε σειρά αντιδράσεων η παρουσία ενός δείγματος βαθμονομητή, η έκφραση του οποίου χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της τιμής του Ct κάθε δείγματος ούτως ώστε να διορθώνονται οι διαφορές που μπορεί να οφείλονται στα επίπεδα φθορισμού-θορύβου που μπορούν να μεταβάλουν τον ορισμό του φθορισμού κατωφλίου, ή/και στις αποδόσεις της ενίσχυσης, μεταξύ διαφορετικών σειρών αντιδράσεων [219, 221].

Για κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένου του βαθμονομητή, υπολογίζεται η τιμή $\Delta Ct = Ct(miR-224) - Ct(SNORD48)$. Με τον τρόπο αυτό, κανονικοποιείται η έκφραση του miR-224 με αυτή του SNORD48 σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, υπολογίζεται, για κάθε δείγμα, η τιμή $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{δείγματος}) - \Delta Ct(\text{βαθμονομητή})$, και τελικά η μεταβλητή που ονομάζεται Σχετικές Μονάδες Ποσοτικοποίησης (Relative Quantification Units, RQ) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, η οποία και χρησιμοποιείται περεταίρω στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επομένως, για κάθε δείγμα πραγματοποιείται κανονικοποίηση της έκφρασης του miR-224 ως προς την έκφραση του μορίου αναφοράς και ως προς το βαθμονομητή, με αποτέλεσμα την ακριβέστερη ανάλυση των αποτελεσμάτων [219-221].

2.10 Στύπωση Western και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης KLK13

2.10.1 Απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από δείγματα ιστών προστάτη. Φωτομετρική ανάλυση και ηλεκτροφόρηση της ολικής πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η οργανική φάση που απομένει μετά τη διαδικασία ομογενοποίησης των δειγμάτων ιστού προστάτη και απομόνωσης ολικού RNA από αυτά μέσω του αντιδραστηρίου TRI (παράγραφος 2.4.2) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση ολικής πρωτεΐνης [206].

Αρχικά λαμβάνονται 300 μL από την οργανική φάση και αναμιγνύονται σχολαστικά με 900 μL ακετόνης σε ένα φιαλίδιο τύπου Eppendorf των 2,0 mL. Το μίγμα επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί η φυγοκέντρωση του σε $12.000 \times g$ για 10 min στους 4°C . Το υπερκείμενο απορρίπτεται, προστίθενται στο εναπομείναν ίζημα 500 μL διαλύματος που περιέχει 0,3 M υδροχλωρικής γουανιδίνης σε διάλυμα 95% αιθανόλης και 2,5 % γλυκερόλης (v/v) και ακολουθεί ανάδευση με σκοπό το διασκορπισμό του ιζήματος στο διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθενται επιπλέον 500 μL του προαναφερθέντος διαλύματος, το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε $8.000 \times g$ για 5 min στους 4°C . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η προαναφερθείσα διαδικασία πλύσης του ιζήματος των πρωτεϊνών επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια, προστίθεται στο εναπομείναν ίζημα 1,0 mL διαλύματος 2,5% (v/v) γλυκερόλης σε αιθανόλη, ακολουθεί επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση σε $8.000 \times g$ για 5 min στους 4°C . Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 300 μL διαλύματος SDS 1% (w/v), και ακολουθεί σχολαστική ανάδευση με σκοπό τη διαλυτοποίηση του ιζήματος.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford, η οποία εκμεταλλεύεται την ιδιότητα των πρωτεϊνών να αντιδρούν υπό όξινες συνθήκες με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων κυανού χρώματος που χαρακτηρίζονται από μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Το διάλυμα της χρωστικής Bradford αποτελείται από 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Applichem, GmbH), 4,7% (v/v) αιθανόλη και 8,5% (v/v) ορθοφωσφορικό οξύ. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των αγνώστων δειγμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιώντας μια σειρά διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης απομονωμένης από βόειο ορό (Bovine Serum Albumin, BSA).

2.10.2 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης KLK13

Σκοπός της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ένα ευρέως διαδεδομένο αποδιατακτικό μέσο, το SDS. Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες στην πρωτοταγή τους δομή και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο το οποίο είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους. Αυτό επιτρέπει στα μόρια των πρωτεϊνών να κινηθούν προς το θετικό πόλο κατά την ηλεκτροφόρηση και να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Επίσης, χρησιμοποιείται η β-μερκαπτοαιθανόλη, με σκοπό την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών [226].

Τα δείγματα των πρωτεϊνών προς ηλεκτροφόρηση προετοιμάζονται για τη φόρτωση στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου ως εξής: σε κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε 50 μg ολικής πρωτεΐνης, προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης με σκοπό της επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 50 mM Tris-HCl, pH = 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, και 0,01% (v/v) χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης. Στη συνέχεια ακολουθεί θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 5 min. Παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα, τοποθετείται στο πήκτωμα και το μείγμα που αποτελείται από πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών (μυοσίνη-250 kDa, φωσφορυλάση-148 kDa, BSA- 98 kDa, γλουταμινική αφυδρογονάση- 64 kDa, αλκοολική αφυδρογονάση- 50 kDa, καρβονική ανυδράση- 36 kDa, μυογλοβίνη- 22 kDa, λυσοζύμη 16 kDa, απροτινίνη- 6 kDa, ινσουλίνη, αλυσίδα B - 4 kDa) SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Inc.). Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου επιστοίβαξης (stacking gel) αποτελείται από 5% πολυακρυλαμίδιο σε διάλυμα 0,125 M Tris-HCl, pH = 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) υπερθεϊκό αμμώνιο (APS) και 0,1% (v/v) τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) αποτελείται από 12% πολυακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-HCl, pH = 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/w) υπερθεϊκό αμμώνιο και 0,04% (v/v) τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνουν την εφαρμογή τάσης 150V, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h στη συσκευή Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, Inc), ακολουθώντας τη μέθοδο Laemmli [226].

Αμέσως μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, ακολουθεί η ηλεκτροφορητική μεταφορά τους από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης [227]. Η τεχνική ηλεκτροφορητικής μεταφοράς που επιλέχθηκε είναι η ημίξηρη

μεταφορά (semi-dry transfer) με τη χρήση της συσκευής Trans-Blot SD (Bio-Rad, Inc.). Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει ως αρχικό στάδιο τη μεταφορά και την εμφάνιση για 10 min του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, έξι φίλτρων χρωματογραφίας τύπου Whatman και ενός φύλλου νιτροκυτταρίνης, όλα κομμένα στις διαστάσεις του πηκτώματος, στο διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών (48 mM Tris-HCl, pH=9,2, 39 mM γλυκίνη, 20% v/v μεθανόλη, 3,75% w/v SDS). Στη συνέχεια, τρία φίλτρα τύπου Whatman τοποθετούνται στη συσκευή ημίξηρης μεταφοράς στο μέρος της μεταλλικής ανόδου, πάνω από αυτά τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, στη συνέχεια τοποθετείται το πηκτωμα πολυακρυλαμιδίου, και στο τέλος προστίθενται τρία φύλλα τύπου Whatman. Ακολούθως, τοποθετείται η πλάκα της καθόδου και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή σταθερής τάσης 10 V για 45 min. Στη συνέχεια η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφαιρείται και εμβαπτίζεται για 3 min σε διάλυμα γενικής χρώσης πρωτεϊνών με σκοπό τη διαπίστωση της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πηκτωμα πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το διάλυμα χρώσης αποτελείται από 0,2% w/v χρωστική Ponceau S, 35% v/v τριχλωροξικό οξύ. Ακολουθεί αφαίρεση της χρωστικής και πλύσεις της μεμβράνης με απεσταγμένο νερό μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο αποχρωματισμός της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης μέσω πλύσεων με διάλυμα TNT (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% v/v Tween-20).

Μετά τον αποχρωματισμό της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης από τη χρωστική Ponceau S, ακολουθεί η μεταφορά της σε διάλυμα κορεσμού αποτελούμενο από 5% w/v γάλακτος σε σκόνη (Régilait) σε διάλυμα TNT όπου και παραμένει για 12 h υπό ελαφρά ανάδευση. Η διαδικασία αυτή (blocking procedure) πραγματοποιείται για να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, απορρίπτεται το διάλυμα κορεσμού και προστίθεται το διάλυμα του πρώτου αντισώματος (1:2.000 v/v αντίσωμα anti-KLK13 σε διάλυμα κορεσμού) το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 6 ώρες για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος. Ακολούθως, απορρίπτεται το διάλυμα του πρώτου αντισώματος και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται πλέον σε διάλυμα πλύσεων TNT υπό ανάδευση, επί 3 φορές για 10 min κάθε φορά, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση αδέσμευτων μορίων του πρώτου αντισώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος (1:20.000 v/v σε διάλυμα κορεσμού) και παραμένει υπό ανάδευση για 1 h. Τα μόρια του δεύτερου αντισώματος, είναι συνδεδεμένα ομοιοπολικά με το ένζυμο αλκαλική

φωσφατάση (alkaline phosphatase, ALP). Ακολούθως, το διάλυμα δεύτερου αντισώματος απομακρύνεται και η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα πλύσεων TNT υπό ανάδευση για 10 min επί 3 φορές, προκειμένου να απομακρυνθεί τα αδέσμευτα μόρια του δεύτερου αντισώματος. Στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο διάλυμα της αντίδρασης της αλκαλικής φωσφατάσης (100 mM Tris-HCl, pH = 9,5, 100 mM NaCl, 5,0 mM MgCl₂) υπό ανάδευση, για 30 min. Έπειτα, προστίθεται το διάλυμα που περιέχει τα απαραίτητα υποστρώματα για την αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης, δηλαδή 0,033% w/v NBT (Nitro Blue Tetrazolium chloride) και 0,017% w/v BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt, X-Phos p-toluidine salt, X-Phos-pT) (Applichem, Inc), σε διάλυμα αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης και αφήνεται έως ότου εμφανισθεί η έγχρωμη ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη KLK13. Η αντίδραση διακόπτεται με την εμβάπτιση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε απεσταγμένο νερό.

2.11 Βιοστατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη βιοστατιστική ανάλυση για την εύρεση στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης τόσο των μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*, όσο και του miR-224 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του προστάτη αλλά και με την επιβίωση ελεύθερας νόσου με σκοπό την αξιολόγησή των υπο μελέτη μορίων ως νέους δείκτες πρόγνωσης της πορείας της νόσου. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η διαφοροδιαγνωστική αξία των υπό μελέτη μορίων όσον αφορά την ικανότητα διάκρισης μεταξύ ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία και ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 (IBM, Inc). και PASW (Predictive Analytics SoftWare) v.20.0 (IBM, Inc).

2.11.1 Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στις διάφορες ομάδες ασθενών. Συσχετίσεις με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Τα επίπεδα έκφρασης τόσο των μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*, όσο και του miR-224 δεν παρουσίασαν κανονική κατανομή, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, μεταξύ των κατηγοριών των ασθενών που μελετήθηκαν. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μη-παραμετρικές βιοστατιστικές δοκιμασίες για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Οι μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη συγκεκριμένης κατανομής στις υπό

μελέτη μεταβλητές και για το λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες σε μελέτες που αφορούν τη μέτρηση βιομορίων σε πληθυσμούς βιολογικών δειγμάτων [228, 229]. Σε κάθε περίπτωση, οι διαφορές που ανιχνεύθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας $p \text{ value} < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

Οι διαφορές στην κατανομή των μεταβλητών που αφορούν στην έκφραση των μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*, καθώς και του miR-224 μεταξύ των ομάδων των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία και των ασθενών με καρκίνο του προστάτη μελετήθηκαν μέσω της στατιστικής δοκιμασίας Mann-Whitney U test [228, 229].

Η στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U test χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη των διαφορών στην κατανομή των επιπέδων των υπό μελέτη βιομορίων μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του προστάτη πρώιμου παθολογοανατομικού σταδίου ($< pT2c$) και ασθενών με προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο ($\geq pT2c$).

Η στατιστική δοκιμασία Kruskal–Wallis test [228] χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των διαφορών στην κατανομή της έκφρασης των μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*, καθώς και του miR-224 μεταξύ ομάδων ασθενών με καρκίνο του προστάτη με διαφορετικά Gleason scores (≤ 6 , 7 , >7).

Οι συσχετίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών, όπως για παράδειγμα μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε προσδιοριζόμενου μορίου και της ηλικίας ή των επιπέδων PSA των ασθενών, πραγματοποιήθηκαν μέσω της στατιστικής δοκιμασίας Spearman correlation coefficient. Όπου κρίθηκε αναγκαίο, οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στην έκφραση των υπό μελέτη μορίων διχοτομήθηκαν με βάση τη διάμεσο τιμή, με σκοπό τη μελέτη των συχνοτήτων έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των ασθενών, μέσω των στατιστικών δοκιμασιών Fisher's Exact Test και χ^2 (Chi-square test) [228].

2.11.2 Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής αξίας των υπό μελέτη γονιδίων στον καρκίνο του προστάτη

Η αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής αξίας των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων *KLK13*, *KLK15* και του miR-224 όσον αφορά την ικανότητα αποτελεσματικής διάκρισης των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία και των ασθενών με καρκίνο του προστάτη πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης και με την ανάλυση των καμπυλών ευαισθησίας-ειδικότητας ROC [230].

Η λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε τόσο σε μονομεταβλητό επίπεδο όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο ανάλυσης. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων προσαρμόστηκαν στη χρήση των μεταβλητών της συγκέντρωσης του PSA στον ορό, της ηλικίας των ασθενών και του αποτελέσματος της εξέτασης DRE [231, 232].

Η κατασκευή των καμπυλών ευαισθησίας-ειδικότητας ROC πραγματοποιήθηκε με την γραφική απεικόνιση των τιμών της ευαισθησίας στον κατακόρυφο άξονα έναντι της διαφοράς (1-ειδικότητα) για τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under Curve, AUC), μέγεθος που απεικονίζει τη διαφοροδιαγνωστική αξία της υπό μελέτης μεταβλητής, αναλύθηκε μέσω της μεθόδου των Hanley και McNeil [230].

Επιπρόσθετα, κατασκευάστηκαν νέες συνδυαστικές μεταβλητές μέσω κατάλληλων μοντέλων πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης [231, 232], με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής βελτίωσης της διαφοροδιαγνωστικής αξίας του PSA μέσω του παράλληλου προσδιορισμού του μαζί με τα υπό μελέτη μόρια.

2.11.3 Ανάλυση επιβίωσης ελεύθερας νόσου: Καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox

Η περιγραφή της πορείας της ασθένειας στο χρόνο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για τον υπολογισμό της πρόγνωσης της νόσου. Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier αποτελεί μια αξιόπιστη προσέγγιση για τον υπολογισμό της πιθανότητας επιβίωσης ασθενών που λαμβάνουν συγκεκριμένη θεραπεία από το χρονικό σημείο λήψης της θεραπείας μέχρι ενός ορισμένου χρονικού διαστήματος παρακολούθησης. Η ανάλυση επιβίωσης πήρε το όνομα της από τους ερευνητές Edward L. Kaplan και Paul Meier. Για την κατασκευή καμπυλών επιβίωσης κατά Kaplan-Meier θα πρέπει να παρακολουθηθούν οι συμμετέχοντες σε μια μελέτη ξεκινώντας από ένα αρχικό σημείο που στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν η ριζική προστατεκτομή των ασθενών με καρκίνο του προστάτη, μέχρι την παρουσίαση του καταληκτικού γεγονότος (endpoint) που εν προκειμένω ήταν η εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής. Συνήθως η μελέτη τερματίζεται πριν εμφάνιση του καταληκτικού γεγονότος σε όλους τους ασθενείς. Για όλες αυτές τις περιπτώσεις (censored cases) καταγράφεται το τελευταίο χρονικό διάστημα στο οποίο δεν έχει παρουσιαστεί υποτροπή και η πληροφορία αυτή συνεκτιμάται στην ανάλυση επιβίωσης [228, 233, 234]. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η πορεία επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με τη μέθοδο Kaplan-Meier για τους ασθενείς με καρκίνο του

προστάτη που προσδιορίστηκαν ως θετικοί για την έκφραση των μεταγράφων *KLK13*, *KLK15* ή του *miR-224*, σε σχέση με τους αντίστοιχους ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικοί για την έκφραση του εκάστοτε μορίου. Η κατηγοριοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη διάμεσο τιμή της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων με την πορεία επιβίωσης των ασθενών και αξιολογήθηκαν ως δείκτες ευμενούς ή δυσμενούς πρόγνωσης. Για την εκτίμηση των διαφορών στις καμπύλες επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος log-rank [228, 229, 233, 234].

Ενώ η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση καμπυλών επιβίωσης ενός παράγοντα με βάση τον οποίο οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε δύο ή περισσότερες ομάδες (π.χ. θετικοί ως προς την έκφραση ενός γονιδίου σε σχέση με τους αρνητικούς ως προς την έκφραση του εν λόγω γονιδίου), η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασης πολλαπλών παραγόντων στην επιβίωση των ασθενών. Η πιθανότητα παρουσίασης του καταληκτικού γεγονότος ονομάζεται κίνδυνος (hazard). Το μοντέλο υπολογισμού του κινδύνου είναι το παρακάτω:

$$H(t) = H_0(t) \times \exp(b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + \dots + b_k X_k)$$

όπου $X_1 \dots X_k$ είναι το σύνολο των μελετώμενων προγνωστικών παραγόντων και $H_0(t)$ είναι ο κίνδυνος αναφοράς (baseline hazard) τη χρονική στιγμή t και αντιπροσωπεύει τον κίνδυνο εμφάνισης του γεγονότος για ένα άτομο που παρουσιάζει την τιμή 0 για όλους τους προγνωστικούς παράγοντες. Διαιρώντας τα δύο μέλη της παραπάνω εξίσωσης και λογαριθμώντας εξάγεται η παρακάτω εξίσωση:

$$\ln\left(\frac{H(t)}{H_0(t)}\right) = b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + \dots + b_k X_k$$

Το πηλίκο $H(t) / H_0(t)$ ονομάζεται αναλογία κινδύνου (Hazard Ratio, HR). Οι συντελεστές $b_1 \dots b_k$ υπολογίζονται και μεταφράζονται στην ανάλυση λογιστική παλινδρόμησης Cox regression με παρόμοιο τρόπο όπως σε ένα κοινό μοντέλο πολυμεταβλητής παλινδρόμησης. Στην περίπτωση που ο προγνωστικός παράγοντας είναι μια διχότομη μεταβλητή, που λαμβάνει την τιμή 1 για την παρουσία του εν λόγω παράγοντα και 0 για την απουσία του, τότε η ποσότητα $\exp(b_i)$ μπορεί να μεταφραστεί ως ο στιγμιαίος σχετικός κίνδυνος εμφάνισης του καταληκτικού

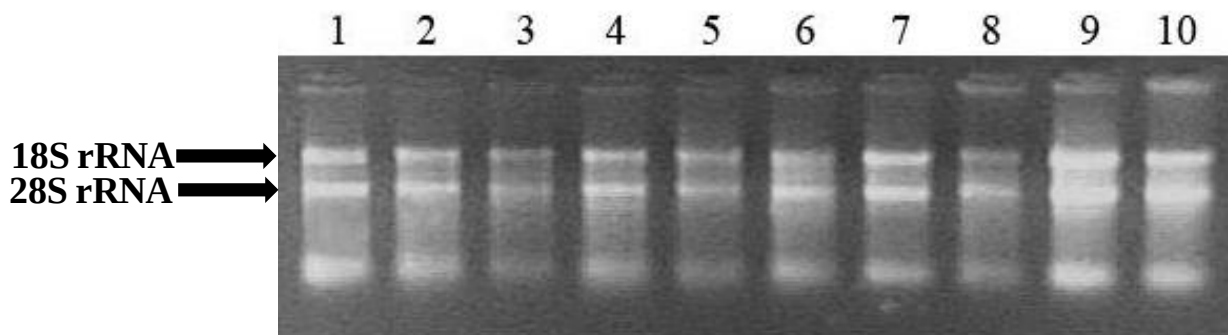
γεγονότος, σε οποιοδήποτε χρονικό διάστημα, για ένα άτομο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία του προγνωστικού παράγοντα (π.χ. θετικό για την έκφραση ενός γονιδίου) σε σχέση με ένα άτομο που χαρακτηρίζεται από την απουσία αυτού του παράγοντα (π.χ. αρνητικό για την έκφραση ενός γονιδίου). Στην περίπτωση που ο προγνωστικός παράγοντας είναι μια συνεχής μεταβλητή, η ποσότητα $\exp(b_i)$ αντιπροσωπεύει το στιγμιαίο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης του καταληκτικού γεγονότος, οποιαδήποτε χρονική στιγμή, για ένα άτομο που παρουσιάζει αύξηση μιας μονάδας του μετρούμενου προγνωστικού παράγοντα σε σχέση με ένα άλλο άτομο. Δηλαδή, η τιμή $\exp(b_i)$ μεταφράζεται ως η αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης του καταληκτικού γεγονότος για κάθε μονάδα αύξησης στα επίπεδα του υπό μελέτη προγνωστικού παράγοντα [231-234].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή κατασκευάστηκαν μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης για την ανάλυση επιβίωσης κατά Cox τόσο σε μονομεταβλητό επίπεδο όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων *KLK13*, *KLK15* και του miR-224 προσαρμόστηκαν στη χρήση σημαντικών προγνωστικών μεταβλητών όπως του Gleason score, του παθολογοανατομικού σταδίου της νόσου, των προεγχειρητικών επιπέδων PSA, κ.α. με σκοπό τη εκτίμηση της πιθανής ανεξάρτητης προγνωστικής αξίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος ποιότητας του ολικού RNA που απομονώθηκε από δείγματα ιστού προστάτη και από καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη

Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση μάζας 30 – 100 mg δειγμάτων από ιστό προστάτη ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία ή καρκίνο του προστάτη, καθώς και δειγμάτων από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3, DU145 (10^6 κύτταρα συνολικά / δείγμα). Απομονώθηκε ολικό RNA από τα παραπάνω δείγματα και η συγκέντρωση του προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Ο φασματοφωτομετρικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε και για την εκτίμηση του λόγου των απορροφήσεων του διαλύματος του ολικού RNA στα 260 nm και 280 nm ($\lambda = A_{260}/A_{280}$), με σκοπό την εκτίμηση της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία παρουσίασαν τιμές λόγου απορροφήσεων $\lambda = 1,70 - 1,90$, επομένως ενέπιπταν μέσα στα αποδεκτά όρια, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπήρχαν επιμολύνσεις του ολικού RNA από γενωμικό DNA ή πρωτεΐνες. Στη συνέχεια 1 – 2 μ g ολικού RNA, αναλόγως με την ποσότητα που ήταν διαθέσιμη από τη διαδικασία της απομόνωσης, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1,5 % (w/v) αγαρόζης, με σκοπό την εκτίμηση της ακεραιότητάς του. Μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν ενδείξεις αποικοδόμησης, καθώς σε κάθε περίπτωση παρουσιάστηκαν ευδιάκριτες ζώνες που αντιστοιχούν στα μόρια του ριβοσωμικού RNA 18S και 28S (Εικόνα 3.1), χωρίς να ανιχνεύονται μη αναμενόμενες ζώνες από προϊόντα αποικοδόμησης. Η παρουσία ευδιάκριτων ζωνών 28S και 18S ριβοσωμικού RNA αποτελεί απόδειξη της επιτυχούς απομόνωσης ολικού RNA καλής ποιότητας, γεγονός που καθιστά εφικτή τη χρησιμοποίηση αυτών των δειγμάτων για τις περεταίρω διαδικασίες ανάλυσης έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.



Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA (1-2 μ g) από 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα ιστού προστάτη (1-10) σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5 % w/v).

3.2 Μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* σε δείγματα ιστού προστάτη και καρκινικές σειρές προστάτη μέσω συμβατικής PCR

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA ακολούθησε σύνθεση του cDNA μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής των μορίων mRNA.

Με σκοπό την αρχική μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* σε δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και ασθενείς με καρκίνο προστάτη, καθώς και στις καρκινικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3 και DU145, σχεδιάστηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και εκτελέστηκαν πρωτόκολλα συμβατικής PCR. Με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατός ο ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε ένα υποσύνολο των δειγμάτων της παρούσας μελέτης, ούτως ώστε αφενός να κατασκευαστεί ένα αρχικό προφίλ έκφρασης των γονιδίων σε ιστούς και καρκινικές σειρές προστάτη, και αφετέρου να αναγνωριστούν τα μετάγραφα των γονιδίων που παρουσιάζουν τις σημαντικότερες μεταβολές μεταξύ του καρκίνου του προστάτη και καλοηθών όγκων και τα οποία αξιολογούνται, επομένως, ως κατάλληλα για μια περισσότερο διεξοδική ανάλυση μέσω ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, στο σύνολο των δειγμάτων.

3.2.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της συμβατικής PCR για την ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*, καθώς και των γονιδίων στόχων *KLK13* και *KLK15*

Μετά το σχεδιασμό και τη σύνθεση ειδικών ζευγών εκκινητών ειδικών για κάθε επιθυμητή αλληλουχία, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.7.2,

πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της συμβατικής PCR για την ενίσχυση των cDNAs των γονιδίων *GAPDH*, *HPRT1*, *KLK13* και *KLK15*.

Συγκεκριμένα, για κάθε πρωτόκολλο συμβατικής PCR δοκιμάστηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών (58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C και 62 °C) και διαφορετικές συγκεντρώσεις MgCl₂ (1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 3,0 mM και 3,5 mM), σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς, με σκοπό την εύρεση των συνθηκών που οδηγούν σε ειδική ενίσχυση των επιθυμητών προϊόντων με τη βέλτιστη απόδοση. Το αποτέλεσμα ήταν η επιλογή των συνθηκών που περιγράφονται στις παραγράφους 2.7.3 – 2.7.5.

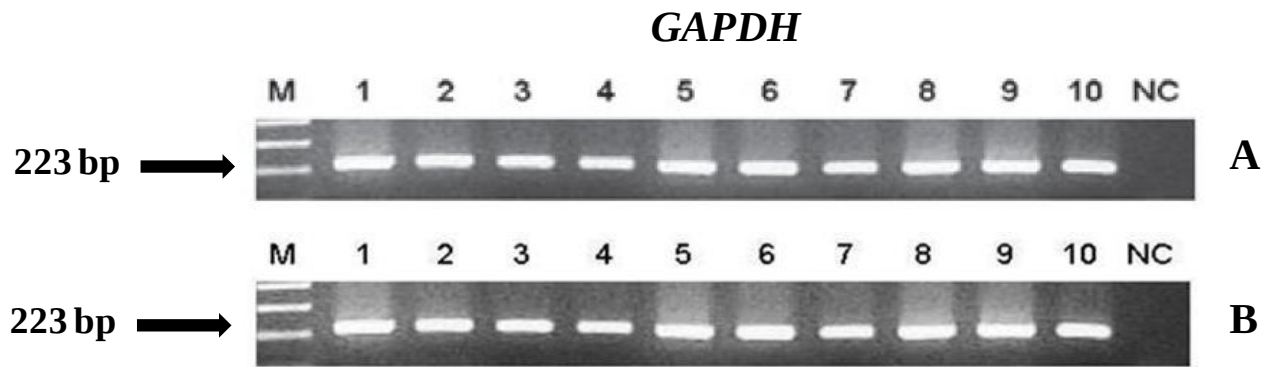
3.2.2 Έλεγχος της έκφρασης mRNA των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*

Πριν πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων στόχων στα υπό μελέτη δείγματα, κρίθηκε απαραίτητος ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1*. Τα προαναφερθέντα γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες έκφρασης mRNA σε ιστούς προστάτη, καθώς η έκφραση τους θεωρείται ότι παραμένει αμετάβλητη σε παθολογικές καταστάσεις του αδένα. Ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς, *GAPDH* και *HPRT1*, εξυπηρετεί τους παρακάτω σκοπούς:

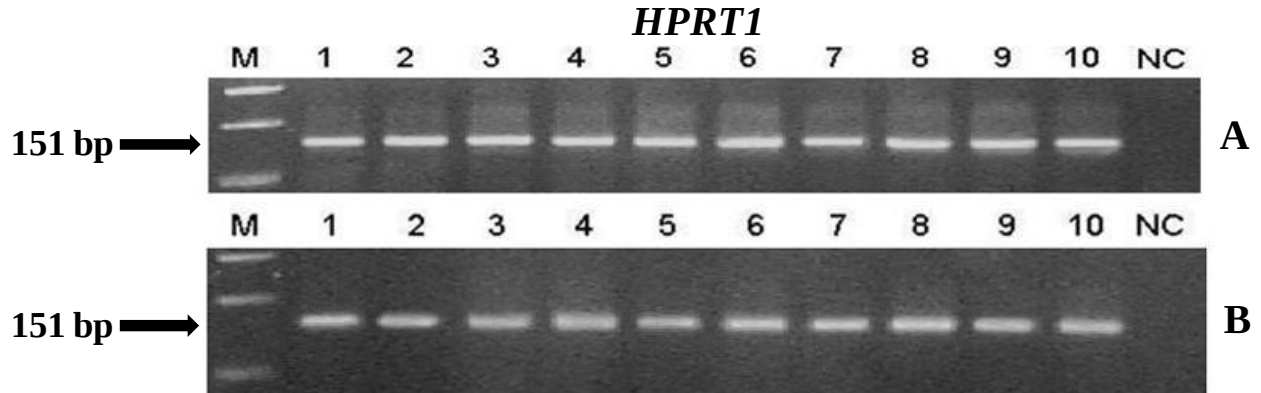
- i) Επιβεβαιώνεται η επιτυχής απομόνωση του ολικού RNA και η επιτυχής σύνθεση του cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής.
- ii) Διερευνάται αν υπάρχουν μεταβολές, μικρής έκτασης, στην έκφραση των γονιδίων αναφοράς μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, με σκοπό την συνεκτίμηση αυτών των διαφορών στην κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπως άλλωστε αναμένονταν, η έκφραση των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* παρουσιάστηκε αμετάβλητη μεταξύ των καρκινικών και των καλοηθών όγκων του προστάτη, καθώς και μεταξύ δειγμάτων που προήλθαν από ασθενείς με διαφορετικά στάδια προστατικού καρκίνου. Στις Εικόνες 3.2 και 3.3 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των γονιδίων *GAPDH* και *HPRT1*, αντίστοιχα, σε 10 τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστού από καρκίνο του προστάτη και 10 τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστού από καλοήγη προστατική υπερπλασία. Παρατηρείται η ισοσταθμισμένη έκφραση των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων ιστού προστάτη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επιπρόσθετα,

παρατηρείται ότι το γονίδιο *GAPDH* εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα σε σχέση με το γονίδιο *HPRT1* στα δείγματα ιστών προστάτη.



Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των μεταγράφων του γονιδίου *GAPDH*. Μέρος A: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (1 – 10). Μέρος B: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (1 – 10). M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).



Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3.0% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των μεταγράφων του γονιδίου *HPRT1*. Μέρος A: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (1 – 10). Μέρος B: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (1 – 10). M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

3.2.3 Μελέτη και ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου *KLK13*, σε επίπεδο mRNA, σε δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και καρκίνο του προστάτη, μέσω συμβατικής PCR

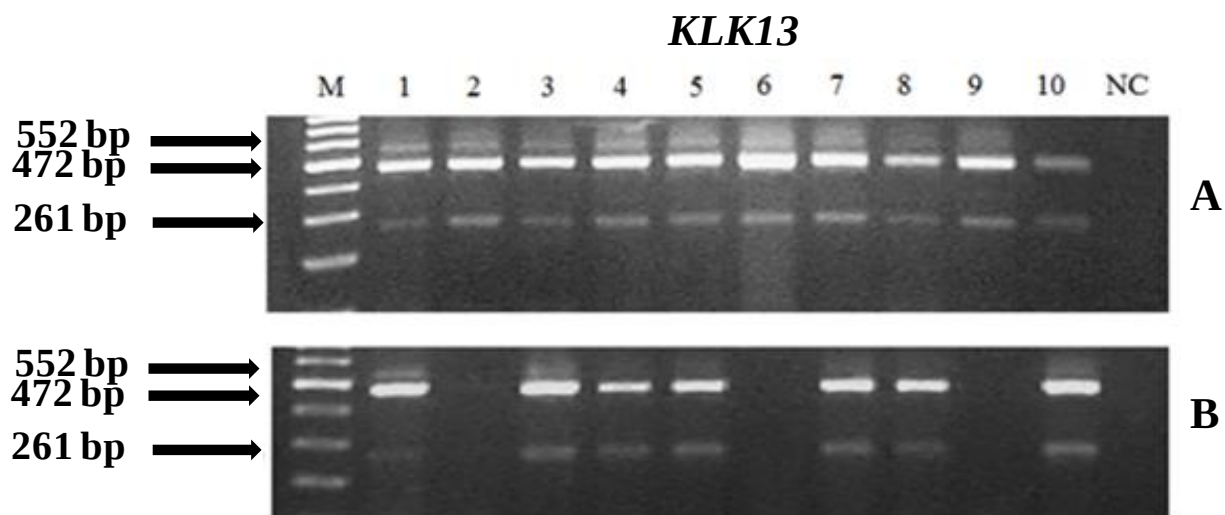
Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* μέσω συμβατικής PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών *KLK13* F1 – *KLK13* R, με τη χρήση του οποίου ενισχύονται ως διαφορετικού μήκους προϊόντα τα μόρια cDNA που αντιστοιχούν στο κλασικό μετάγραφο mRNA του γονιδίου *KLK13* και στα εναλλακτικά μεταγράφα του γονιδίου. Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των αντίστοιχων προϊόντων PCR. Απεικονίζεται η έκφραση του κλασικού μεταγράφου (ζώνη των 472 bp) και των εναλλακτικών μεταγράφων (ζώνες των 552, 261 bp) του γονιδίου *KLK13* σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (μέρος Α) και ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (μέρος Β). Αναφέρεται ότι έχει προηγηθεί έλεγχος των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* στα προαναφερθέντα δείγματα (παράγραφος 3.2.2).

Παρατηρείται ότι το κλασικό μετάγραφο του γονιδίου *KLK13* παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα και συχνότητα έκφρασης στα δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη σε σχέση με τα δείγματα ιστού που προήλθαν από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία. Αντιθέτως, η έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *KLK13* δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές.

Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK13* επιβεβαιώθηκαν κατόπιν πυκνομέτρησης των ζωνών που αντιστοιχούν στα προϊόντα PCR των υπό μελέτη γονιδίων και κανονικοποίησης με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς. Η προκαταρκτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε σύνολο 30 δειγμάτων από όγκους προστάτη (15 CaP και 15 BPH) έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK13* είναι αυξημένα κατά 53% στα δείγματα CaP σε σχέση με τα δείγματα BPH. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν έφτασε σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($p > 0,05$). Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαία η εκτενέστερη και η ακριβέστερη ανάλυση του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK13* μέσω ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο σε μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος.

Παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *KLK13* μεταξύ καρκινικών και καλοηθών όγκων, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανίχνευση της έκφρασής τους για πρώτη φορά σε ιστούς προστάτη,

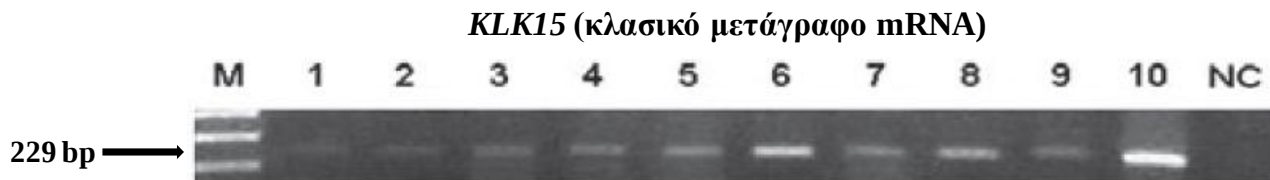
καθώς μέχρι πρότινος θεωρούνταν ότι εκφράζονταν αποκλειστικά σε φυσιολογικό ιστό όρχεως. Επίσης, παρατηρείται ότι τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *KLK13* εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το κλασικό μετάγραφο του γονιδίου, το οποίο φαίνεται να αποτελεί την κύρια mRNA ισομορφή στον προστάτη.



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1.5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των μεταγράφων του γονιδίου *KLK13*. Μέρος A: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (1 – 10). Μέρος B: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (1 – 10). M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

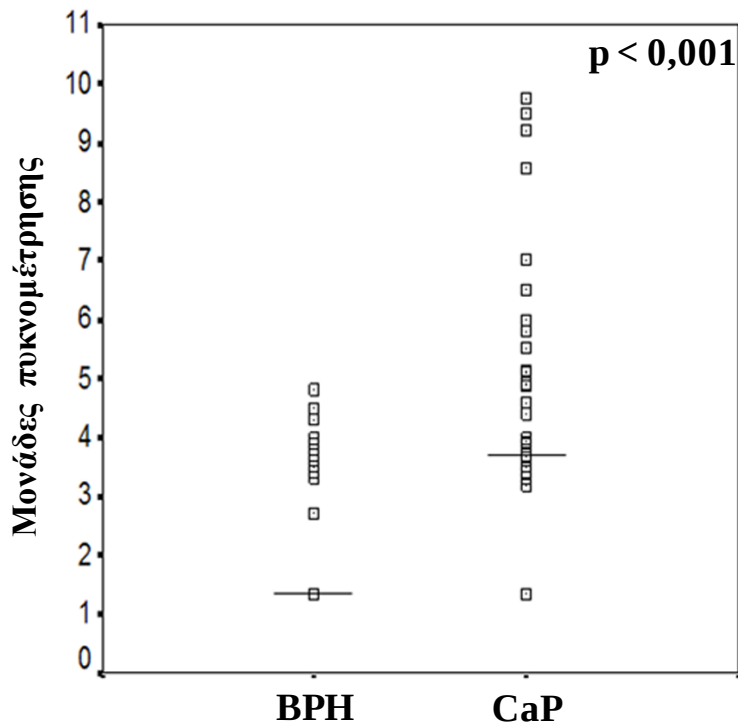
3.2.4 Μελέτη και ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου *KLK15*, σε επίπεδο mRNA, σε δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και καρκίνο του προστάτη, μέσω συμβατικής PCR.

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *KLK15*, αρχικά επιλέχθηκε να αναλυθεί το κλασικό μετάγραφο mRNA μέσω της χρήσης των εκκινητών *KLK15* F4 – *KLK15* R4. Στην Εικόνα 3.5 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των αντίστοιχων προϊόντων PCR. Απεικονίζεται η έκφραση του κλασικού μεταγράφου γονιδίου *KLK15* σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (διαδρομές 2, 4, 6, 8, 10) και ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (διαδρομές 1, 3, 5, 7, 9). Έχει προηγηθεί έλεγχος των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* στα προαναφερθέντα δείγματα (παράγραφος 3.2.2).



Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15*. Διαδρομές 1, 3, 5, 7, 9: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία Διαδρομές 2, 4, 6, 8, 10: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

Παρατηρείται μια σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία. Οι διαφορές επιβεβαιώθηκαν κατόπιν πυκνομέτρησης και κανονικοποίησης με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς. Λόγω των μεγάλων διαφορών που παρατηρήθηκαν πραγματοποιήθηκε ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA σε σύνολο 104 δειγμάτων (52 δείγματα CaP και 52 δείγματα BPH). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το κλασικό μετάγραφο mRNA του γονιδίου υπερεκφράζεται 2,8 φορές στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p < 0,001$) (Εικόνα 3.6). Πιο συγκεκριμένα, η διάμεσος τιμή των κανονικοποιημένων μονάδων πυκνομέτρησης στα δείγματα ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπολογίστηκε στις 3,75 μονάδες, ενώ στα δείγματα ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία ήταν 1,35 μονάδες.



Εικόνα 3.6 Τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* σε ασθενείς με BPH και CaP. Οι οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη διάμεσο τιμή των επιπέδων έκφρασης σε κάθε ομάδα ασθενών.

Η αξιοσημείωτη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* που περιγράφηκε προηγουμένως, οδήγησε στη μελέτη της διαφοροδιαγνωστικής του αξίας, μέσω της ανάλυσης της ευαισθησίας-ειδικότητας ROC και μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη υπολογίστηκε στο 0,74 (95%CI=0,69-0,89, $p < 0,001$), γεγονός που υποδεικνύει ότι ο προσδιορισμός της έκφρασής του συγκεκριμένου μεταγράφου μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στη διαφορική διάγνωση του καρκίνου του προστάτη από καλοήθεις όγκους του αδένα. Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης σε μονομεταβλητό επίπεδο έδειξε ότι για κάθε μονάδα αύξησης στα προσδιορισμένα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνεται κατά 1,79 φορές (95%CI = 1,34 – 2,39, $p < 0,001$). Σε επίπεδο πολυμεταβλητής ανάλυσης, μετά από διόρθωση για τις τιμές PSA και την ηλικία, η αντίστοιχη αναλογία κινδύνου ανέρχεται στο 1,96 (95%CI = 1,31– 2,95, $p = 0,001$). Επιπρόσθετα, παρουσιάστηκε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου μεταγράφου με το μέγεθος του καρκινικού όγκου ($p = 0,007$) και το βαθμό επιθετικότητας της νόσου ($p = 0,017$) (Gleason Score) (Πίνακας 3.1). Οι

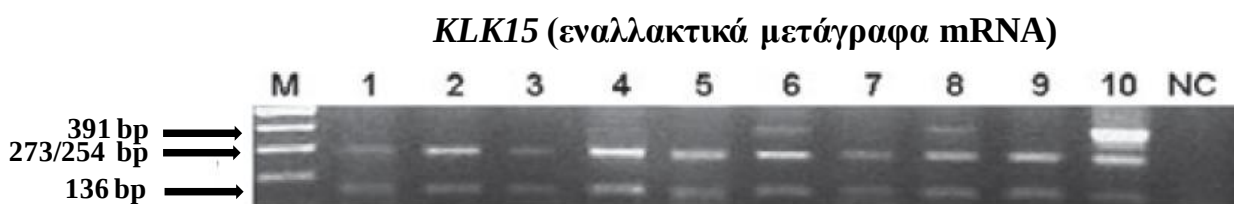
παραπάνω παρατηρήσεις κατέστησαν αναγκαία την επιβεβαίωση τους μέσω ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων καθώς και την εξακρίβωση της προγνωστικής αξίας της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK15* μέσω λεπτομερούς ανάλυσης επιβίωσης, χρησιμοποιώντας ποσοτικά δεδομένα.

Πίνακας 3.1. Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* με το στάδιο της νόσου, το βαθμό επιθετικότητας (Gleason score) και το μέγεθος των όγκων.

Μεταβλητή	Έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου <i>KLK15</i> (μονάδες πυκνομέτρησης)	Τιμή p
Στάδιο της νόσου		
pT1 / pT2	3,67	0,52
pT3 / pT4	3,80	
Μέγεθος του όγκου		
≤ 1 cm μη διηθητικός	1,35	0,007
≤ 1 cm, διηθητικός	3,90	
>1 cm, διηθητικός	3,85	
Gleason score		
≤ 6	2,27	0,017
7	3,90	
>7	4,60	

Εκτός από την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15*, πραγματοποιήθηκε και μια αντίστοιχη μελέτη των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου (εναλλακτικό μετάγραφο 1, εναλλακτικό μετάγραφο 2 και εναλλακτικό μετάγραφο 3). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινήτων *KLK15* F1 – *KLK15* R1, μέσω του οποίου ενισχύονται τα cDNAs που αντιστοιχούν τόσο στο κλασικό μετάγραφο mRNA του γονιδίου *KLK15* όσο και στα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου. Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των αντίστοιχων προϊόντων PCR. Απεικονίζεται η έκφραση του κλασικού μεταγράφου (ζώνη των 391 bp), των εναλλακτικών μεταγράφων 1 και 2 (ζώνη των 273/254 bp) και του εναλλακτικού μεταγράφου 3 (ζώνη των 136 bp) σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (διαδρομές 2, 4, 6, 8, 10) και ασθενείς με

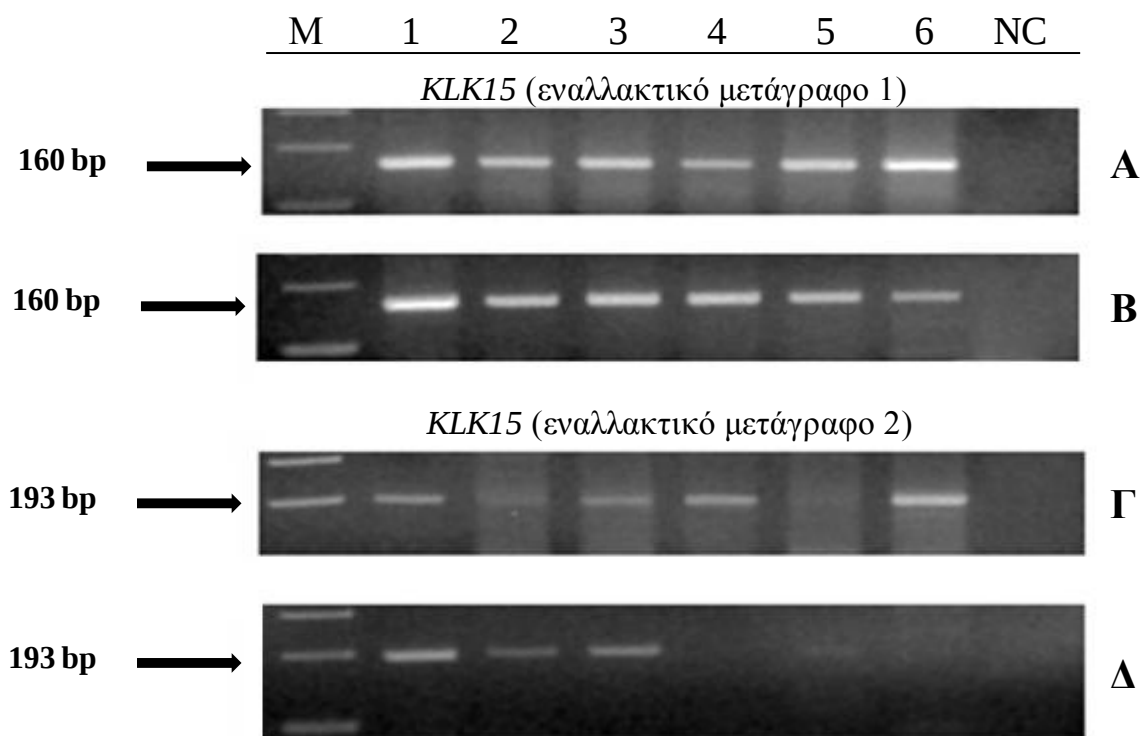
καλοήγη προστατική υπερπλασία (διαδρομές 1, 3, 5, 7, 9). Η ζώνη των 391 bp αντιστοιχεί στο κλασικό mRNA μετάγραφο. Αναφέρεται ότι έχει προηγηθεί έλεγχος των γονιδίων αναφοράς *GAPDH* και *HPRT1* στα προαναφερθέντα δείγματα (παράγραφος 3.2.2). Παρατηρείται μια περιορισμένη αυξημένη έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *KLK15*. Ωστόσο, η διαφορά που παρατηρείται δε φτάνει σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p < 0,05$). Επίσης, παρατηρείται ότι το κλασικό μετάγραφο mRNA ανιχνεύεται σε μειωμένα επίπεδα σε σχέση με αυτά των εναλλακτικών μεταγράφων (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1.5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση του συνόλου των μεταγράφων του γονιδίου *KLK15*. Διαδρομές 1, 3, 5, 7, 9: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία. Διαδρομές 2, 4, 6, 8, 10: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

Επιπρόσθετα, με σκοπό την ξεχωριστή ανάλυση των μεταγράφων 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών *KLK15* F2 – *KLK15* R2 και *KLK15* F3 – *KLK15* R3, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 3.8 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των αντίστοιχων προϊόντων PCR. Απεικονίζεται η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου 1 (ζώνη των 160 bp) σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (μέρος Α) και από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (μέρος Β). Επιπλέον, απεικονίζεται η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου 2 (ζώνη των 193 bp) σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (μέρος Γ) και από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (μέρος Δ). Παρατηρείται παρόμοια έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου 1 μεταξύ των δειγμάτων από καλοήθεις και καρκινικούς όγκους του προστάτη αδένου. Αντιθέτως, το εναλλακτικό μετάγραφο 2 φαίνεται να εκφράζεται πιο συχνά στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία. Η διαφορά αυτή στη συχνότητα έκφρασης επιβεβαιώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε πληθυσμό που αποτελούνταν από 16 δείγματα CaP και 18 δείγματα BPH. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται

έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου 2 στο 81,3% των ασθενών με καρκίνο του προστάτη σε σχέση με το 38,9% των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία ($p = 0,017$). Επιπλέον παρατηρείται ότι το εναλλακτικό μετάγραφο 1 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το εναλλακτικό μετάγραφο 2 σε δείγματα ιστού από όγκους προστάτη (Εικόνα 3.8).

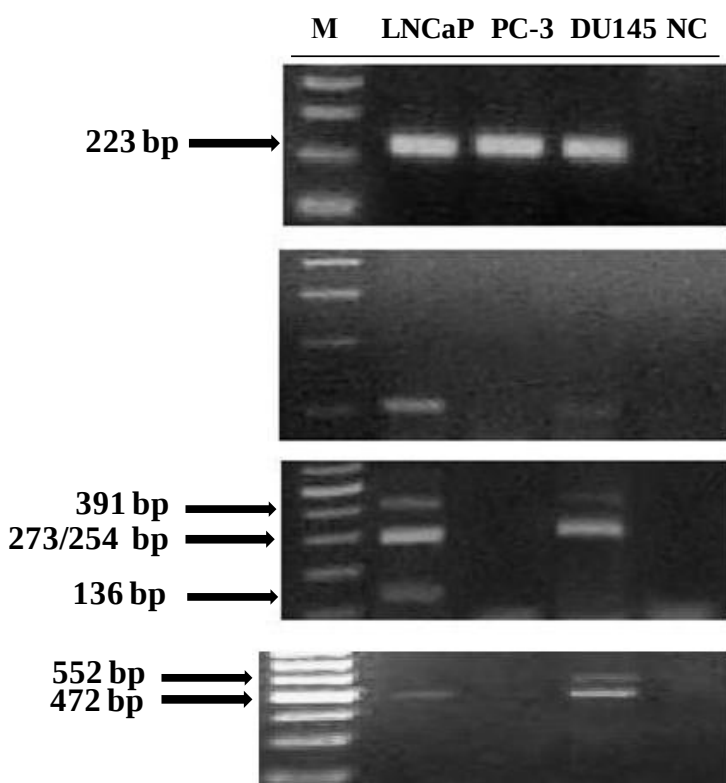


Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3,0 % w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των εναλλακτικών μεταγράφων 1 (μέρη A και B) και 2 (μέρη Γ και Δ) του γονιδίου *KLK15*. Μέρη A και Γ: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (1 – 6). Μέρη B και Δ: Δείγματα ιστού από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία (1 – 6). M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

3.2.5 Μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* στις καρκινικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3 και DU145

Η έκφραση των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* σε επίπεδο mRNA μελετήθηκε, εκτός από τα δείγματα ιστού προστάτη, και στις τρεις κλασικές καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3 και DU145. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών *KLK13* F1 – *KLK13* R και *KLK15* F1 – *KLK15* R1 αντίστοιχα για τη ενίσχυση του συνόλου των μεταγράφων

των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9 στην κυτταρική σειρά PC-3 δεν ανιχνεύεται έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Αντιθέτως, στην κυτταρική σειρά LNCaP εκφράζονται το γονίδιο *KLK15* τόσο στο επίπεδο του κλασικού mRNA μεταγράφου όσο και σε επίπεδο εναλλακτικών μεταγράφων, ενώ το γονίδιο *KLK13* εκφράζεται αποκλειστικά σε επίπεδο κλασικού μεταγράφου, καθώς απουσιάζει η έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων αυτού. Στην κυτταρική σειρά DU145 παρατηρείται έκφραση του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου *KLK15*, καθώς και των εναλλακτικών μεταγράφων 1 και 2, ενώ απουσιάζει η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου 3. Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών προσδιορίστηκε ότι εκφράζεται κυρίως το εναλλακτικού μετάγραφο 1. Επίσης, παρατηρείται έκφραση τόσο του κλασικού μεταγράφου όσο και των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *KLK13*. Στο μέρος Α της Εικόνας 3.9 παρουσιάζεται η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*.

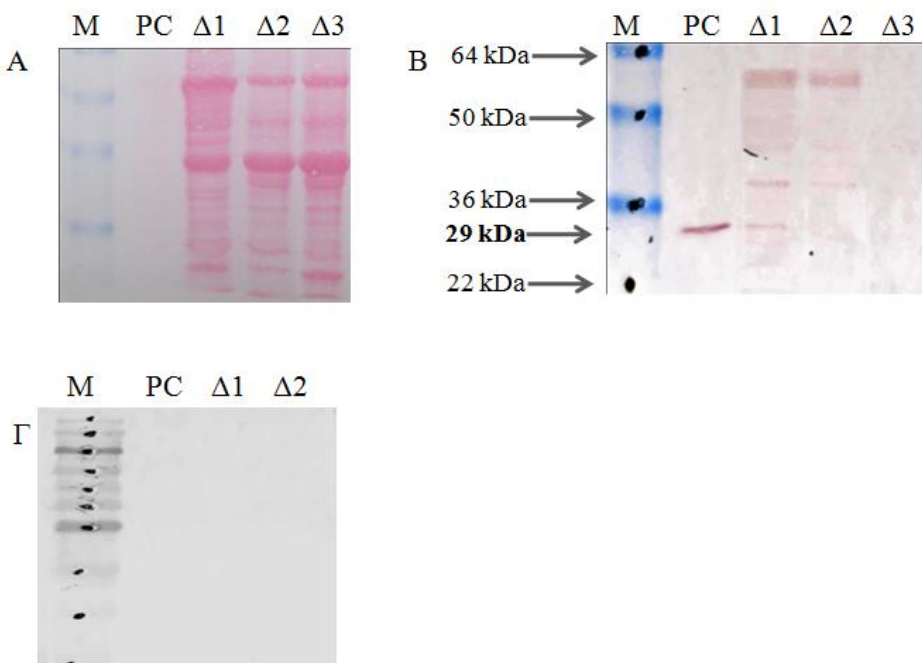


Εικόνα 3.9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* (μέρος Α), του συνόλου των μεταγράφων των γονιδίων *KLK15* (μέρος Β) και του γονιδίου *KLK13* (μέρος Γ)

στις καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP, PC-3 και DU145. M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

3.3 Στύπωση Western και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης KLK13 σε ιστούς προστάτη

Η έκφραση της πρωτεΐνης KLK13 αναλύθηκε με τη μέθοδο της ανοσοστύπωσης, μέσω της χρήσης ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος που παραχωρήθηκε από τον Prof. E.P Diamandis. Στην Εικόνα 3.10 (μέρος Β) παρουσιάζεται η έκφραση της πρωτεΐνης KLK13 σε τρία δείγματα ιστού προστάτη. Στο δείγμα Δ1 ανιχνεύτηκαν υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK13*, στο δείγμα Δ2 χαμηλότερα, ενώ στο δείγμα Δ3 δεν ανιχνεύτηκε καθόλου η έκφραση του γονιδίου. Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της μη γλυκοζυλιωμένης πολυπεπτιδικής αλυσίδας της KLK13 υπολογίζεται στα 29 kDa. Η ζώνη που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος των 29 kDa εμφανίζεται στο δείγμα Δ1. Ωστόσο, παρατηρείται ότι στο δείγμα Δ1 εκτός από την προαναφερθείσα ζώνη, εμφανίζονται επιπλέον ζώνες που αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 29 kDa. Οι ζώνες αυτές που εμφανίζονται και στο Δ2, στο οποίο απουσιάζει η ζώνη των 29 kDa, θα μπορούσαν, πιθανώς, να αποτελούν προϊόντα γλυκοζυλίωσης της KLK13. Η γλυκοζυλίωση της KLK13 αποτελεί σύνηθες φαινόμενο και έχει περιγραφεί αναλυτικά στη διεθνή βιβλιογραφία για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη [120]. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη KLK13. Επιπλέον, τα δείγματα προστάτη Δ1 και Δ2 επώαστηκαν μόνο με το δεύτερο αντίσωμα, χωρίς να εμφανιστεί κάποια ζώνη στο αναμενόμενο ύψος. (Εικόνα 3.10, μέρος Γ).



Εικόνα 3.10. Η έκφραση της πρωτεΐνης KLK13 σε ιστούς προστάτη. Μέρος Α: Χρώση Ponceau S για το σύνολο των πρωτεϊνών μετά τη μεταφορά τους στη μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Μέρος Β: Ανοσοεντοπισμός της KLK13 (Επώαση με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα). Μέρος Γ: Πείραμα αρνητικού ελέγχου (επώαση μόνο με δεύτερο αντίσωμα). Μ: Δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών. PC: Δείγμα θετικού ελέγχου (100 ng ανασυνδυασμένης KLK13), Δ1-Δ3: Δείγματα ιστών προστάτη (50 µg ολικής πρωτεΐνης).

3.4 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*

Με βάση τα αποτελέσματα της ημιποσοτικής PCR κατέστη δυνατό να εκτιμηθεί, σε ένα πρώτο στάδιο, το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* σε όγκους προστάτη τόσο σε επίπεδο κλασικών μεταγράφων όσο και σε επίπεδο εναλλακτικών μεταγράφων mRNA. Από την παραπάνω προσέγγιση πρόκυψε τις μεγαλύτερες μεταβολές μεταξύ του καρκίνου του προστάτη και της καλοήθους προστατικής υπερπλασίας τις παρουσίασαν τα κλασικά μετάγραφα των δύο υπό μελέτη γονιδίων. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν τα κλασικά μετάγραφα των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* μέσω εξειδικευμένων αντιδράσεων ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας παράλληλα ένα μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *HPRT1*, καθώς σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία

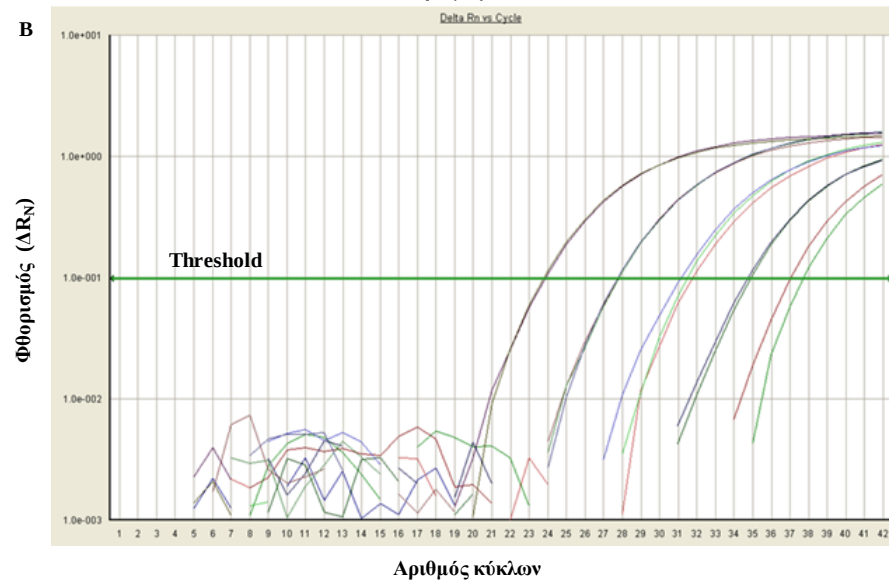
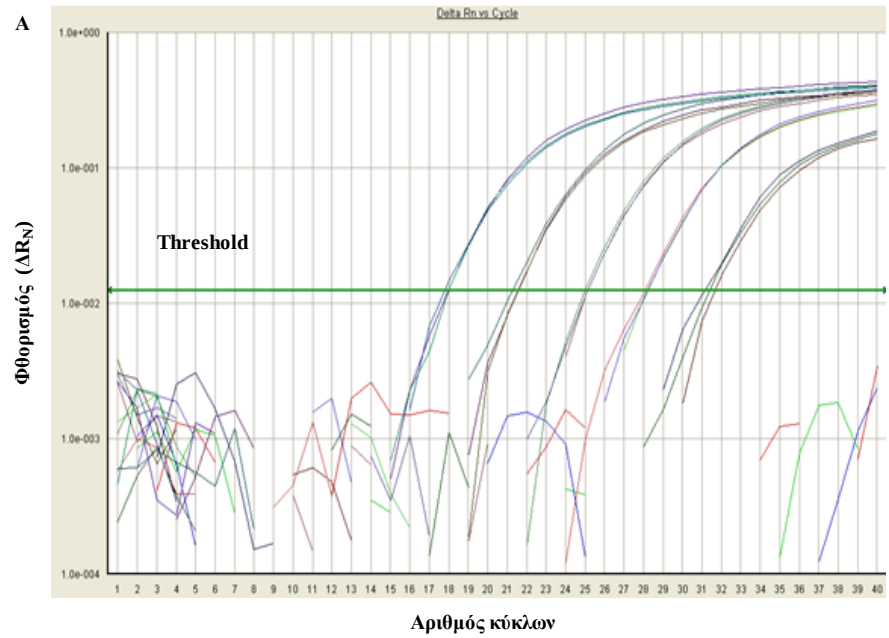
παρουσιάζει καθολική και αμετάβλητη έκφραση μεταξύ των διαφορετικών όγκων του προστάτη, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην έκφραση του *HPRT1* και στον πληθυσμό των δειγμάτων της παρούσας εργασίας. Επιπρόσθετα, ο βαθμός έκφρασης του *HPRT1* είναι παρόμοιος με αυτόν των γονιδίων στόχων. Αξιολογώντας τα παραπάνω δεδομένα, το γονίδιο *HPRT1* κρίνεται ιδανικό για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.

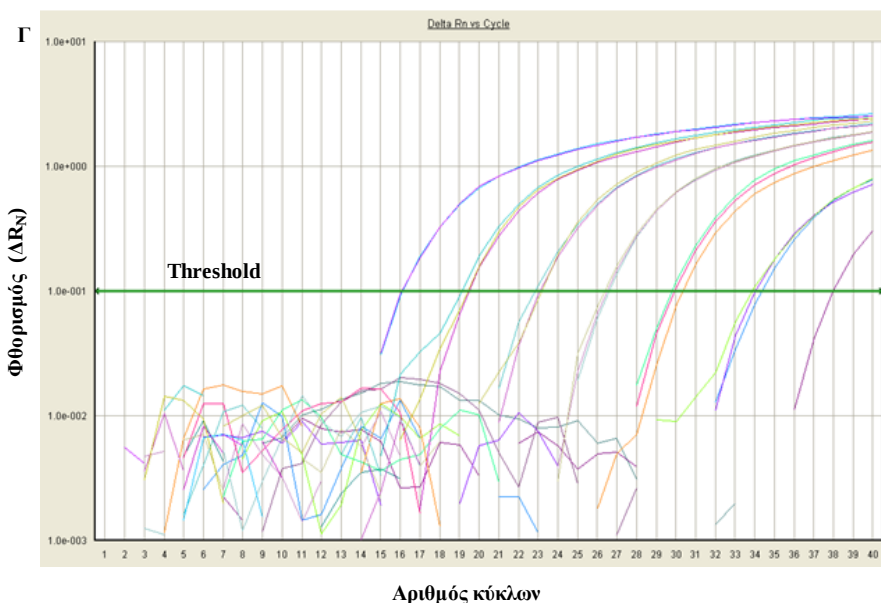
3.4.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων qPCR

Αρχικά σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέοι εκκινητές ή/και ανιχνευτές Taqman με σκοπό την επιλεκτική ανίχνευση των κλασικών μεταγράφων των γονιδίων στόχων *KLK13* και *KLK15* και του γονιδίου αναφοράς *HPRT1*. Πραγματοποιήθηκε δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων εκκινητών (250 – 1200 nM) και ανιχνευτών Taqman (50 – 350 nM) και δοκιμάστηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί για κάθε αντίδραση χρησιμοποιώντας ένα κοινό δείγμα με σκοπό την επίτευξη της χαμηλότερης τιμής Ct και της μέγιστης απόδοσης της αντίδρασης. Οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν για κάθε αντίδραση περιγράφονται στην παράγραφο 2.9.3.

3.4.2 Έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR: Υπολογισμός των αποδόσεων των αντιδράσεων, του ορίου ποσοτικοποίησης και του συντελεστή μεταβλητότητας (% CV) της μεθόδου

Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων qPCR, τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν (παράγραφος 2.8) για κάθε γονίδιο (*KLK13*, *KLK15* και *HPRT1*) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή προτύπων καμπυλών σε επαναλαμβανόμενα πειράματα. Χαρακτηριστικές καμπύλες ενίσχυσης των προτύπων διαλυμάτων για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11 (μέρος Α – μέρος Γ). Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατός ο υπολογισμός των αποδόσεων της εκάστοτε αντίδρασης, του συντελεστή γραμμικότητας των καμπυλών και του ορίου ποσοτικοποίησης.





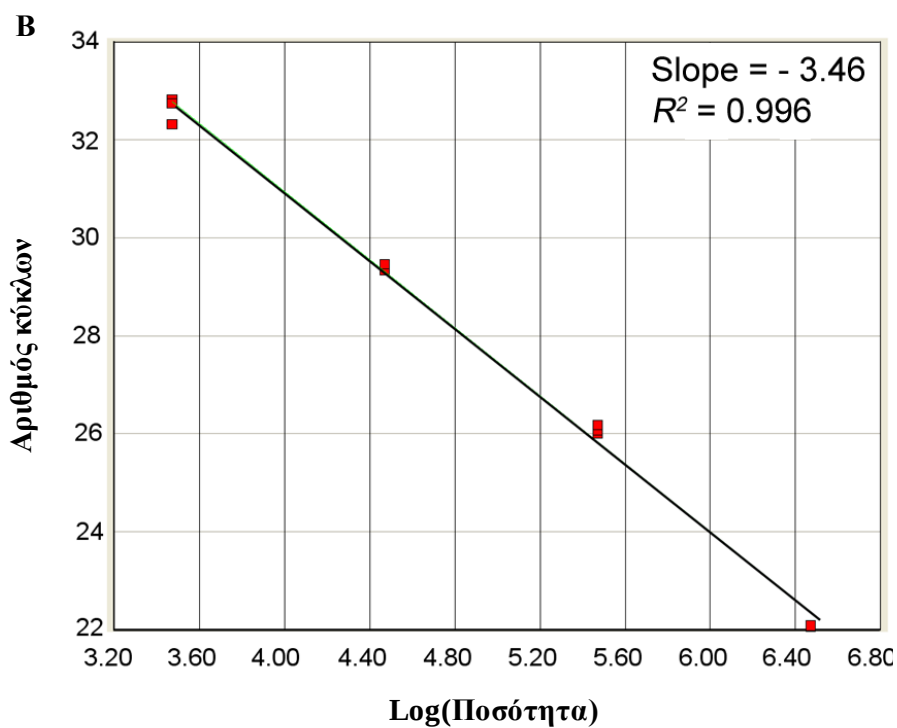
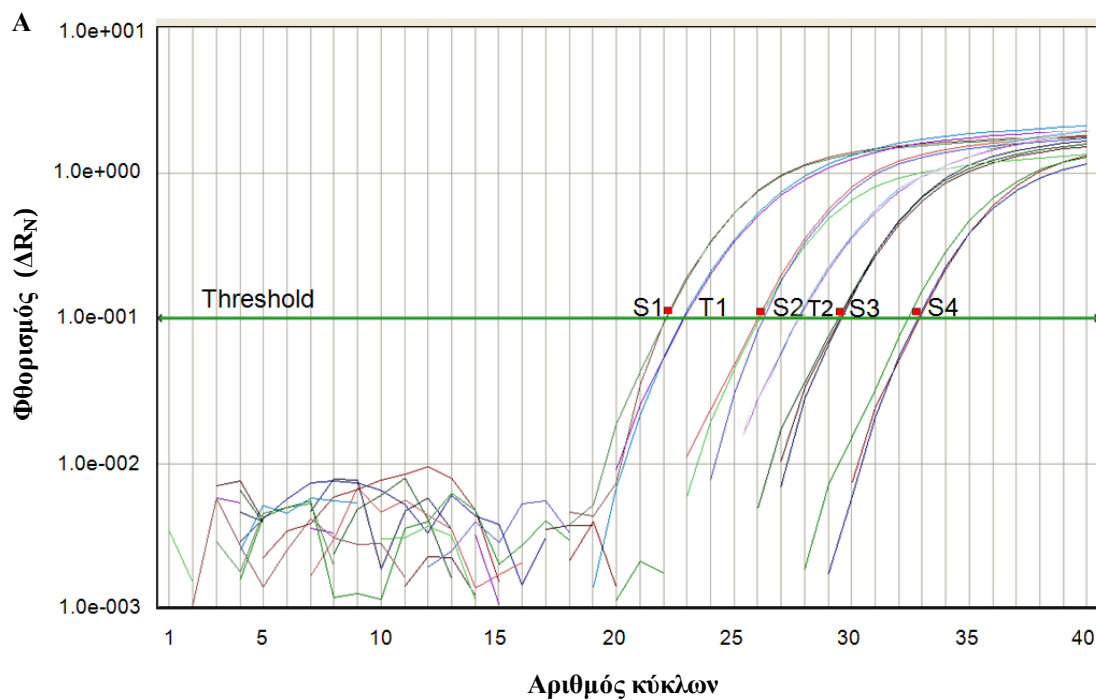
Εικόνα 3.11. Καμπύλες ενίσχυσης των προτύπων διαλυμάτων για το γονίδιο *HPRT1* ($1,9 \times 10^7 - 1900$ copies/μL) (μέρος Α), για το γονίδιο *KLK13* ($1,23 \times 10^6 - 123$ copies/μL) (μέρος Β) και για το γονίδιο *KLK15* $2,96 \times 10^8 - 296$ copies/μL (μέρος Γ).

Τα χαρακτηριστικά της μεθόδου για το κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Η μέση τιμή της απόδοσης της αντίδρασης για το γονίδιο *HPRT1* υπολογίστηκε σε 97,85%, για το γονίδιο *KLK15* σε 99,07% και για το γονίδιο *KLK13* σε 98,0% με βάση τον τύπο: Απόδοση% = $[-1 + 10^{(-1/κλίση)}] \times 100$. Το όριο ποσοτικοποίησης (QL) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: $\text{LogQL} = 10 \times \text{LogΟρίου ανίχνευσης(DL)}$, όπου $\text{LogDL} = 3.3 \times \text{SD/κλίση}$, SD = τυπική απόκλιση του σημείου τομής Cp. Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε σε 20 copies/μL για το γονίδιο *HPRT1*, 50 copies/μL για το γονίδιο *KLK15* και 60 copies/μL για το γονίδιο *KLK13*.

Πίνακας 3.2. Τα χαρακτηριστικά των μεθόδων ποσοτικοποίησης των μεταγράφων των γονιδίων *HPRT1*, *KLK15*, και *KLK13*.

	<i>HPRT1</i>	<i>KLK15</i>	<i>KLK13</i>
Μέση τιμή κλίσης πρότυπης καμπύλης	-3,37	-3,34	-3,37
Τυπική απόκλιση	0,05	0,05	0,07
Μέση τιμή απόδοσης PCR (%)	97,85	99,07	98,0
Τυπική απόκλιση	1,92	1,94	2,01
Μέση τιμή σημείου τομής C_p	42,61	42,81	43,36
Τυπική απόκλιση	0,28	0,72	0,78
Συντελεστής γραμμικότητας	0,992-0,999	0,991-0,994	0,992-0,995
Όριο Ποσοτικοποίησης (QL)	20 copies/μL	50 copies/μL	60 copies/μL

Στην Εικόνα 3.12 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές καμπύλες ενίσχυσης (μέρος Α) για τα πρότυπα διαλύματα του γονιδίου *KLK15* (S1 – S4) και για προς προσδιορισμό δείγματα (T1, T2), καθώς και η πρότυπη καμπύλη (μέρος Β) που προκύπτει σε ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα προσδιορισμού του αριθμού των mRNA αντιγράφων του γονιδίου *KLK15*.



Εικόνα 3.12. Καμπύλες ενίσχυσης (μέρος A) και η προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη (μέρος B) για το κλασικό μετάγραφο του γονιδίου *KLK15*. S1-S4: Πρότυπα διαλύματα που καλύπτουν το εύρος συγκεντρώσεων ($2,96 \times 10^6 - 2960$ αντίγραφα), T1, T2: Δείγματα ιστού προστάτη.

Στα πλαίσια του ελέγχου ποιότητας υπολογίστηκε και ο συντελεστής μεταβλητότητας (% CV) της μεθόδου προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης ενός δείγματος σε πολλαπλά αντίγραφα μεταξύ διαφορετικών σειρών αντιδράσεων (inter-run). Οι συντελεστές μεταβλητότητας κυμαίνονταν από 6,3% έως 12,9%. Επίσης, σε κάθε σειρά προσδιορισμών δοκιμάζονταν δείγματα αρνητικού έλεγχου της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και της αντίδρασης qPCR, ενώ χρησιμοποιήθηκε και γενωμικό DNA ως υπόστρωμα. Όλα τα παραπάνω δείγματα ελέγχου δεν παρήγαγαν ανιχνεύσιμες τιμές Ct. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση του *HPRT1* δε μεταβάλλεται μεταξύ καλοηθών και καρκινικών όγκων, καθώς και μεταξύ καρκινικών όγκων διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών (για όλες τις συγκρίσεις η τιμή p ήταν > 0,05).

3.5 Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK13* σε όγκους του προστάτη

Μετά τον απαραίτητο έλεγχο ποιότητας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK13* καθώς και του γονιδίου αναφοράς *HPRT1*. Μέσω της χρήσης προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης αντιγράφων *KLK13* και *HPRT1*, έγινε κατασκευή προτύπων καμπυλών και υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων, τόσο για το γονίδιο στόχο *KLK13* όσο και για το γονίδιο αναφοράς *HPRT1*, σε κάθε δείγμα, και προσδιορίστηκε ο αντίστοιχος λόγος έκφρασης σε αντίγραφα *KLK13*/ 10^3 αντίγραφα *HPRT1* για κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

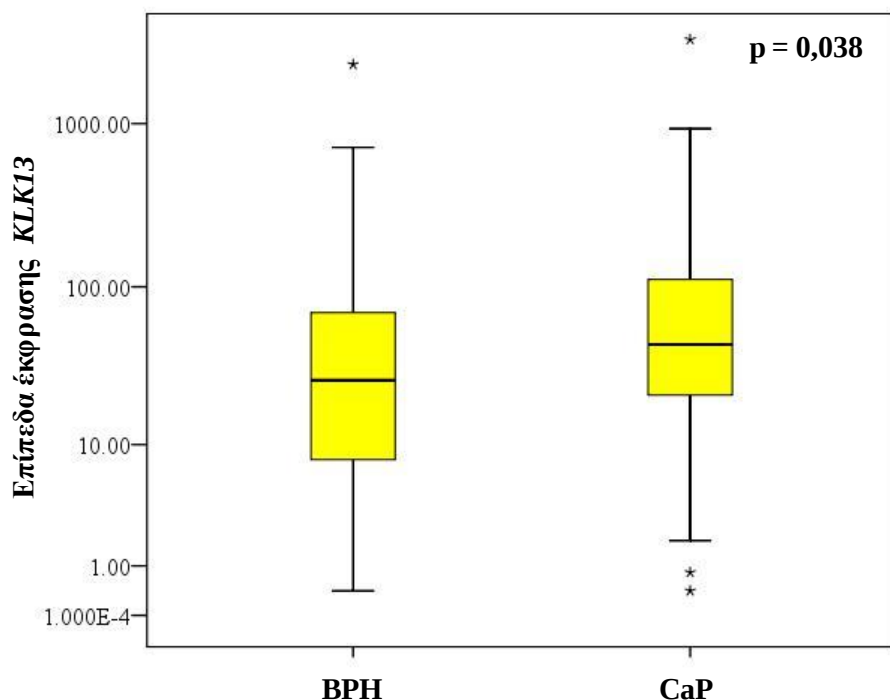
3.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK13* στην καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και στον καρκίνο του προστάτη (CaP).

Τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK13* μετρήθηκαν σε 70 δείγματα καλοηθών όγκων και σε 70 δείγματα καρκινικών όγκων προστάτη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων. Τα χαρακτηριστικά των προαναφερθέντων δειγμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK13* στα προαναφερθέντα δείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3. Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών της μελέτης στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και στους ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία.

Μεταβλητές	Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50 (διάμεσος)	75	90
CaP (n = 70)							
Επίπεδα έκφρασης <i>KLK13</i> (αντίγραφα <i>KLK13</i> / 10 ³ αντίγραφα <i>HPRT1</i>)	138 ± 49	0,410–3260	6,36	20,9	43,9	111	243
BPH (n = 70)							
Επίπεδα έκφρασης <i>KLK13</i> (αντίγραφα <i>KLK13</i> / 10 ³ αντίγραφα <i>HPRT1</i>)	91,3 ± 34	0,410–2300	0,410	7,29	26,1	69,9	152

Η έκφραση του γονιδίου *KLK13* σε επίπεδο mRNA στον καρκίνο του προστάτη κυμάνθηκε από 0,410 έως 3260 αντίγραφα *KLK13*/10³ αντίγραφα *HPRT1* με μέση τιμή 138 ± 49. Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK13* στην καλοήγη προστατική υπερπλασία κυμάνθηκε από 0,410 έως 2300 αντίγραφα *KLK13*/10³ αντίγραφα *HPRT1* με μέση τιμή 91,3 ± 34 (Πίνακας 3.3 και Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13. Η κατανομή της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* σε ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και ασθενείς με καρκίνο του προστάτη.

Παρατηρούνται ελαφρώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK13* ($p = 0,038$) στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του προστάτη (διάμεσος τιμή = 43,9 αντίγραφα *KLK13*/10³ αντίγραφα *HPRT1*) σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία (διάμεσος τιμή = 26,1 αντίγραφα *KLK13*/10³ αντίγραφα *HPRT1*) (Εικόνα 3.13).

Στη συνέχεια οι τιμές έκφρασης του γονιδίου *KLK13* κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (θετική ή αρνητική), με βάση τη διάμεσο τιμή της έκφρασης. Εφαρμόζοντας αυτήν την κατηγοριοποίηση, παρατηρείται μια μικρή αύξηση στη συχνότητα έκφρασης του γονιδίου *KLK13* στον καρκίνο του προστάτη (50,0%) σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία (38,6%), ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p = 0,234$).

Δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK13* με την ηλικία ή τη συγκέντρωση του PSA, τόσο στο σύνολο των ασθενών όσο και στις υποομάδες των ασθενών CaP και BPH.

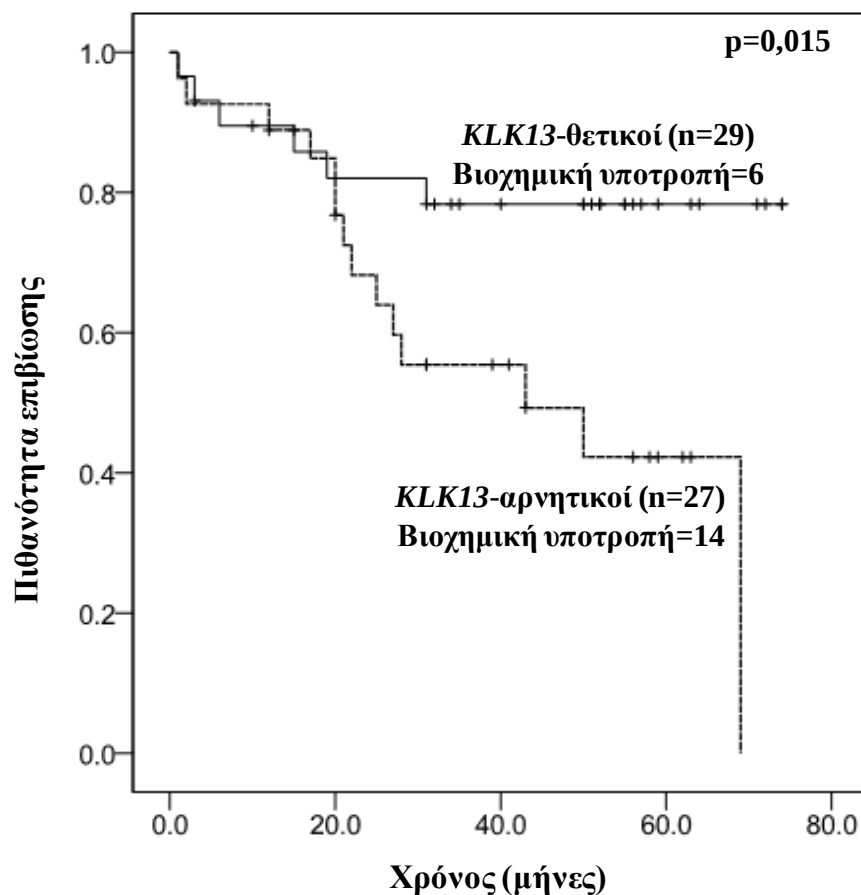
3.5.2 Μελέτη της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK13* και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη

Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK13* και των διάφορων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Δεν παρατηρήθηκε κάποια σχέση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* και του παθολογοανατομικού σταδίου ή του βαθμού επιθετικότητας της νόσου κατά Gleason. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *KLK13* στο 52,8% των ασθενών πρώιμου παθολογοανατομικού σταδίου ($< pT2c$) και στο 45,5% των ασθενών με προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο ($\geq pT2c$). Η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0,632$). Επιπρόσθετα, παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *KLK13* στο 40,9% των ασθενών με Gleason score ≤ 6 , στο 56,4% των ασθενών με Gleason score = 7 και στο 28,6% των ασθενών με Gleason score > 7 . Οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ($p=0,273$).

3.5.3 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK13* και της επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Προσδιορισμός της προγνωστικής αξίας του γονιδίου *KLK13*

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Εικόνα 3.14) έδειξε ότι ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως θετικοί για την έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK13* (*KLK13*-θετικοί) παρουσιάζουν μεγαλύτερα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερας νόσου, με βάση την εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής, σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως *KLK13*-αρνητικοί. Η διαφορά αυτή στην πορεία επιβίωσης είναι στατιστικώς σημαντική ($p = 0,015$). Επιπρόσθετα, η πιθανότητα 5-ετούς επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής για τους *KLK13*-θετικούς ασθενείς ανέρχεται στο $78,3 \pm 7,9 \%$ και είναι αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη πιθανότητα για τους *KLK13*-αρνητικούς ασθενείς που υπολογίζεται στο $42,2 \pm 11,2 \%$.



Εικόνα 3.14. Καμπύλες Kaplan-Meier για την επιβίωση ελευθέρως νόσου των θετικών και αρνητικών ως προς την έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK13* ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 3.4) σε μονομεταβλητό επίπεδο επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του γονιδίου *KLK13* ως δείκτη ευμενούς πρόγνωσης. Υπολογίστηκε ότι οι ασθενείς που εκφράζουν το γονίδιο *KLK13* έχουν 3,1 φορές μικρότερη πιθανότητα να εμφανίσουν υποτροπή με την πάροδο του χρόνου (HR = 0,319, 95% CI = 0,121-0,842, $p = 0,021$) σε σχέση με τους *KLK13*-αρνητικούς ασθενείς. Επιπρόσθετα, σημαντικοί δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης, όπως αναμένονταν, είναι το παθολογοανατομικό στάδιο (HR = 1,45, 95% CI = 1,09 – 1,93, $p = 0,012$), το Gleason Score (HR = 2,53, 95% CI = 1,43 – 4,46, $p = 0,001$) τα επίπεδα PSA (HR = 1,13, 95% CI = 1,06 – 1,21, $p < 0,001$) και το αποτέλεσμα της δακτυλικής εξέτασης DRE (HR = 2,95, 95% CI = 1,12 – 7,75, $p = 0,028$).

Η πολυμεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης απέδειξε την ανεξάρτητη προγνωστική αξία της έκφρασης του γονιδίου *KLK13*, μετά από προσαρμογή του μοντέλου για

τις τιμές των μεταβλητών Gleason score, παθολογοανατομικό στάδιο, επίπεδα PSA, ηλικία και αποτέλεσμα δακτυλικής εξέτασης. Η αναλογία κινδύνου για τους *KLK13*-θετικούς σε σχέση με τους *KLK13*-αρνητικούς ασθενείς σε αυτή την περίπτωση υπολογίστηκε στο 0,333 (95% CI=0,118 – 0,940, $p=0,038$) (Πίνακας 3.4).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η έκφραση της κλασικής mRNA ισομορφής του γονιδίου *KLK13* μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νέος βιοδείκτης ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, ο οποίος μάλιστα παρέχει ανεξάρτητη προγνωστική πληροφορία από αυτή που προσφέρουν οι ήδη χρησιμοποιούμενοι δείκτες όπως είναι το Gleason Score και το παθολογοανατομικό στάδιο.

Πίνακας 3.4. Η προγνωστική αξία της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* σε επίπεδο mRNA.

Μονομεταβλητή ανάλυση				Πολυμεταβλητή ανάλυση			
Μεταβλητή	HR	95% CI	Τιμή p		HR	95% CI	Τιμή p
Έκφραση <i>KLK13</i>							
Αρνητική	1.00				1.00		
Θετική	0,319	0,121– 0,842	0,021		0,333	0,118–0,940	0,038
PSA	1,13	1,06 – 1,21	< 0,001		1,127	1,04 – 1,22	0,005
Ηλικία	0,962	0,897 – 1,03	0,282		0,941	0,872 – 1,02	0,120
DRE							
Αρνητική	1.00				1.00		
Θετική	2,95	1,12 – 7,75	0,028		2,19	0,759 – 6,32	0,147
Στάδιο	1,45	1,09 – 1,93	0,012		0,832	0,559 – 1,24	0,365
Gleason score	2,53	1,43 – 4,46	0,001		1,96	0,978 – 3,92	0,058

3.6 Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK15* σε όγκους του προστάτη

Όπως και στην περίπτωση του γονιδίου *KLK13*, μετά τον απαραίτητο έλεγχο ποιότητας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* στα δείγματα ιστού από τους όγκους προστάτη. Με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης αντιγράφων *KLK15*, έγινε κατασκευή προτύπων καμπυλών και υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων τόσο για το γονίδιο στόχο *KLK15* σε κάθε δείγμα και προσδιορίστηκε ο αντίστοιχος λόγος έκφρασης σε αντίγραφα *KLK15*/αντίγραφα *HPRT1* για κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* στην καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και στον καρκίνο του προστάτη (CaP). Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας

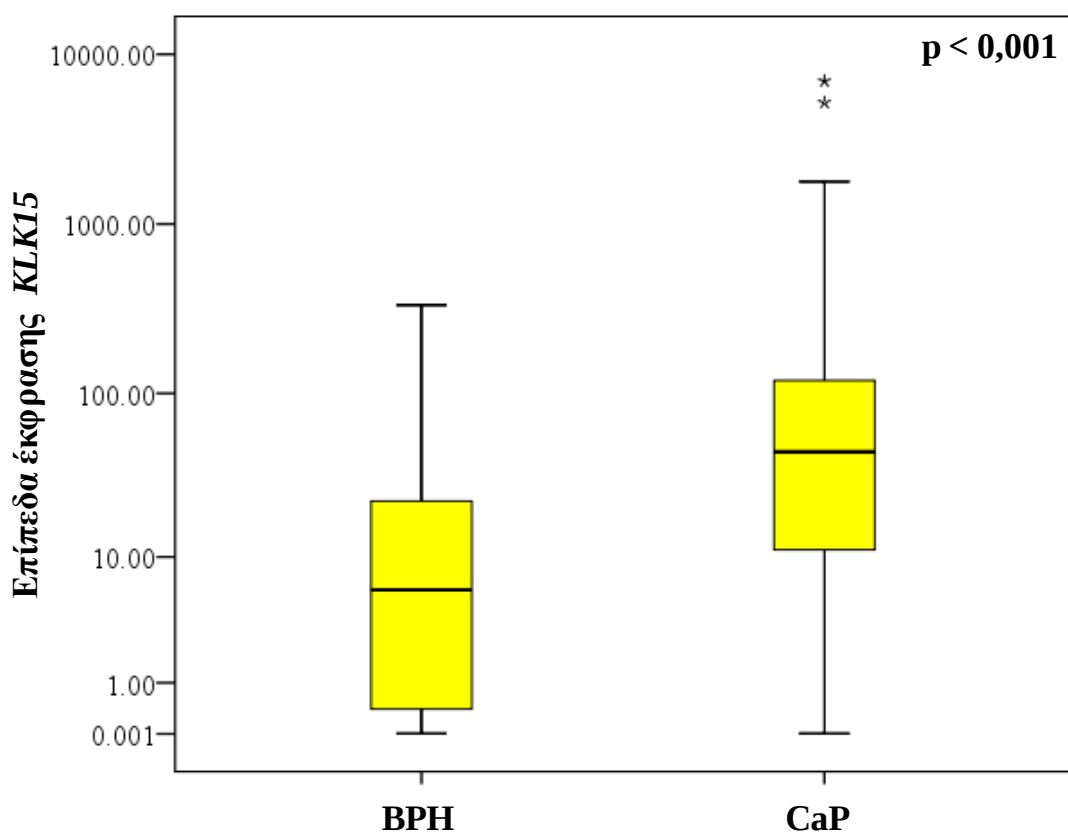
Τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* μετρήθηκαν σε 78 δείγματα καλοηθών όγκων προστάτη και 72 δείγματα καρκινικών όγκων προστάτη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* όπως προσδιορίστηκαν στα προαναφερθέντα δείγματα φαίνονται στον Πίνακα 3.5, ενώ τα χαρακτηριστικά των ασθενών έχουν παρουσιαστεί στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 3.5. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και στους ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία.

Μεταβλητές	Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50	75	90
CaP (n = 78)							
Επίπεδα έκφρασης <i>KLK15</i> (αντίγραφα <i>KLK15</i> /αντίγραφα <i>HPRT1</i>)	320,6 ± 115	0,008 – 6953	1,233	10,98	45,07	119,3	662,9
BPH (n = 72)							
Επίπεδα έκφρασης <i>KLK15</i> (αντίγραφα <i>KLK15</i> / αντίγραφα <i>HPRT1</i>)	26,10 ± 6,60	0,008 – 332,6	0,008	0,339	6,056	22,57	62,43

Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο του προστάτη κυμάνθηκε από 0,008 έως 6953 αντίγραφα *KLK15*/αντίγραφα *HPRT1* με μέση τιμή $320,6 \pm 115$. Τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στην καλοήγη προστατική υπερπλασία κυμάνθηκαν από 0,008 έως 332,6 αντίγραφα *KLK15*/αντίγραφα *HPRT1* με μέση τιμή $26,10 \pm 6,60$ (Πίνακας 3.5 και Εικόνα 3.15).

Παρατηρούνται ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* και μάλιστα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p < 0,001$) στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη (διάμεσος τιμή = 45,07 αντίγραφα *KLK15*/αντίγραφα *HPRT1*) σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία (διάμεσος τιμή = 6,056 αντίγραφα *KLK15*/αντίγραφα *HPRT1*) (Εικόνα 3.15).

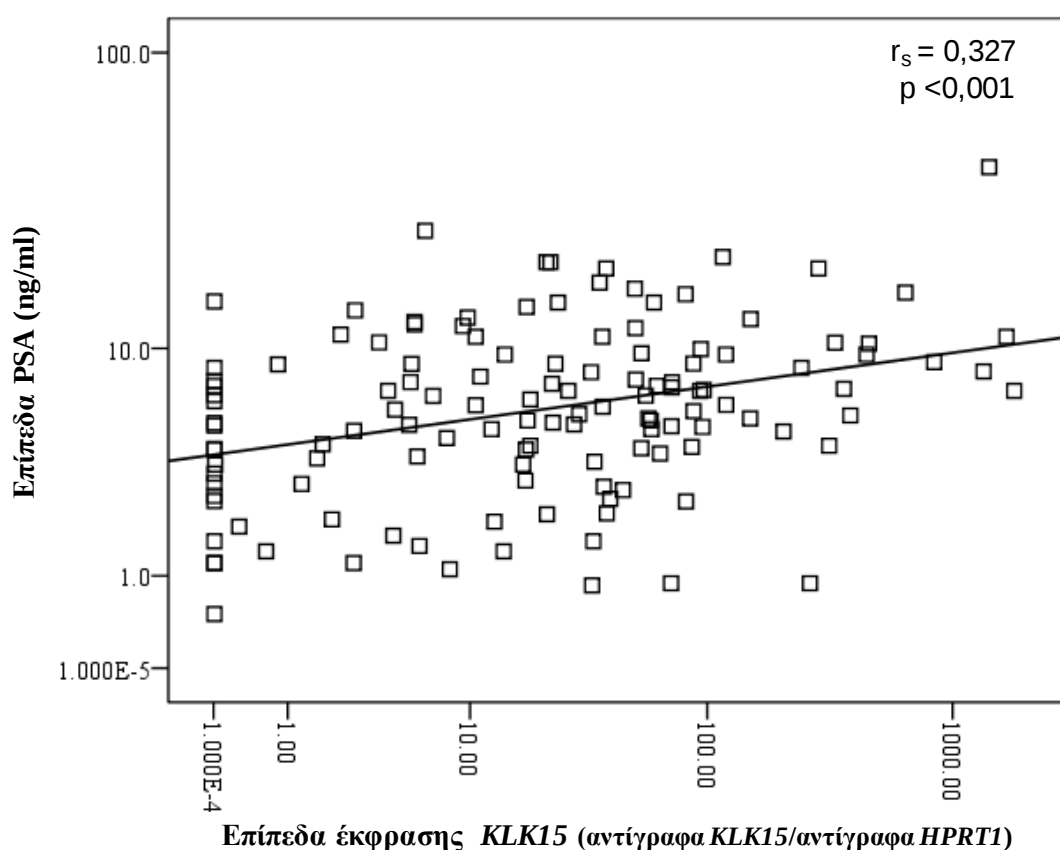


Εικόνα 3.15. Η κατανομή της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* σε ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και ασθενείς με καρκίνο του προστάτη.

Στη συνέχεια, η έκφραση του γονιδίου *KLK15* κατηγοριοποιήθηκε σε δύο ομάδες (θετική ή αρνητική), χρησιμοποιώντας ως όριο λήψης απόφασης τη διάμεσο τιμή. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση, παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στη συχνότητα έκφρασης του γονιδίου

KLK15 στον καρκίνο του προστάτη (50,0%) σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία (15,3%). Η εμφανής αυτή διαφορά στη συχνότητα έκφρασης του γονιδίου είναι στατιστικώς σημαντική ($p < 0,001$).

Δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* με την ηλικία ή τη συγκέντρωση του PSA, στις υποομάδες των ασθενών CaP και BPH. Ωστόσο μελετώντας το σύνολο των ασθενών εμφανίζεται μια ασθενής θετική συσχέτιση ($r_s = 0,327$, $p < 0,001$) των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* με τη συγκέντρωση του PSA στον ορό των ασθενών (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16. Η θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* και του PSA στο σύνολο των ασθενών.

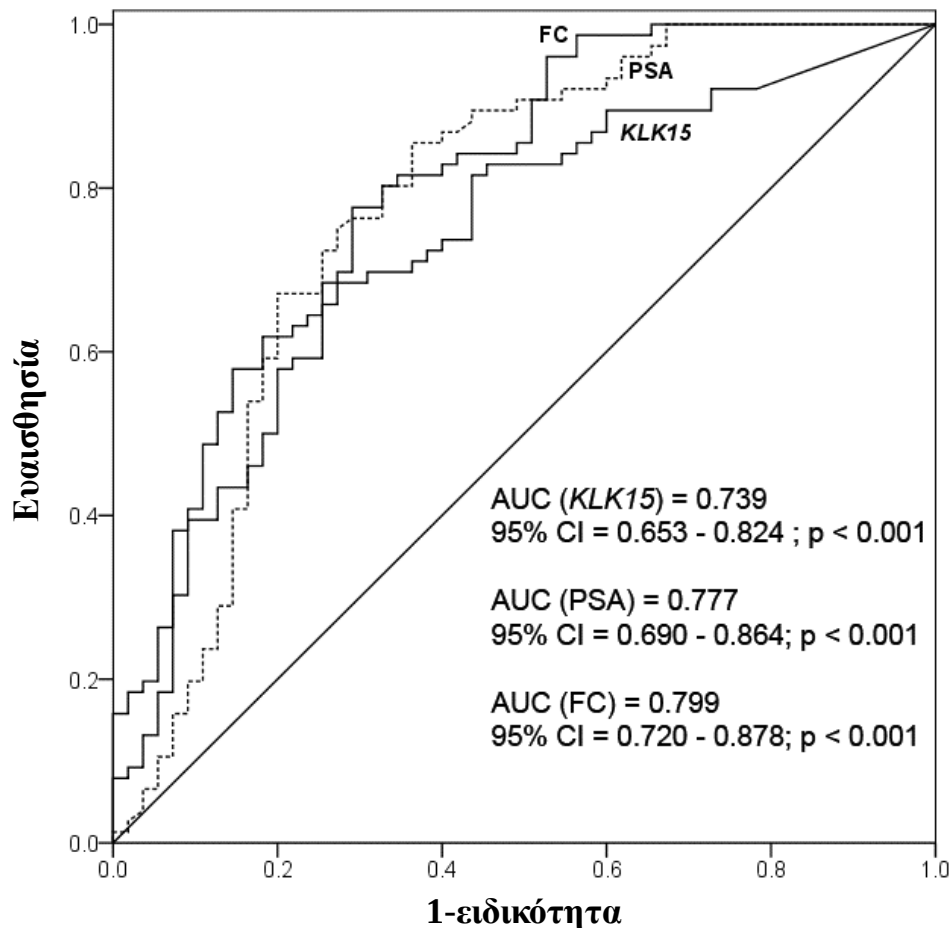
Λόγω των ιδιαίτερα αυξημένων επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με καλοήθεις όγκους (7,5 φορές αύξηση), πραγματοποιήθηκε εκτενής αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας, μέσω ανάλυσης καμπυλών ευαισθησίας-

ειδικότητας ROC, αλλά και δυαδικής ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης (binary logistic regression) τόσο σε μονομεταβλητό όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο.

Η ανάλυση καμπυλών ROC βοήθησε να αναδειχτεί η σημαντική διαφοροδιαγνωστική ικανότητα των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15*. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) υπολογίστηκε ίση με 0,739 (95% CI = 0,653 – 0,824, $p < 0,001$) (Εικόνα 3.17). Επιπλέον, αναπτύχθηκε ένα συνδυαστικό μοντέλο μέσω εξισώσεων λογιστικής παλινδρόμησης, το οποίο εμπερικλείει την πληροφορία των μετρήσεων PSA και τις τιμές έκφρασης του γονιδίου *KLK15*. Η εξίσωση αυτού του συνδυαστικού μοντέλου είναι η παρακάτω:

Function Combination (FC) = $3,174 \times \text{LogPSA} + 0,414 \times \text{LogKLK15} - 2.427$.

Η εφαρμογή της προαναφερθείσας συνδυαστικής προσέγγισης αυξάνει την περιοχή κάτω από την καμπύλη, βελτιώνοντας τη διαφοροδιαγνωστική αξία, του PSA από 0,777 σε 0,799.



Εικόνα 3.17. Καμπύλες ευαισθησίας-ειδικότητας ROC για την έκφραση του γονιδίου *KLK15*, το PSA, καθώς και το συνδυασμό τους (FC).

Η μονομεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (Πίνακας 3.6) επιβεβαίωσε τη διαφοροδιαγνωστική αξία του γονιδίου *KLK15*, καθώς για κάθε μονάδα λογαριθμικής αύξησης της έκφρασης του ο κίνδυνος ύπαρξης καρκίνου του προστάτη αυξάνεται κατά 1,85 φορές (95% CI = 1,39 – 2,47, $p < 0,001$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η προβλεπτική ικανότητα των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* διατηρείται και σε πολυμεταβλητό επίπεδο [Λόγος πιθανοτήτων (OR)= 1,52. 95% CI=1,12 – 2,05, $p=0,007$] μετά από διόρθωση για τις τιμές PSA και της ηλικίας των ασθενών, προσφέροντας έτσι πληροφορία η οποία είναι ανεξάρτητη από ισχυρούς δείκτες ύπαρξης καρκίνου προστάτη όπως είναι το PSA (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6. Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για την πρόβλεψη ύπαρξης καρκίνου του προστάτη.

Μονομεταβλητή Ανάλυση				Πολυμεταβλητή Ανάλυση			
Μεταβλητή	OR	95% CI	Τιμή p		OR	95% CI	Τιμή p
Log ₁₀ <i>KLK15</i>	1,85	1,39 – 2,47	< 0,001		1,52	1,12 – 2,05	0,007
PSA	1,20	1,09 – 1,33	< 0,001		1,15	1,04 – 1,2	0,006
Ηλικία	0,904	0,857– 0,955	< 0,001		0,919	0,866 – 0,975	0,005

3.6.2 Μελέτη της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK15* και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη

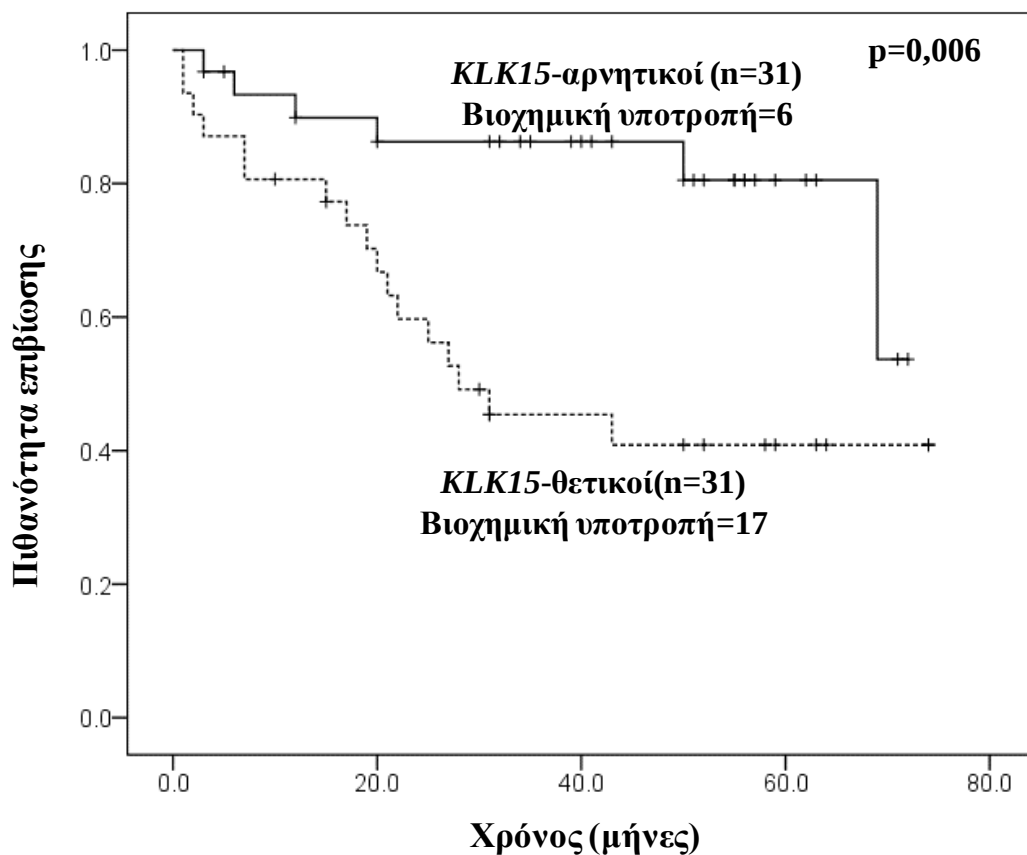
Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK15* και των διάφορων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *KLK15* και του βαθμού επιθετικότητας της νόσου κατά Gleason, καθώς το γονίδιο εκφράζεται στο 48,0% των ασθενών με Gleason score ≤ 6 , στο 53,5% των ασθενών με Gleason score = 7 και στο 44,4% των ασθενών με Gleason score >7 ($p = 0,841$). Αντιθέτως, η συχνότητα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* σχετίζεται με καρκίνο προστάτη προχωρημένου παθολογοανατομικού σταδίου.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται έκφραση του γονιδίου στο 63.4% των ασθενών με προχωρημένη νόσο ($\geq$ pT2c) και μόλις στο 36.6% των περιπτώσεων που παρουσιάστηκαν με πρώιμο στάδιο < pT2c ($p = 0,023$).

3.6.3 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* και της επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Προσδιορισμός της προγνωστικής αξίας του γονιδίου *KLK15*

Από την ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Εικόνα 3.18) προκύπτει ότι ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως θετικοί για την έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* (*KLK15*-θετικοί) παρουσιάζουν μικρότερα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερας νόσου σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως *KLK15*-αρνητικοί ($p = 0,006$). Η πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής για τους *KLK15*-θετικούς ασθενείς ανέρχεται στο $40,9 \pm 9,4\%$ και είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη πιθανότητα για τους *KLK15*-αρνητικούς ασθενείς που υπολογίζεται στο $80,5 \pm 8,2\%$.



Εικόνα 3.18. Καμπύλες Kaplan-Meier για την επιβίωση ελευθέρας νόσου των θετικών και αρνητικών ως προς την έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK15* ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 3.7) επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του γονιδίου *KLK15* ως δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης, καθώς οι ασθενείς που εκφράζουν το γονίδιο (*KLK15*-θετικοί) έχουν 3,44 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν υποτροπή με την πάροδο του χρόνου (HR = 3,44, 95% CI = 1,35 – 8,75, $p = 0,010$) σε σχέση με τους *KLK15*-αρνητικούς ασθενείς. Η πολυμεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης απέδειξε την ανεξάρτητη προγνωστική αξία της έκφρασης του γονιδίου *KLK15*, μετά από προσαρμογή για τις τιμές των μεταβλητών Gleason score, παθολογοανατομικό στάδιο, επίπεδα PSA, ηλικία και αποτέλεσμα δακτυλικής εξέτασης. Η αναλογία κινδύνου για τους *KLK15*-θετικούς σε σχέση με τους *KLK15*-αρνητικούς ασθενείς σε αυτή την περίπτωση υπολογίστηκε στο 3,36 (95% CI= 1,07 – 10,6, $p=0,038$) (Πίνακας 3.7).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, το κλασικό μετάγραφο του γονιδίου *KLK15* μπορεί να θεωρηθεί ως ένας νέος βιοδείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Η προγνωστική πληροφορία που παρέχεται από το γονίδιο *KLK15*, όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών, είναι ανεξάρτητη από αυτή που προσφέρουν οι ήδη χρησιμοποιούμενοι προγνωστικοί δείκτες όπως είναι το Gleason Score και το παθολογοανατομικό στάδιο.

Πίνακας 3.7. Η προγνωστική αξία της έκφρασης του γονιδίου *KLK15* σε επίπεδο mRNA.

Μονομεταβλητή ανάλυση				Πολυμεταβλητή ανάλυση			
Μεταβλητή	HR	95% CI	Τιμή p		HR	95% CI	Τιμή p
Έκφραση <i>KLK15</i>							
Αρνητική	1,00				1,00		
Θετική	3,44	1,35 – 8,75	0,010		3,36	1,07 – 10,6	0,038
PSA	1,13	1,06 – 1,20	< 0,001		1,08	0,998 – 1,17	0,057
Ηλικία	0,963	0,902 – 1,03	0,255		0,931	0,865 – 1,00	0,060
DRE							
Αρνητική	1,00				1,00		
Θετική	3,38	1,32 – 8,64	0,011		2,41	0,879 – 6,63	0,087
Στάδιο	1,45	1,10 – 1,90	0,008		0,780	0,497 – 1,22	0,278
Gleason score	2,48	1,46 – 4,20	0,001		2,45	1,27 – 4,73	0,008

3.7 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του miR-224

Με βάση τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω για το γονίδιο *KLK15*, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές μεταξύ καλοηθών και καρκινικών όγκων του προστάτη και σχετίζονται θετικά με την εξέλιξη της νόσου.

Δεδομένης της εκτεταμένης ρύθμισης της γονιδιακής οικογένειας των καλλιкреϊνών από τα miRNAs, υποθέσαμε ότι η εμφανής απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *KLK15* ενδεχομένως να οφείλεται σε μεταβολές της έκφρασης του miR-224, το οποίο στοχεύει την έκφραση του εν λόγω γονιδίου και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αρκετές ανθρώπινες νεοπλασίες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προφίλ έκφρασης του miR-224 σε όγκους προστάτη, μέσω ποσοτικής PCR, με σκοπό:

- i) Τη μελέτη της πιθανής απορρύθμισης του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη.
- ii) Τη διερεύνηση της κλινικής αξίας του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη.
- iii) Τη διερεύνηση της πιθανής *in vivo* ρυθμιστικής ικανότητας του miR-224, όσον αφορά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο του προστάτη.

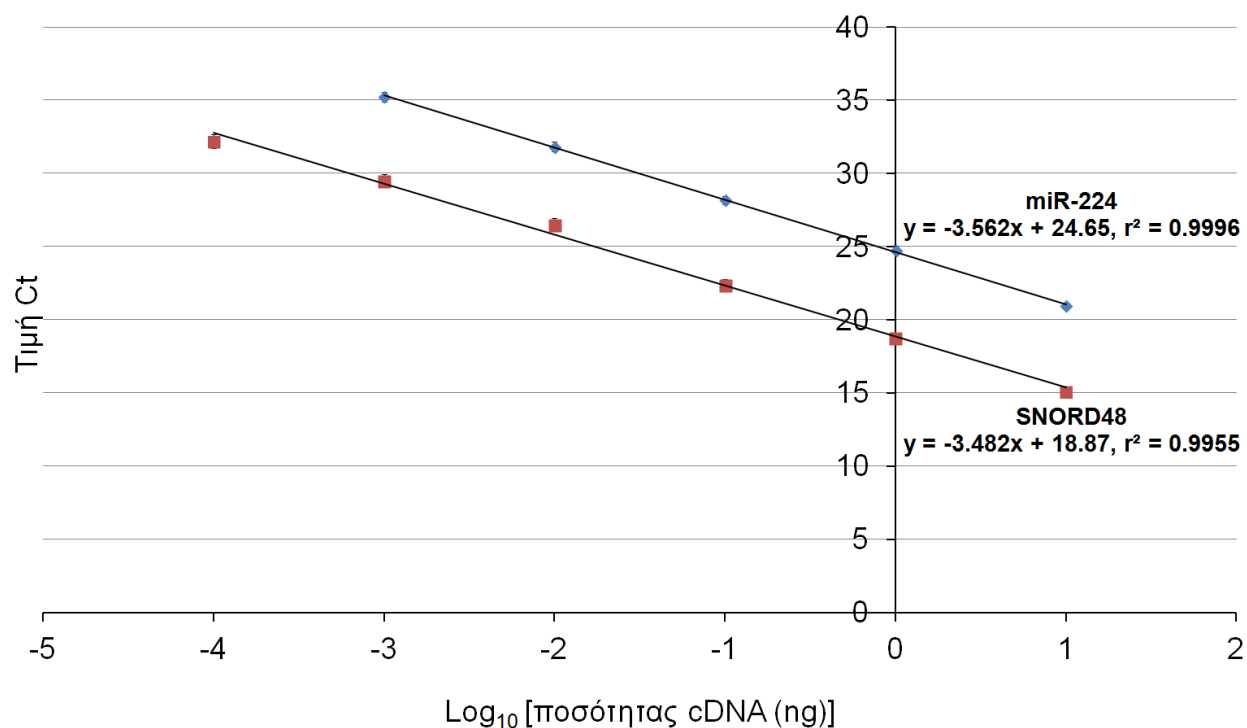
3.7.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του miR-224

Πραγματοποιήθηκε δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 nM) για το miR-224 και το μικρομοριακό RNA αναφοράς SNORD48 και δοκιμάστηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί για κάθε αντίδραση χρησιμοποιώντας ένα κοινό δείγμα με σκοπό την επίτευξη της χαμηλότερης τιμής Ct και της μέγιστης απόδοσης και ειδικότητας της αντίδρασης. Οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν για κάθε αντίδραση περιγράφονται στην παράγραφο 2.9.4.

3.7.2 Έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του miR-224

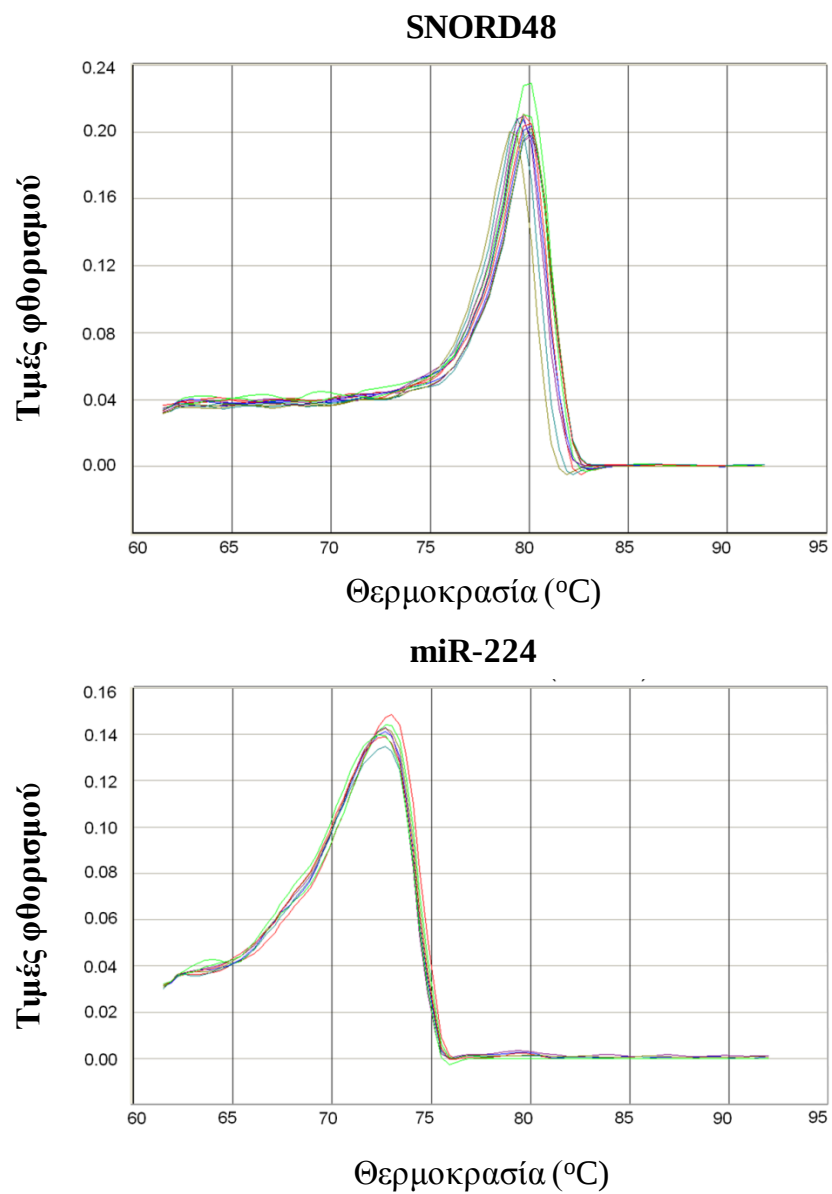
Για την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του miR-224 έγινε χρήση της μεθόδου της σχετικής ποσοτικοποίησης μέσω μέθοδο της σύγκρισης των τιμών Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή της παραπάνω προσέγγισης είναι η διασφάλιση ότι η απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης του μορίου-στόχου και της αντίδρασης ενίσχυσης του μορίου-αναφοράς είναι παρόμοιες και μέσα στα επιτρεπτά όρια (90 – 100 %). Για το σκοπό αυτό διεξήχθησαν πειράματα αξιολόγησης στα οποία χρησιμοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις του θετικού μάρτυρα (cDNA από την κυτταρική σειρά LNCaP) καλύπτοντας ένα σημαντικό εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος (Εικόνα 3.19). Με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατός ο υπολογισμός των αποδόσεων των αντιδράσεων σε 91% για το miR-224 και 94% για το RNU48

χρησιμοποιώντας τον τύπο $\text{Απόδοση \%} = [-1 + 10^{(-1/\kappa\lambda\iota\sigma\eta)}] \times 100$. Οι υπολογισθείσες αποδόσεις είναι παρόμοιες, όπως φαίνεται άλλωστε και από την παραλληλία των προτύπων καμπυλών, και εμπίπτουν στα αποδεκτά όρια της μεθόδου. Επίσης, το όριο ποσοτικοποίησης είναι ιδιαίτερα χαμηλό (τιμές Ct = 33 – 35) (Εικόνα 3.19).

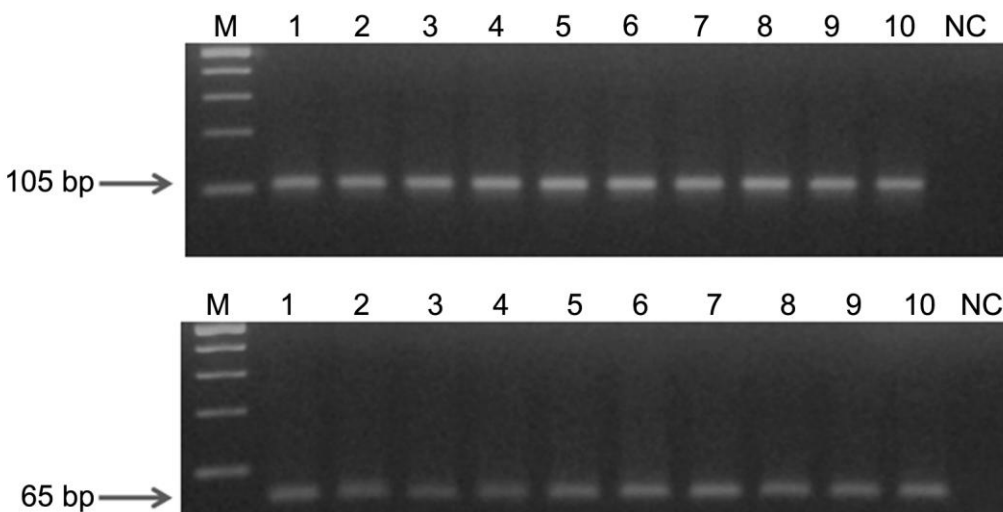


Εικόνα 3.19. Πρότυπες καμπύλες ενίσχυσης των cDNA των μορίων miR-224 και SNORD48.

Όσον αφορά την ειδικότητα των αντιδράσεων, αυτή διασφαλίστηκε μέσω της ανάλυσης καμπυλών τήξης μετά από κάθε αντίδραση ενίσχυσης και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τυχαία επιλεγμένα δείγματα σε πήκτωμα αгарόζης. Στην Εικόνα 3.20 παρατίθενται χαρακτηριστικές καμπύλες τήξης για τα προϊόντα PCR που προήλθαν από την ενίσχυση των cDNAs του SNORD48 (μέρος Α) και του miR-224 (μέρος Β). Η ύπαρξη μίας μοναδικής κορυφής σε κάθε περίπτωση ($T_m = 79,6$ °C, για το SNORD48 και $T_m = 73,3$ °C, για το miR-224) είναι ενδεικτική της ενίσχυσης και της ανίχνευσης των ειδικών προϊόντων. Στην Εικόνα 3.21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε 10 τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστού προστάτη. Παρατηρείται μια μοναδική ζώνη σε κάθε περίπτωση (105 bp για το SNORD48 και 65 bp για το miR-224), γεγονός που επιβεβαιώνει την ενίσχυση των αναμενόμενων, ειδικών προϊόντων στις αντιδράσεις qPCR.



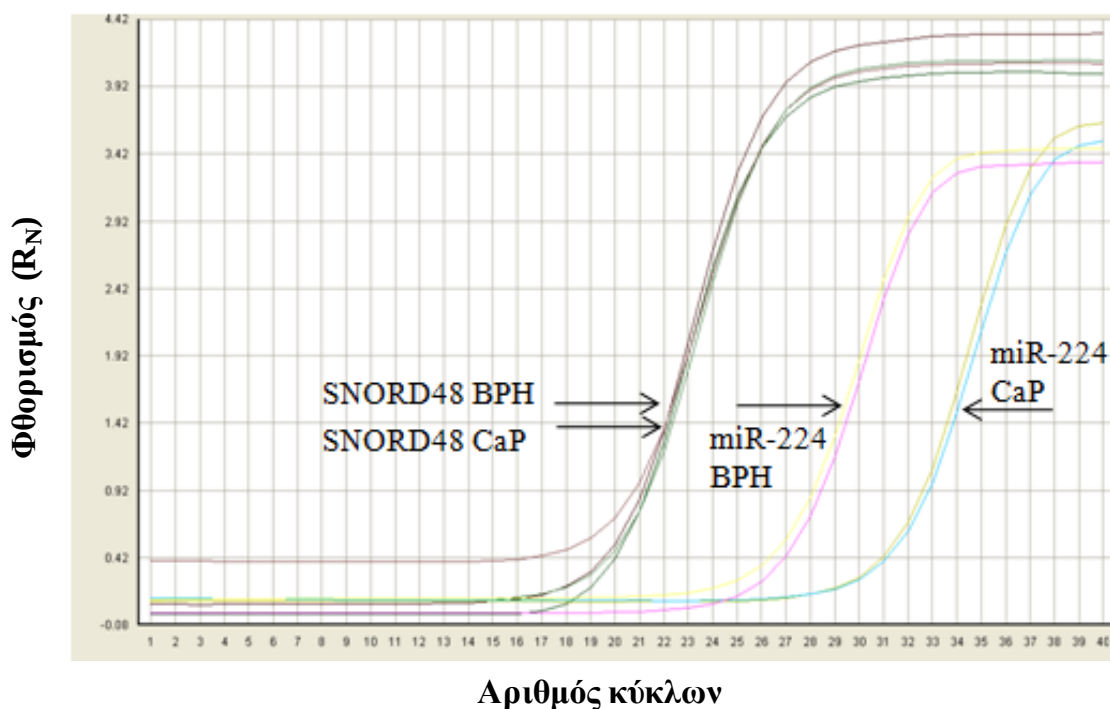
Εικόνα 3.20. Καμπύλες τήξης των προϊόντων των αντιδράσεων qPCR για τα μόρια SNORD48 και miR-224.



Εικόνα 3.21. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3.0% w/v) των προϊόντων PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των cDNAs των μορίων SNORD48 (105 bp) (μέρος A) και miR-224 (65 bp) (μέρος B). 1 – 10: Τυχαία επιλεγμένα δείγματα ιστού προστάτη. M: Πρότυπα μεγέθη DNA (DNA Ladder), NC: Αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O).

Στα πλαίσια του ελέγχου ποιότητας υπολογίστηκε ο συντελεστής μεταβλητότητας (% CV) της μεθόδου προσδιορισμού των επιπέδων miR-224. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης ενός δείγματος σε πολλαπλά αντίγραφα τόσο στην ίδια σειρά αντιδράσεων (intra-run) όσο και μεταξύ διαφορετικών σειρών αντιδράσεων (inter-run). Οι συντελεστές μεταβλητότητας υπολογίστηκαν σε 2,92 % και σε 9,13 % αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκαν δείγματα αρνητικού έλεγχου της αντίδρασης πολυαδενυλίωσης, της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και της αντίδρασης qPCR σε κάθε σειρά προσδιορισμών ενώ χρησιμοποιήθηκε και γενωμικό DNA ως υπόστρωμα. Όλα τα παραπάνω δείγματα ελέγχου δεν παρήγαγαν ανιχνεύσιμες τιμές Ct.

Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση του SNORD48 δε μεταβάλλεται μεταξύ των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία και καρκίνου του προστάτη καθώς και μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του προστάτη διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών (για όλες τις συγκρίσεις η τιμή p ήταν > 0,05). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης για το SNORD48 και το miR-224 σε δείγματα καλοήθους προστατικής υπερπλασίας και καρκίνου προστάτη παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.22.



Εικόνα 3.22. Χαρακτηριστικές καμπύλες ενίσχυσης για το SNORD48 και το miR-224.

3.8 Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης του miR-224 σε όγκους του προστάτη

Μετά τον απαραίτητο έλεγχο ποιότητας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-224, μέσω της μεθόδου της σχετικής ποσοτικοποίησης. Για κάθε δείγμα υπολογίστηκαν οι μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (RQ) με βάση τον τύπο: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{miR-224_{\text{δείγματος ιστού}}} - Ct_{SNORD48_{\text{δείγματος ιστού}}}) - (Ct_{miR-224_{\text{δείγματος βαθμονομητή}}} - Ct_{SNORD48_{\text{δείγματος βαθμονομητή}}})]$.

3.8.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-224 στην καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) και στον καρκίνο του προστάτη (CaP). Προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας

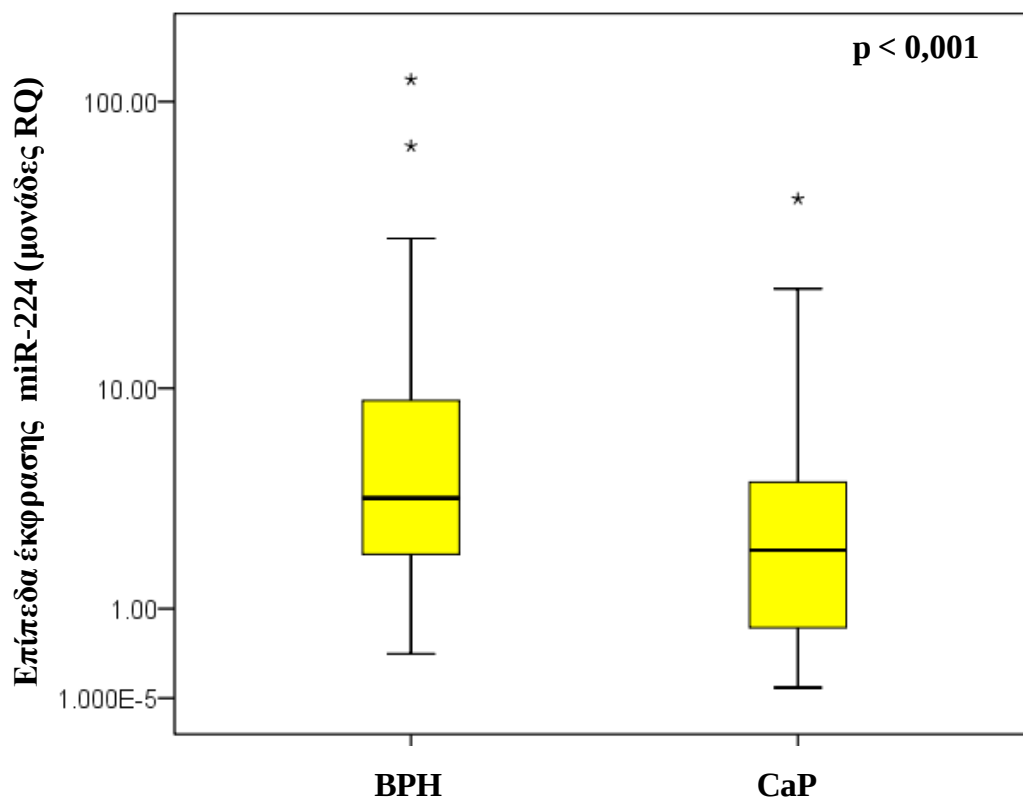
Τα επίπεδα έκφρασης του miR-224 μετρήθηκαν σε 73 δείγματα καρκινικών όγκων προστάτη και 66 δείγματα καλοήθους προστατικής υπερπλασίας. Ακολούθησε σύγκριση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης του miR-224 μεταξύ των δύο ομάδων. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-224 στα προαναφερθέντα δείγματα φαίνονται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-224 στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και στους ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία.

Μεταβλητές	Μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50 (διάμεσος)	75	90
CaP (n = 73)							
Επίπεδα έκφρασης miR-224 (μονάδες RQ)	4,228 ± 0,809	0,086–46,64	0,363	0,707	2,145	4,327	10,32
BPH (n = 66)							
Επίπεδα έκφρασης miR-224 (μονάδες RQ)	8,470 ± 2,09	0,4090–118,7	1,127	1,994	3,706	9,139	15,21

Η έκφραση του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη κυμάνθηκε από 0,086 – 46,64 μονάδες RQ με μέση τιμή $4,228 \pm 0,809$, ενώ στην καλοήγη προστατική υπερπλασία κυμάνθηκε από 0,4090 – 118,7 μονάδες RQ με μέση τιμή $8,470 \pm 2,09$ (Πίνακας 3.8 και Εικόνα 3.23).

Παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-224, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p < 0,001$) στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του προστάτη (διάμεσος τιμή = 2,145 μονάδες RQ), σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία (διάμεσος τιμή = 3,706 μονάδες RQ) (Εικόνα 3.23).

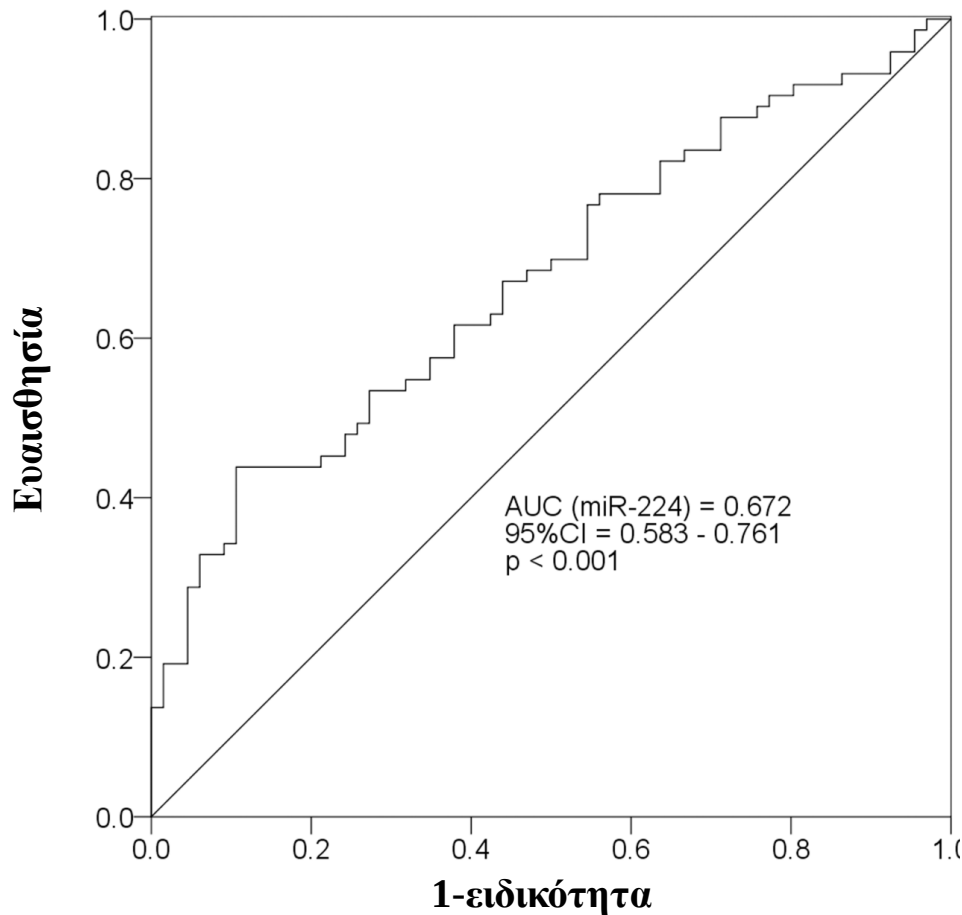


Εικόνα 3.23. Η κατανομή της έκφρασης των επιπέδων miR-224 σε ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και ασθενείς με καρκίνο του προστάτη.

Στη συνέχεια, η έκφραση του miR-224 κατατάχθηκε σε δύο κατηγορίες (θετική ή αρνητική), με βάση τη διάμεσο τιμή. Παρατηρείται μια σημαντική μείωση στη συχνότητα έκφρασης του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη (49,3%) σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία (72,7%) ($p = 0,006$).

Επίσης, παρατηρείται μια ασθενής αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-224 και των επιπέδων του PSA στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη ($r_s = -0,284$, $p = 0,015$), ενώ δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση μεταξύ του miR-224 και της ηλικίας των ασθενών.

Λόγω της σημαντικής μείωσης των επιπέδων του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη, σε σχέση με καλοήγη ογκούς, πραγματοποιήθηκε εκτενής αξιολόγηση της διαφοροδιαγνωστικής τους αξίας μέσω κατασκευής καμπύλης ευαισθησίας-ειδικότητας ROC και ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) για το miR-224 υπολογίστηκε ίση με 0,672 (95% CI = 0,583 – 0,761, $p < 0,001$) (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24. Καμπύλη ευαισθησίας-ειδικότητας ROC για την έκφραση του miR-224.

Μέσω της μονομεταβλητής ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης (Πίνακας 3.9) υπολογίστηκε ότι για κάθε μονάδα λογαριθμικής αύξησης της έκφρασης του miR-224 ο κίνδυνος ύπαρξης καρκίνου του προστάτη μειώνεται κατά 1,9 φορές (95% CI = 0,322–0,884, $p = 0,015$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η προβλεπτική ικανότητα των επιπέδων έκφρασης του miR-224 διατηρείται και σε πολυμεταβλητό επίπεδο [Λόγος πιθανοτήτων (OR) = 0,381, 95% CI = 0,168– 0,864, $p = 0,021$] μετά από διόρθωση για τις τιμές PSA, της ηλικίας των ασθενών και του αποτελέσματος της δακτυλικής εξέτασης, προσφέροντας έτσι πληροφορία η οποία είναι ανεξάρτητη από τους χρησιμοποιούμενους δείκτες ύπαρξης καρκινικού όγκου στον προστάτη (Πίνακας 3.9).

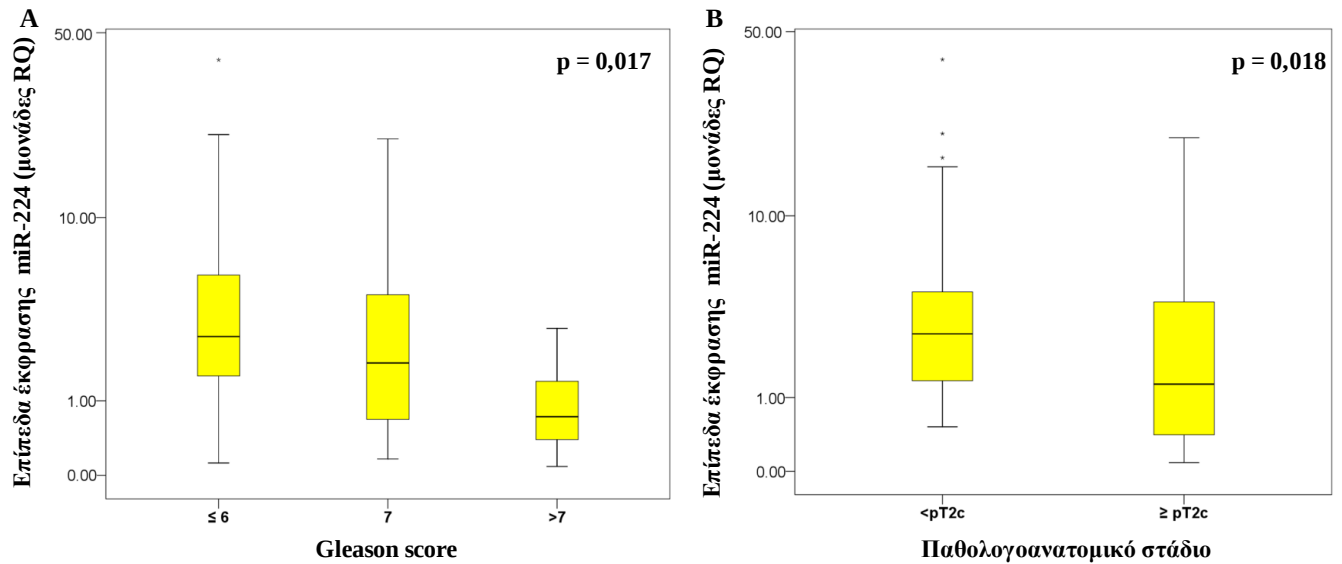
Πίνακας 3.9. Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για την πρόβλεψη ύπαρξης καρκίνου του προστάτη.

Μονομεταβλητή Ανάλυση				Πολυμεταβλητή Ανάλυση			
Μεταβλητή	OR	95% CI	Τιμή p		OR	95% CI	Τιμή p
Log ₁₀ miR-224	0 ,534	0,322–0,884	0 ,015		0 ,381	0,168–0,864	0 ,021
PSA	1 ,10	1,04–1,15	< 0 ,001		1 ,04	0,969–1,12	0 ,274
Ηλικία	22 ,0	5,33–90,8	< 0 ,001		21 ,1	4,63–95,9	< 0 ,001
DRE							
Αρνητική	1 ,00				1 ,00		
Θετική	22 ,0	5,33–90,8	< 0 ,001		21 ,1	4,63–95,9	< 0 ,001

3.8.2 Μελέτη της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-224 και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη

Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ του miR-224 και των διάφορων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

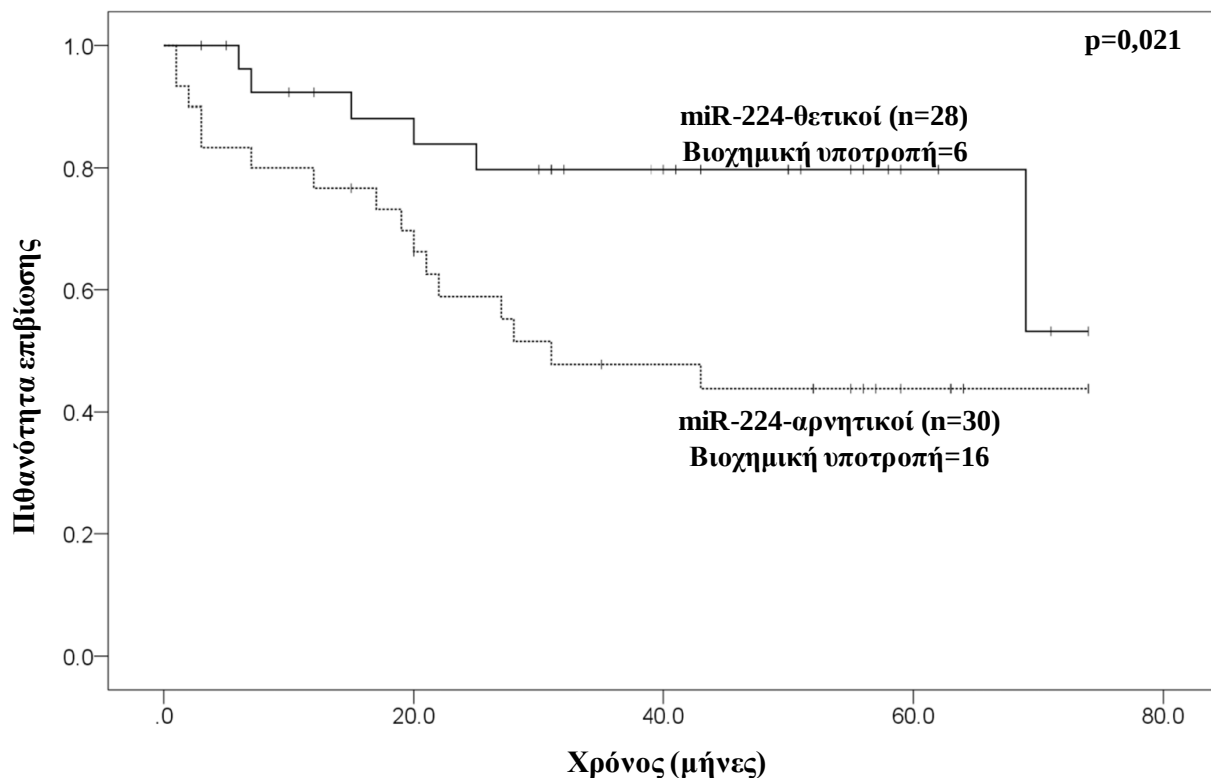
Παρατηρήθηκε μια σημαντική σταδιακή μείωση των επιπέδων miR-224 καθώς αυξάνεται ο βαθμός επιθετικότητας κατά Gleason των καρκινικών όγκων του προστάτη. Πιο αναλυτικά, η διάμεσος τιμή των επιπέδων του miR-224 σε ασθενείς με Gleason Score ≤ 6 υπολογίστηκε ίση με 2,63 μονάδες RQ στους ασθενείς με Gleason score 7 ίση με 1,84 μονάδες RQ, ενώ στους ασθενείς με Gleason score >7 μειώνεται δραματικά στις 0,725 μονάδες RQ ($p = 0,017$) (Εικόνα 3.25 μέρος Α). Επιπρόσθετα, ασθενείς με προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-224 (διάμεσος = 1,27 μονάδες RQ) σε σχέση με ασθενείς πρώιμου σταδίου (διάμεσος = 2,63 μονάδες RQ) ($p = 0,018$) (Εικόνα 3.25, μέρος Β). Η ισχυρή αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του miR-224 με την πρόοδο της νόσου υποδεικνύουν έναν πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο για το συγκεκριμένο miRNA τον καρκίνο του προστάτη ο οποίος εξασθενεί σε προχωρημένα στάδια της νόσου, όπου τα επίπεδά του miR-224 μειώνονται σημαντικά.



Εικόνα 3.25. Η κατανομή των επιπέδων έκφρασης του miR-224 σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη διαφορετικών βαθμών επιθετικότητας (μέρος A) και παθολογοανατομικών σταδίων (μέρος B).

3.8.3 Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του miR-224 και της επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Προσδιορισμός της προγνωστικής τους αξίας

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Εικόνα 3.26) αποδεικνύει ότι ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως θετικοί για την έκφραση του miR-224 (miR-224-θετικοί) παρουσιάζουν μεγαλύτερα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερας νόσου σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως miR-224-αρνητικοί ($p = 0,021$). Η πιθανότητα 5-ετούς επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής για τους miR-224-θετικούς ασθενείς ανέρχεται στο $79,7 \pm 8,1\%$ και είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη πιθανότητα για τους miR-224-αρνητικούς ασθενείς που υπολογίζεται στο $43,8 \pm 9,4\%$.



Εικόνα 3.26. Καμπύλη Kaplan-Meier για την επιβίωση ελευθέρως νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη, θετικούς ή αρνητικούς ως προς την έκφραση του miR-224.

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 3.10) επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του miR-224 ως ενός νέου δείκτη ευμενούς πρόγνωσης στον καρκίνο του προστάτη. Για κάθε μονάδα λογαριθμικής αύξησης της έκφρασης του miR-224 ο κίνδυνος εμφάνισης υποτροπής μειώνεται κατά 3,2 φορές ($HR = 0,314$, $0,118 - 0,712$, $95\%CI = 0,322 - 0,884$, $p = 0,013$). Ωστόσο, η πολυμεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης, που πραγματοποιήθηκε με προσαρμογή για τις τιμές των μεταβλητών Gleason score, παθολογοανατομικό στάδιο και επίπεδα PSA έδειξε ότι η προγνωστική πληροφορία που παρέχεται από τα επίπεδα του miR-224 όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών δεν είναι ανεξάρτητη από αυτή που προσφέρουν οι συμβατικοί προγνωστικοί δείκτες όπως είναι το Gleason Score και το παθολογοανατομικό στάδιο (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10. Η προγνωστική αξία της έκφρασης του miR-224 σε επίπεδο mRNA.

Μονομεταβλητή ανάλυση				Πολυμεταβλητή ανάλυση		
Μεταβλητή	HR	95% CI	Τιμή p	HR	95% CI	Τιμή p
Log ₁₀ miR-224	0,314	0,118 – 0,712	0,013	0,635	0,137 – 2,39	0,525
Gleason score	2,41	1,51 – 6,02	< 0,001	2,054	0,975 – 4,91	0,022
Στάδιο	1,47	1,10 – 2,13		0,978	0,557 – 2,17	0,917
PSA	1,13	1,02 – 1,32		1,076	0,866 – 1,28	0,143

3.9 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του miR-224 με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου στόχου του, *KLK15*

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής προτείνουν ότι η έκφραση του γονιδίου *KLK15* σε επίπεδο mRNA είναι σημαντικά αυξημένη στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με καλοήθεις όγκους. Επιπρόσθετα, η έκφρασή του εν λόγω γονιδίου σχετίζεται με όγκους προχωρημένου σταδίου και με δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το miR-224, το οποίο στοχεύει το γονίδιο *KLK15*, παρουσιάζει ένα αντίστροφο πρότυπο έκφρασης. Το miR-224 ανιχνεύεται σε μειωμένα επίπεδα στους καρκινικούς σε σχέση με τους καλοήθεις όγκους. Επιπλέον, η έκφραση του miR-224 μειώνεται σε περισσότερο επιθετικούς καρκινικούς όγκους και σε όγκους προχωρημένου σταδίου και αποτελεί δείκτη ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, διερευνήθηκε αν υφίσταται κάποια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* και των επιπέδων του miR-224.

3.9.1 Συσχέτιση σε καρκινικές σειρές προστάτη

Σε πρώτο στάδιο, μελετήθηκε η έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* και του miR-224 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη μέσω qPCR. Το γονίδιο *KLK15* βρέθηκε να εκφράζεται, σε επίπεδο mRNA, στην καρκινική κυτταρική σειρά DU145, ενώ δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του καρκινική κυτταρική σειρά PC-3. Αντίστροφα, το miR-224 βρέθηκε να εκφράζεται στα κύτταρα PC-3 και όχι στα κύτταρα DU145. Ωστόσο, και τα δύο μόρια

ανιχνεύτηκαν στην ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά LNCaP (Πίνακας 3.11). Τα παραπάνω δεδομένα είναι ενδεικτικά μιας αρνητικής σχέσης μεταξύ της έκφρασης του miR-224 και του γονιδίου *KLK15* στις ορμονοανεξάρτητες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη.

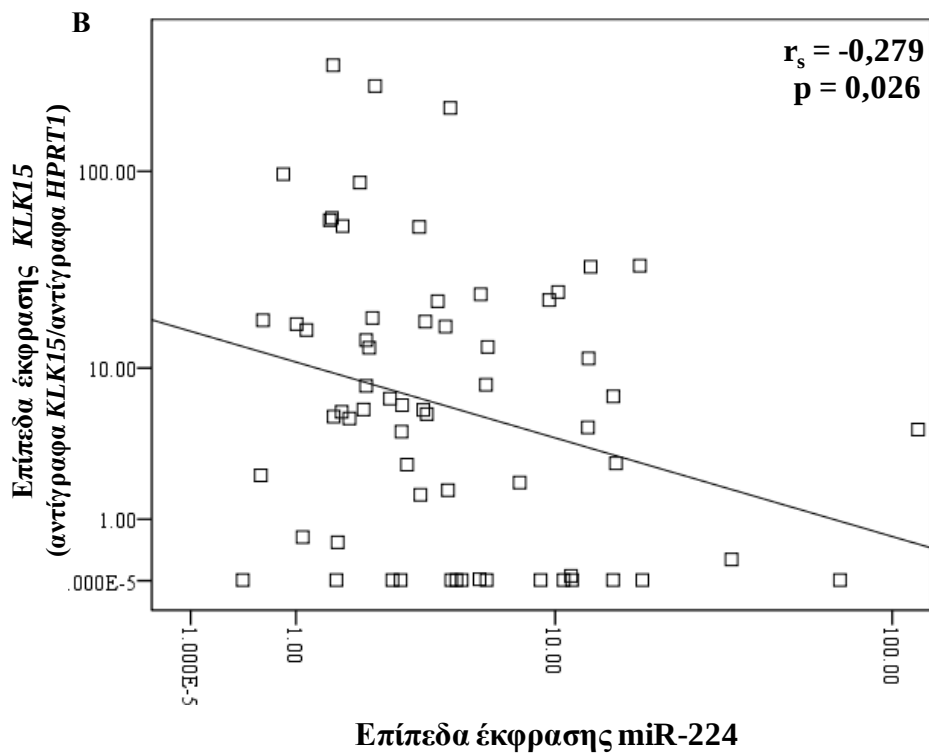
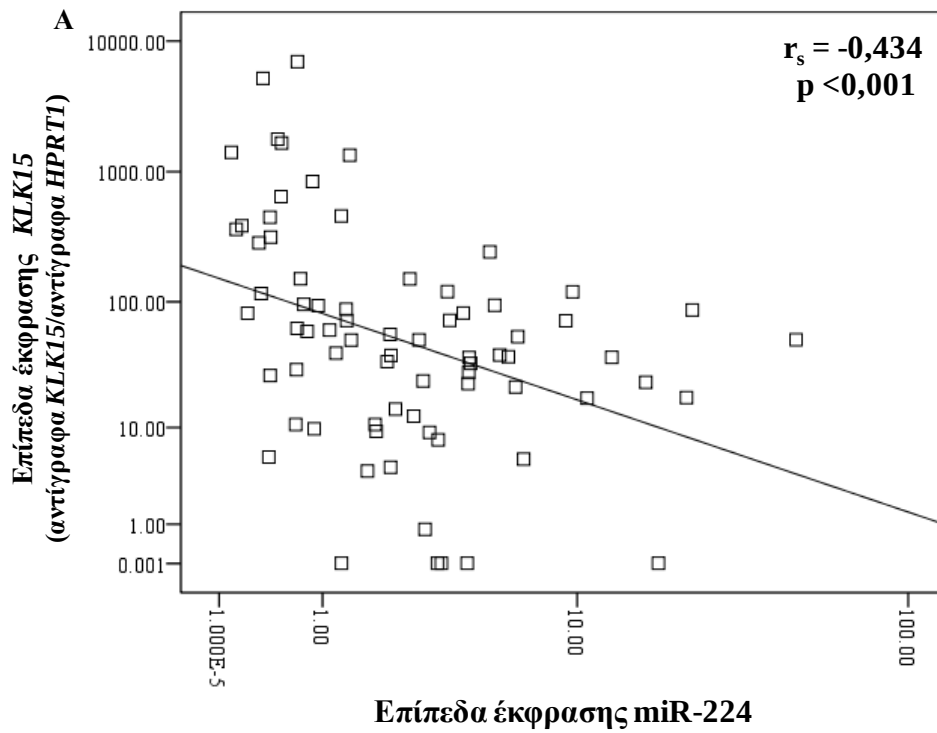
Πίνακας 3.11. Η έκφραση του miR-224 και του γονιδίου στόχου του, *KLK15* στις κλασικές καρκινικές σειρές προστάτη.

Καρκινικές σειρές προστάτη	Έκφραση miR-224	Έκφραση <i>KLK15</i>
<i>Ανδρογόνο-ανεξάρτητες</i>		
PC-3	Παρουσία	Απουσία
DU145	Απουσία	Παρουσία
<i>Ανδρογόνο-εξαρτώμενη</i>		
LNCaP	Παρουσία	Παρουσία

3.9.2 Συσχέτιση σε δείγματα ιστού από όγκους προστάτη

Η σχέση μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK15* και του miR-224 μελετήθηκε, επιπρόσθετα, στην ομάδα των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία και στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική και ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* και των επιπέδων miR-224 στον καρκίνο του προστάτη ($r_s = -0,434$ $p < 0,001$) (Εικόνα 3.27, μέρος Α). Η αρνητική αυτή συσχέτιση παρατηρήθηκε και στους καλοήθεις όγκους του προστάτη, ωστόσο ήταν αρκετά ασθενέστερη ($r_s = -0,279$ $p = 0,026$) (Εικόνα 3.27, μέρος Β). Οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι ενδεικτικές της ρυθμιστικής επίδρασης του miR-224 στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο του προστάτη *in vivo*.



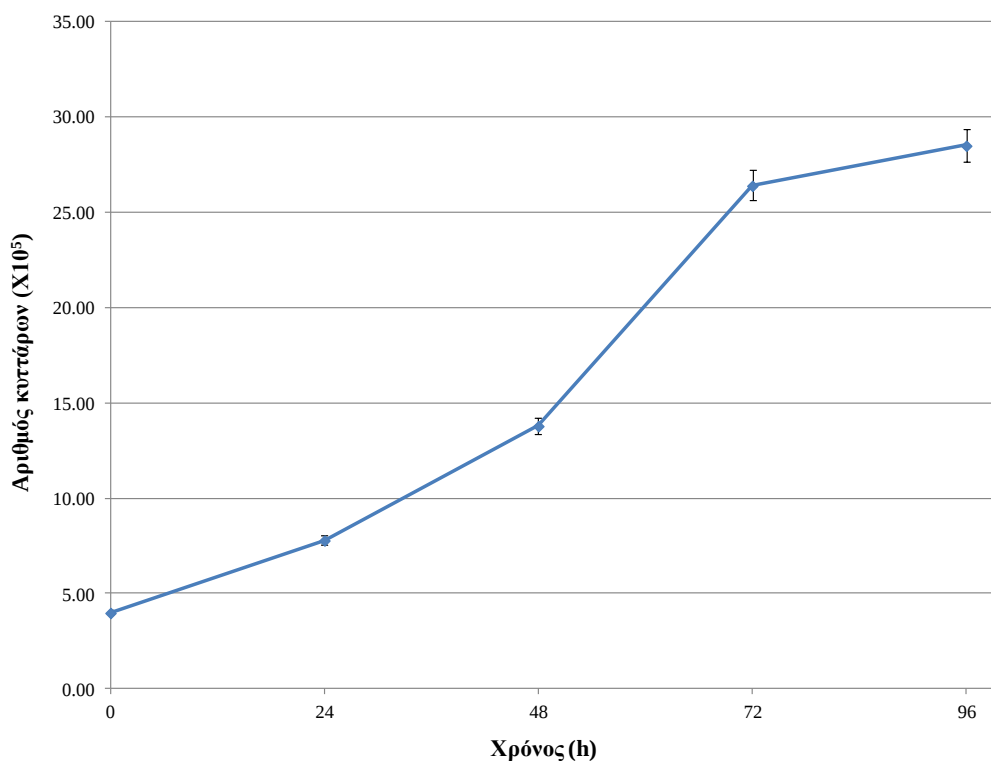
Εικόνα 3.27. Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων *KLK15*-*miR-224* στον καρκίνο του προστάτη (μέρος A) και την καλοήγη προστατική υπερπλασία (μέρος B).

3.10 Μελέτη της επίδρασης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στην καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145

Η κυτταρική σειρά DU145 επιλέχθηκε ως μοντέλο διερεύνησης της επίδρασης των κυτταροστατικών φαρμάκων docetaxel και mitoxantrone, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της επιθετικής, μη ανταποκρινόμενης στα ανδρογόνα νόσου, στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά επιλέχθηκε μεταξύ των κλασικών κυτταρικών σειρών προστάτη γιατί χαρακτηρίζεται από απουσία λειτουργικού υποδοχέα ανδρογόνων και εκφράζει τα υπό μελέτη γονίδια σε επίπεδα που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μέσω της αναπτυχθείσας μεθόδου qPCR.

3.10.1 Προσδιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας της κυτταρικής σειράς DU145

Σε ένα αρχικό στάδιο, κατασκευάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης (0 – 72 h) των κυττάρων DU145, με σκοπό τη διερεύνηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας. Τα κύτταρα DU145 εμφυτεύτηκαν σε συγκέντρωση 4×10^4 κύτταρα/mL και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24, 48, 72 και 96 h σε σταθερές συνθήκες σε αντίστοιχες φιάλες καλλιέργειας (37°C και 5% CO₂). Για κάθε χρονικό σημείο μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων μέσω αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer. Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη των κυττάρων παραμένει σε εκθετική φάση μέχρι τις 72 h (Εικόνα 3.28).



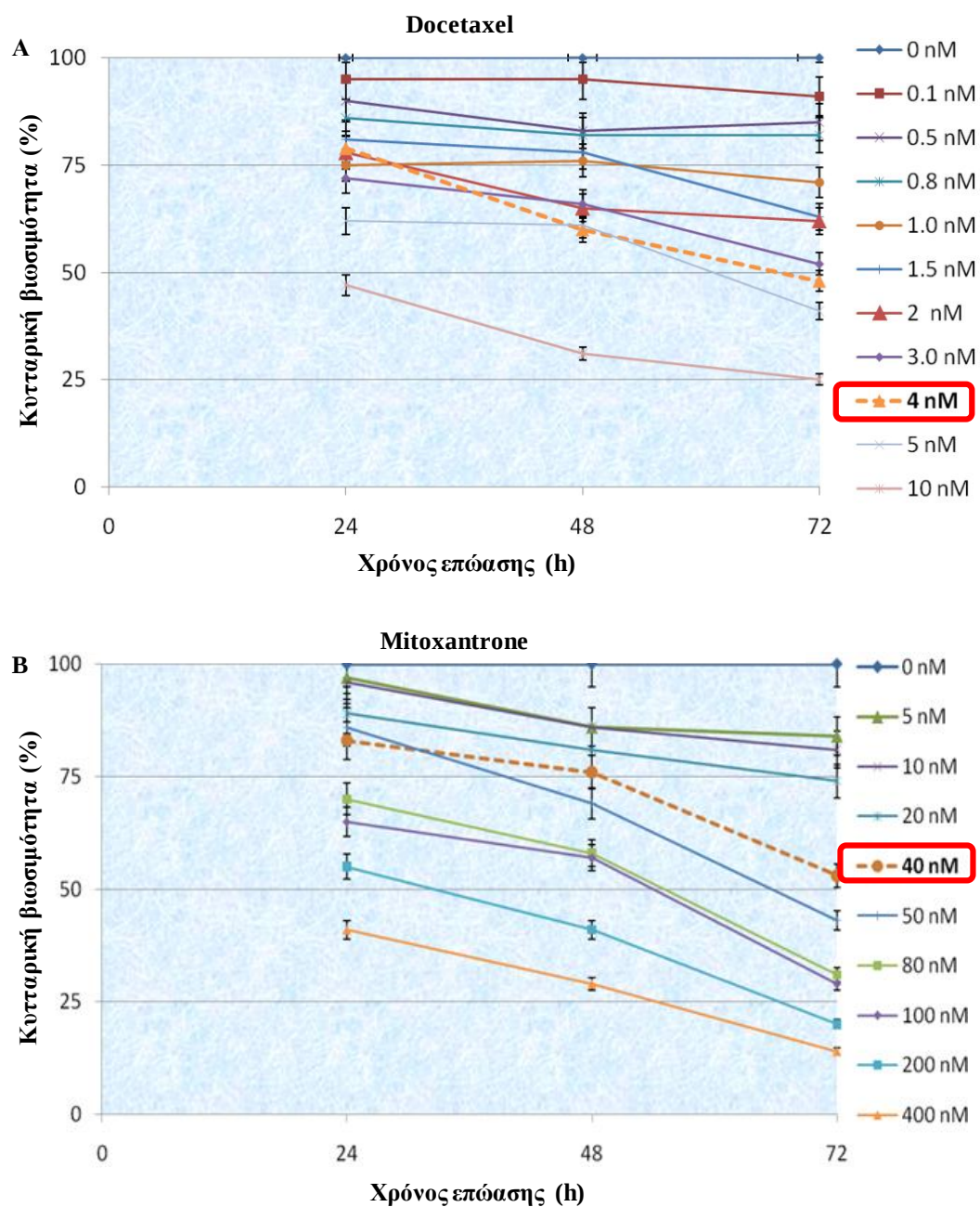
Εικόνα 3.28. Καμπύλη αύξησης των κυττάρων DU145 στις χρονικές περιόδους των 24, 48, 72 και 96 h.

3.10.2 Διερεύνηση της βιωσιμότητας της καρκινικής κυτταρικής σειράς προστάτη DU145 παρουσία των χημειοθεραπευτικών παραγόντων docetaxel και mitoxantrone

Η διερεύνηση της βιωσιμότητας των κυττάρων DU145 παρουσία των αντικαρκινικών φαρμάκων docetaxel και mitoxantrone πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου MTT.

Τα κύτταρα DU145 επώαστηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του κάθε φαρμάκου για 24, 48 και 72 h. Μετά τη λήξη κάθε χρονικού σημείου προστέθηκε το αντιδραστήριο MTT και ακολούθησε ο υπολογισμός του % ποσοστού των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης. Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαρμάκων με τοξική δράση για το ήμισυ του πληθυσμού των κυττάρων (IC₅₀) σε 72 h. Στην Εικόνα 3.29 παρουσιάζονται οι καμπύλες βιωσιμότητας για κάθε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (0,1 – 10 nM για το docetaxel και 5,0 – 400 nM για το mitoxantrone). Παρατηρείται ότι οι χημειοθεραπευτικές ουσίες docetaxel και mitoxantrone δρουν μέσω ενός χρόνο- και δόσο- εξαρτώμενου μηχανισμού, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προστάτη μειώνεται παράλληλα με

την αύξηση των συγκεντρώσεων και των χρονικών διαστημάτων επώασης των αντικαρκινικών ουσιών.

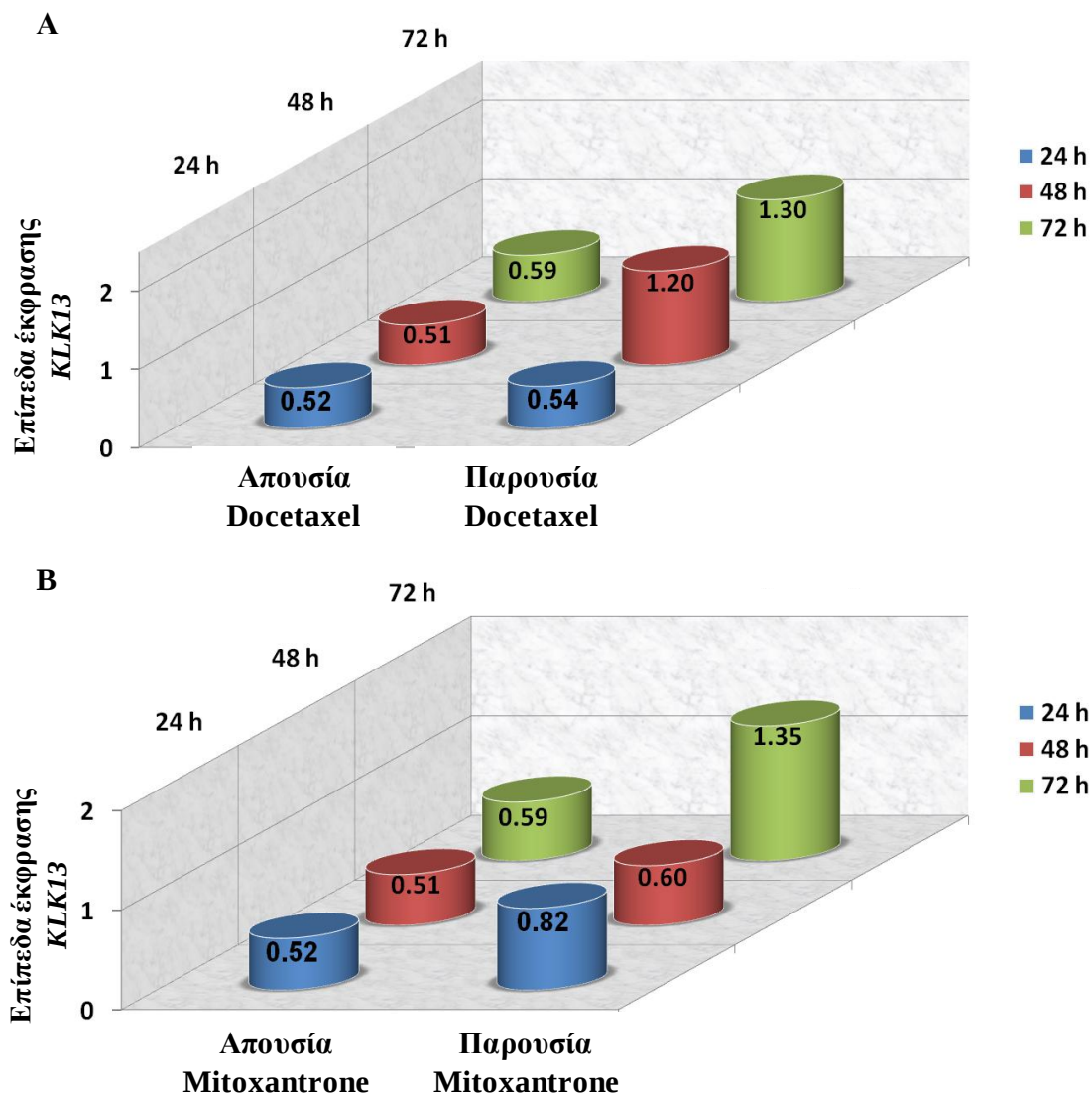


Εικόνα 3.29. Καμπύλες βιωσιμότητας, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT, της κυτταρικής σειράς προστάτη DU145 υπό την επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων docetaxel (μέρος A) και mitoxantrone (μέρος B). Οι συγκεντρώσεις που σημειώνονται, και επιλέχθηκαν για τη συνέχεια της μελέτης, ήταν τοξικές για το ήμισυ του κυτταρικού πληθυσμού.

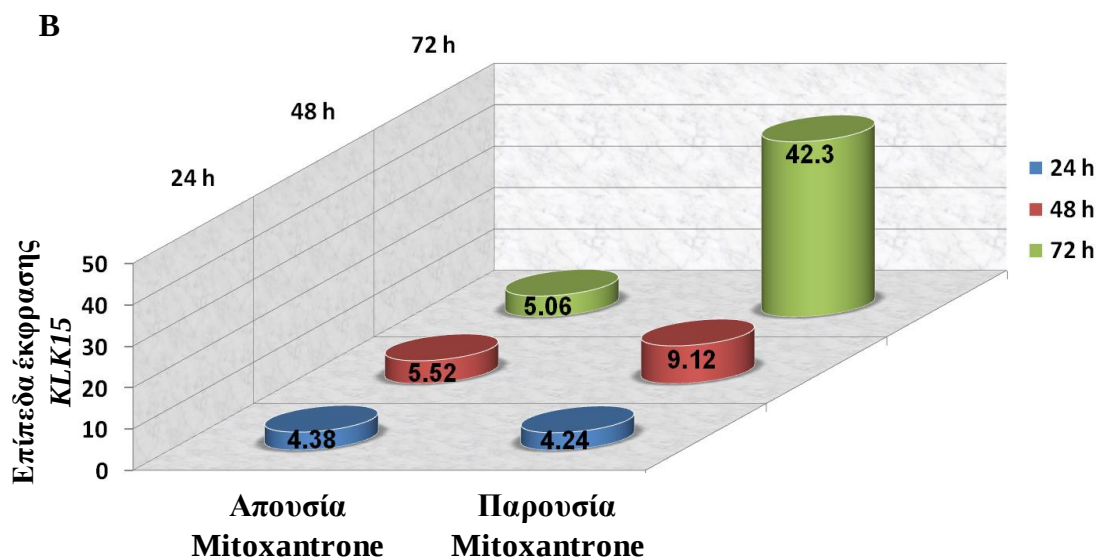
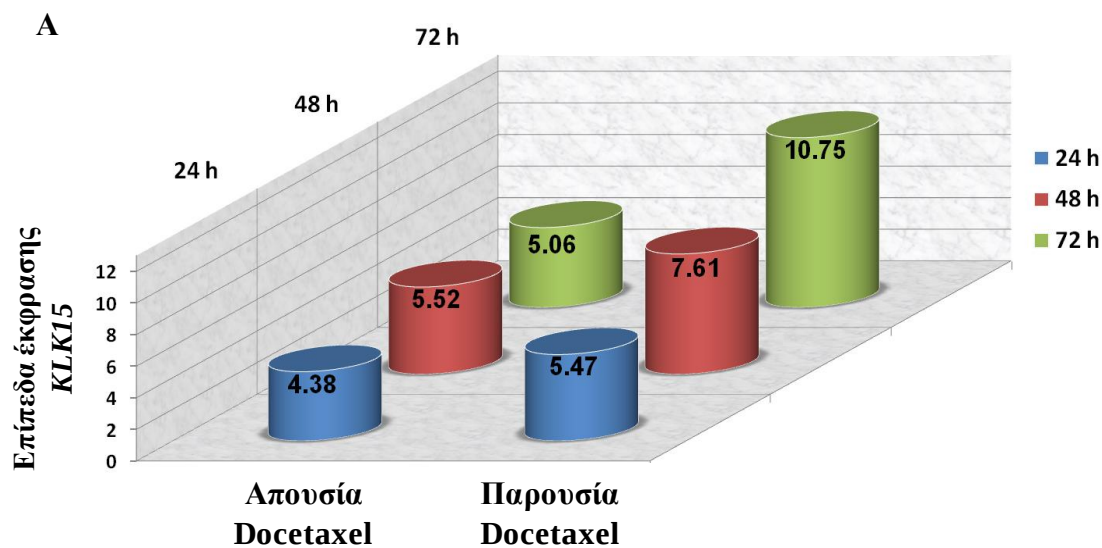
Η τιμή της συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο IC₅₀ για το docetaxel ήταν τα 4 nM και για το mitoxantrone τα 40 nM (Εικόνα 3.29). Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν για τη συνέχεια της μελέτης, όπου τα κύτταρα DU145 καλλιεργήθηκαν σε φιάλες καλλιέργειας παρουσία και απουσία των αντικαρκινικών φαρμάκων. Μέσω αυτής της προσέγγισης υπολογίστηκε η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων υπό την επίδραση των κυτταροστατικών ουσιών και βρέθηκε να είναι ανάλογη της κυτταρικής βιωσιμότητας, καθώς και η παρουσία νεκρωτικών φαινομένων που χαρακτηρίζονται ως περιορισμένα (<10% του κυτταρικού πληθυσμού). Παράλληλα, σε κάθε χρονικό διάστημα απομονώθηκε ολικό RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή cDNA και την ανάλυση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*, μέσω της αναπτυχθείσας μεθόδου της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο.

3.10.3 Μελέτη της μεταβολής της έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* στην καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145, υπό την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων

Η μέθοδος ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, τα χαρακτηριστικά της οποίας περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 2.9.3 και 3.4, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των μεταβολών που προκάλεσε η παρουσία των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η κανονικοποιημένη έκφραση των κλασικών μεταγράφων των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* σε καρκινικά κύτταρα προστάτη που αναπτύχθηκαν παρουσία των αντικαρκινικών ουσιών docetaxel (4 nM) και mitoxantrone (40 nM) για 24, 48 και 72 h, καθώς και στον αντίστοιχο κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου ο οποίος αποτελούνταν από κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία των συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.30 και 3.31 αντίστοιχα. Οι παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων προστάτη, οι οποίες περιγράφηκαν αναλυτικά προηγουμένως, συνοδεύονται και από αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Τα επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων παρέμειναν αμετάβλητα στον κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου κατά τη διάρκεια των μελετώμενων χρονικών διαστημάτων.



Εικόνα 3.30. Η επίδραση των αντικαρκινικών ουσιών docetaxel (A) και mitoxantrone (B) στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK13*. Οι κύλινδροι αντιπροσωπεύουν τις τιμές των λόγων αντίγραφα *KLK13*/αντίγραφα *HPRT1*, τόσο για τα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με τις συγκεκριμένες χημειοθεραπευτικές ουσίες όσο και για κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν κάποια κατεργασία και αποτελούν τον κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου, για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.



Εικόνα 3.31. Η επίδραση των αντικαρκινικών ουσιών docetaxel (A) και mitoxantrone (B) στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15*. Οι κύλινδροι αντιπροσωπεύουν τις τιμές αντίγραφα *KLK15*/αντίγραφα *HPRT1*, τόσο για τα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με τις συγκεκριμένες χημειοθεραπευτικές ουσίες όσο και για κύτταρα τα αποτελούν τον κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου, για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.

Όσον αφορά το γονίδιο *KLK13* (Εικόνα 3.30), τα επίπεδα έκφρασής του μετά από 24 h επώασης με τη χημειοθεραπευτική ουσία docetaxel παρέμειναν αμετάβλητα. Ωστόσο, μετά από 48 h επώασης παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK13* κατά 2,35 φορές σε σχέση με τον αντίστοιχο κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου. Η αυξητική τάση φαίνεται να διατηρείται και στις επόμενες 24 h όπου τα επίπεδα του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK13* παραμένουν σε υψηλά επίπεδα (2,20 φορές) (Εικόνα 3.30, μέρος Α). Η χημειοθεραπευτική ουσία mitoxantrone επηρέασε και αυτή την έκφραση του γονιδίου *KLK13*, ωστόσο ένα διαφορετικό πρότυπο παρατηρήθηκε σε αυτή την περίπτωση. Τις πρώτες 24 h επώασης παρατηρήθηκε μια περιορισμένης έκτασης αύξηση (1,6 φορές) ενώ τις επόμενες 24 h δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή. Η σημαντικότερη μεταβολή (αύξηση 2,3 φορές σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου) παρατηρήθηκε μετά από 72 h επώασης (Εικόνα 3.30, μέρος Β).

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* (Εικόνα 3.31), παρατηρήθηκαν πιο έντονες μεταβολές, ιδιαίτερα στην περίπτωση της επώασης των καρκινικών κυττάρων με την αντικαρκινική ουσία mitoxantrone (Εικόνα 3.31, μέρος Β). Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων προστάτη παρουσία του mitoxantrone συνοδεύτηκε από μια σταδιακή μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* η οποία ξεκίνησε να εκδηλώνεται μετά από 48 h επώασης (αύξηση 1,65 φορές) και κορυφώθηκε τις επόμενες 24 h με μια δραματική αύξηση της τάξης των 8,35 φορές. Η χημειοθεραπευτική ουσία docetaxel επέδρασε και αυτή, αλλά σε περισσότερο ήπιο βαθμό, στην έκφραση του γονιδίου *KLK15* και μόνο μετά από 72 h επώασης, καθώς στα πρώτα δύο χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν (24 h, 48 h) δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου χρονικού σημείου (72 h επώασης) επώασης με docetaxel παρατηρήθηκε αύξηση 2,12 φορές στα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* (Εικόνα 3.31, μέρος Α).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα γονίδια των καλλικρεϊνών *KLK13* και *KLK15* πιθανώς εμπλέκονται στο μηχανισμό ανταπόκρισης των ορμονοανεξάρτητων κυττάρων προστάτη στην παρουσία κυτταροστατικών ουσιών. Επιπλέον, η μελέτη του προφίλ έκφρασης των γονιδίων αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει στην εύρεση πιθανών μοριακών δεικτών παρακολούθησης της ανταπόκρισης της χημειοθεραπείας στον καρκίνο του προστάτη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής είχε ως σκοπό την ανάλυση της έκφρασης και τη μελέτη των καλλικρεϊνών *KLK13*, *KLK15* καθώς και του miR-224 που στοχεύει το γονίδιο *KLK15*, στον καρκίνο του προστάτη, μέσω ανάπτυξης ευαίσθητων μοριακών μεθοδολογιών. Η προσέγγιση αυτή είχε απώτερο στόχο την κλινική αξιολόγηση των παραπάνω, σχετιζόμενων με τον καρκίνο, μορίων ως νέων βιοδεικτών για τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη, καθώς και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών που φέρουν τη νόσο.

Για την εκπλήρωση των στόχων αυτών, αρχικά, πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία (ομογενοποίηση, απομόνωση ολικού RNA ή/και πρωτεΐνης) ενός στατιστικά σημαντικού μεγέθους δείγματος καρκινικών και καλοηθών ιστών προστάτη (n = 150). Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης των κλασικών και εναλλακτικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK15* και *KLK13*, σε ιστούς και καρκινικές σειρές προστάτη, μέσω συμβατικής PCR, καθώς και ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης *KLK13* σε ιστούς προστάτη. Ακολούθησε σχεδιασμός, ανάπτυξη και έλεγχος ποιότητας μεθόδων ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για την ανάλυση της έκφρασης των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK15* και *KLK13* μέσω ειδικών ανιχνευτών TaqMan. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εν λόγω μεταγράφων στους μελετώμενους ιστούς προστάτη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός, ανάπτυξη και έλεγχος ποιότητας της μεθόδου qPCR που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του miR-224, μέσω της χρήσης της χρωστικής SYBR Green. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του miR-224 σε ιστούς και καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη. Η διερεύνηση της διαφοροδιαγνωστικής και της προγνωστικής αξίας των γονιδίων των καλλικρεϊνών *KLK13*, *KLK15* και του miR-224 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκτενούς βιοστατιστικής ανάλυσης. Επιπρόσθετα, έλαβε χώρα η ανάλυση της επίδρασης χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της ορμονοανεξάρτητης-επιθετικής νόσου (docetaxel, mitoxantrone), στη βιωσιμότητα της ορμονοανεξάρτητης καρκινικής κυτταρικής σειράς προστάτη DU145 και στην έκφραση των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*.

Ο καρκίνος του προστάτη (CaP) εξακολουθεί να αντιπροσωπεύει ένα ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως. Στις ανεπτυγμένες χώρες, αποτελεί την πιο συχνή νεοπλασία στον ανδρικό πληθυσμό καθώς και την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο [1, 3]. Η έγκαιρη διάγνωση είναι βαρύνουσας σημασίας όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πιθανότητες επιβίωσης ενός ατόμου που θα διαγνωστεί με αρχικά στάδια της νόσου αγγίζουν το 96%. Τα ποσοστά θεραπείας του προστατικού καρκίνου είναι εξαιρετικά υψηλά στην περίπτωση που ανιχνεύεται ενώ είναι εντοπισμένος στον προστάτη αδένα [1-3, 18]. Οι κύριες θεραπευτικές στρατηγικές που ακολουθούνται περιλαμβάνουν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, τη θεραπεία με ακτινοβολία του όγκου και την ορμονοθεραπεία με τη χορήγηση αντιανδρογόνων [37]. Ενώ ο καρκίνος του προστάτη στα αρχικά στάδια της νόσου είναι ευαίσθητος στη χορήγηση ορμονοθεραπείας, σε προχωρημένα στάδια εξελίσσεται σε μια ιδιαίτερα επιθετική μορφή που ονομάζεται ορμονοανεξάρτητος, ή ανθεκτικός στον ενουχισμό, καρκίνος του προστάτη (CRPC) και παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένη θνησιμότητα. Σε αυτό το στάδιο, η χορήγηση χημειοθεραπείας, αποτελεί τη μόνη αποτελεσματική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, οι χημειοθεραπευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι το docetaxel και το mitoxantrone [14, 45, 47, 48].

Κυρίαρχο ρόλο στο τομέα της διάγνωσης των προστατικών νεοπλασιών κατέχει το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA/KLK3). Το PSA θεωρείται ως ο πιο αποτελεσματικός καρκινικός δείκτης που έχει εφαρμοστεί, μέχρι σήμερα, στην κλινική πράξη. Η American Cancer Society ανέφερε ότι το ποσοστό της νόσου που εντοπίστηκε σε προχωρημένα μεταστατικά στάδια το 2009 ήταν μόλις 4,0%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό το 1990 έφτανε το 20,6%. Επιπρόσθετα, μια μεγάλης έκτασης ευρωπαϊκή μελέτη για τον καρκίνο του προστάτη (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer- ESPRC) αναφέρει ότι από τη στιγμή που εισάχθηκε η χρήση του PSA στην κλινική πράξη, έχει παρατηρηθεί μείωση της θνησιμότητας της νόσου κατά 31% [13, 25, 26, 68]. Από την άλλη πλευρά, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια κριτική στάση απέναντι στη χρήση του PSA, η οποία εστιάζει στα μειονεκτήματά του που πηγάζουν κυρίως από τη μειωμένη ειδικότητα που παρουσιάζει ως βιοδείκτης. Η μειωμένη ειδικότητα του PSA οφείλεται στο γεγονός ότι αυξημένα επίπεδα του μορίου αυτού είναι δυνατόν να ανιχνευτούν και στο αίμα ασθενών που πάσχουν από καλοήγη προστατική υπερπλασία (BPH) ή προστατίτιδες και όχι αποκλειστικά σε άτομα που νοσούν από καρκίνο του προστάτη. Αυτό συμβαίνει γιατί όλες οι παθολογικές καταστάσεις που προαναφέρθηκαν έχουν ως αποτέλεσμα

την καταστροφή της αρχιτεκτονικής του προστάτη αδένος με επακόλουθο τα μόρια του PSA να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου και ανιχνεύονται σε υψηλά επίπεδα. Επομένως, οι αυξημένες τιμές του PSA που παρατηρούνται στην καλοήγη υπερπλασία και στις προστατίτιδες μειώνουν σημαντικά τη διαγνωστική του ειδικότητα. Επιπρόσθετα, το PSA δεν έχει την ικανότητα να διαχωρίζει επαρκώς τους «κλινικά ασήμαντους» όγκους που δε χρειάζονται ριζική θεραπεία από τους επιθετικούς οι οποίοι χρήζουν δραστικής αντιμετώπισης. Το αποτέλεσμα είναι πολλά άτομα που δεν πάσχουν από επιθετικό καρκίνο του προστάτη να οδηγούνται άσκοπα σε λάθος θεραπευτικούς χειρισμούς [9, 28, 30]. Παρά τα μειονεκτήματά του, το PSA συνεχίζει να αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη. Ωστόσο, έχουν προταθεί συγκεκριμένες βελτιώσεις στην εφαρμογή του όπως είναι η μέτρηση ελεύθερου/ολικό PSA, η χρήση διορθωμένων τιμών αναφοράς ανάλογα με την ηλικία και η παρακολούθηση μεταβολής του PSA με την πάροδο του χρόνου. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η παράλληλη εισαγωγή νέων μοριακών δεικτών, όπως το καρκινικό προστατικό αντιγόνο 3-PCA3 και η καλικρεΐνη 2, μπορεί να βοηθήσει στη λήψη ορθότερων αποφάσεων όσον αφορά τη διαχείριση της νόσου του καρκίνου του προστάτη [27, 77, 87].

Η πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη βασίζεται κυρίως στην εκτίμηση του βαθμού αποδιαφοροποίησης των αδενίων του προστάτη (Gleason score), που αποτελεί ένα μέτρο επιθετικότητας της νόσου, στις μετρήσεις των επιπέδων του PSA, στην παθολογοανατομική σταδιοποίηση του όγκου και στην εκτίμηση των χειρουργικών περιθωρίων (surgical margins). Οι προαναφερθέντες παράγοντες μπορούν να προβλέψουν τη βιοχημική υποτροπή της νόσου, η οποία ορίζεται ως μια επιμένουσα αύξηση της τιμής του PSA, πάνω από ένα όριο, μετά τη θεραπεία. Η βιοχημική υποτροπή προηγείται της κλινικής υποτροπής του καρκίνου του προστάτη και σηματοδοτεί την περεταίρω πρόοδο της νόσου [10, 31, 39, 66, 71]. Ωστόσο, οι προγνωστικοί δείκτες που αναφέρθηκαν δεν είναι ικανοί να προσφέρουν μια έγκαιρη και αξιόπιστη πρόγνωση για τον καρκίνο του προστάτη. Επιπρόσθετα, απέχουν αρκετά από το να παράσχουν εξατομικευμένη πληροφορία για κάθε ασθενή ή για συγκεκριμένες ομάδες ασθενών, ούτως ώστε να ακολουθηθούν οι κατάλληλες θεραπευτικές στρατηγικές. Επιπρόσθετα, ο μόνος δείκτης που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της χημειοθεραπευτικής πορείας των ασθενών είναι το PSA. Ωστόσο, το PSA, όπως και στην περίπτωση της διάγνωσης της νόσου, εμφανίζει σημαντικές αδυναμίες, καθώς σε πολλές περιπτώσεις δεν παρουσιάζονται σαφείς μεταβολές του PSA με τη θεραπεία [75, 76, 235].

Από τα παραπάνω δεδομένα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη είναι αναγκαία η εύρεση νέων, βελτιωμένων μοριακών δεικτών διάγνωσης, πρόγνωσης και παρακολούθησης των θεραπευτικών χειρισμών. Αυτοί οι μοριακοί δείκτες μπορούν να αναζητηθούν στη γονιδιακή οικογένεια των καλλικρεϊνών του ανθρώπου, η οποία έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία ως μια πλούσια πηγή καρκινικών δεικτών [236].

Οι καλλικρεΐνες αποτελούν μια οικογένεια από 15 διαφορετικά γονίδια εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης, με υψηλό βαθμό ομόλογων αλληλουχιών, που εδράζονται, στον άνθρωπο, στο χρωμόσωμα στο χρωμόσωμα 19q13.3-13.4 [89, 90]. Η έκφραση τους καλύπτει μεγάλο εύρος ιστών και ρυθμίζεται κυρίως από στεροειδείς ορμόνες. Ο φυσιολογικός ρόλος των καλλικρεϊνών είναι ιδιαίτερα ευρύς και περιλαμβάνει διεργασίες από την ανάπτυξη του εξωκυττάριου χώρου ως τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος. Ωστόσο, μεταβολές της έκφρασης των καλλικρεϊνών έχουν συνδεθεί επανειλημμένως με τις ανθρώπινες νεοπλασίες. Οι καλλικρεΐνες εμπλέκονται στην αρχική δημιουργία του όγκου, ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, στην αγγειογένεση, ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ των μορίων ενεργοποιητών και αναστολέων του φαινομένου, καθώς και στην τοπική διήθηση και στη μετάσταση, ρυθμίζοντας την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή των καρκινικών κυττάρων και την πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας [101, 104, 109].

Στον καρκίνο του προστάτη, η έκφραση των γονιδίων *KLK2*, *KLK3*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13*, *KLK14*, *KLK15* σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης απορρυθμίζεται σε σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών, οι *KLK2*, *KLK3*, *KLK4* και *KLK11*, μπορούν να διασπάσουν τις πρωτεΐνες IGFBP και να αυξήσουν τα επίπεδα των διαθέσιμων IGF στο μικροπεριβάλλον του προστατικού όγκου, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό, ενώ παράλληλα αναστέλλουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, οι καλλικρεΐνες *KLK2* και *KLK4*, οι οποίες υπερκεράζονται στον καρκίνο του προστάτη, ενεργοποιούν τους υποδοχείς PAR1 και PAR2 και επάγουν, με τον τρόπο αυτό, την ανάπτυξη των προστατικών καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η *KLK4* προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη μέσω της ρύθμισης γονιδίων του κυτταρικού κύκλου και η *KLK3* επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου σε προστατικά καρκινικά κύτταρα, διευκολύνοντας έτσι τη συσσώρευση οξειδωτικού στρες και γενετικών μεταλλάξεων και επάγοντας την καρκινογένεση. Η υπερέκφραση των γονιδίων *KLK3*, *KLK4* και *KLK7* αυξάνει την κινητικότητα και τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών

κύτταρων προστάτη, επάγοντας τη μορφολογία μεσεγχυματικού τύπου, ενώ η KLK1 αυξάνει την επιθετικότητα των προστατικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του PAR-1 σηματοδοτικού μονοπατιού. Επίσης, οι KLK3 και KLK4 διευκολύνουν τη μετάσταση των καρκινικών προστατικών κυττάρων στα οστά, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και την απόπτωση των οστεοκλαστών, και διευκολύνοντας τη μετακίνηση και τη σύνδεση των καρκινικών κυττάρων στα οστά, αντίστοιχα [79, 80].

Το γονίδιο της καλλικρεΐνης 13, *KLK13*, εκφράζεται κυρίως στον προστάτη, στο μαστό, στους σιελογόνους αδένες, στο στόμαχο, στους πνεύμονες, στο θυρεοειδή αδένα και στους όρχεις, και κωδικοποιεί για την εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης KLK13, η οποία έχει ενεργότητα θρυψίνης [115]. Ο φυσιολογικός ρόλος που έχει αποδοθεί στην καλλικρεΐνη 13 είναι η αποικοδόμηση συγκεκριμένων συστατικών του εξωκυττάριου χώρου (κολλαγόνο I, κολλαγόνο II, κολλαγόνο III, φιμπρονεκτίνη και λαμινίνη) και η υδρόλυση-ενεργοποίηση των πρωτεϊνών histatins που έχουν αντιμικροβιακή δράση [122, 123]. Η KLK13 εμπλέκεται και στις ανθρώπινες νεοπλασίες κατέχοντας διττό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, η KLK13 αποικοδομεί την εξωκυττάρια ουσία και θεωρείται ότι επάγει με αυτό τον τρόπο τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων της ωοθήκης. Επίσης, στον καρκίνο του πνεύμονα η υπερέκφραση του γονιδίου *KLK13* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιθετικότητας και του μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων, επάγοντας την υδρόλυση της λαμινίνης και την έκφραση της N-καδερίνης [122, 127]. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα δεδομένα έχει προταθεί ότι η KLK13 μπορεί να αναστείλει την αγγειογένεση παράγοντας θραύσματα με ενεργότητα αγγειοστατινών από το πλασμινογόνο [104]. Όσον αφορά την κλινική αξία του γονιδίου *KLK13*, η έκφραση του σε επίπεδο mRNA θεωρείται ως προγνωστικός δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο της ωοθήκης και τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, καθώς συνδέεται και στις δύο περιπτώσεις με μειωμένα διαστήματα επιβίωσης [124, 126]. Αντιθέτως, υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης KLK13 έχουν συσχετισθεί με μεγαλύτερη ολική επιβίωση και μειωμένη πιθανότητα υποτροπής στον καρκίνο της ωοθήκης [125]. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *KLK13* σε επίπεδο mRNA έχει προταθεί ως ευμενής προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του μαστού και το γαστρικό καρκίνο [119, 128].

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής για το γονίδιο *KLK13* που βασίστηκαν, αρχικά, στην ανάλυση μέσω συμβατικής PCR, δείχνουν ότι τόσο το κλασσικό όσο και τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου εκφράζονται στους όγκους του προστάτη. Για

πρώτη φορά ανιχνεύτηκε η έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *KLK13* σε ιστούς προστάτη, καθώς μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι τα μετάγραφα αυτά εκφράζονταν αποκλειστικά στο δέρμα και στους όρχεις [100]. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας κατάλληλο πολυκλωνικό αντίσωμα παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης *KLK13* σε ιστούς προστάτη. Εκτός, από τη ζώνη των 29 kDa (αναμενόμενο μοριακό βάρος της μη γλυκοζυλιωμένης *KLK13*) εμφανίστηκαν και ζώνες που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη. Οι ζώνες αυτές θα μπορούσαν να αποτελούν προϊόντα γλυκοζυλίωσης της *KLK13*. Η γλυκοζυλίωση της *KLK13* αποτελεί σύνηθες φαινόμενο και έχει περιγραφεί αναλυτικά στη διεθνή βιβλιογραφία για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. [120]. Όσον αφορά την κλινική αξία του γονιδίου *KLK13* στον καρκίνο του προστάτη, αρχικά παρατηρήθηκε μέσω συμβατικής PCR μια περιορισμένη αύξηση της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου στους καρκινικούς σε σχέση με τους καλοήθεις όγκους. Η τάση αυτή επιβεβαιώθηκε ($p = 0,038$) σε μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος μέσω της ειδικής για το συγκεκριμένο μετάγραφο νεοαναπτυχθείσας μεθοδολογίας ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *KLK13*. Όσον αφορά τη συχνότητα έκφρασης του γονιδίου, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του προστάτη και των ασθενών με καλοήγη προστατική υπερπλασία. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε κάποια σχέση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* και του παθολογοανατομικού σταδίου ή του βαθμού επιθετικότητας της νόσου.

Ωστόσο, η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι *KLK13*-θετικοί ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερας νόσου σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως *KLK13*-αρνητικοί ($p = 0,015$). Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του γονιδίου *KLK13* ως δείκτη ευμενούς πρόγνωσης, τόσο σε μονομεταβλητό ($p = 0,021$), όσο και σε πολυμεταβλητό ($p = 0,038$) επίπεδο, ύστερα από προσαρμογή για σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες όπως το Gleason score, το παθολογοανατομικό στάδιο και τα προεγχειρητικά επίπεδα PSA. Η αυξητική τάση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK13* στον καρκίνο του προστάτη ενδεχομένως να έρχεται σε αντίθεση με τη θετική συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου και υψηλότερων πιθανοτήτων επιβίωσης ελεύθερας νόσου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που να περιγράφουν το ρόλο του γονιδίου *KLK13* στον καρκίνο του προστάτη θα ήταν δύσκολο να συντεθεί μια

υπόθεση η οποία να εξηγεί ικανοποιητικά τον τρόπο ρύθμισης της έκφρασης του εν λόγω γονιδίου, αλλά και το μηχανισμό με τον οποίο τα αυξημένα επίπεδα έκφρασής του προσδίδουν μια ευμενή πορεία επιβίωσης στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Αξίζει να αναφερθεί ότι παρόμοια τάση έχει παρατηρηθεί και για την έκφραση του γονιδίου *KLK13* σε επίπεδο πρωτεΐνης στον καρκίνο της ωοθήκης, όπου εμφανίζεται αυξημένη έκφραση της *KLK13* στους καρκινικούς σε σχέση με τους καλοήθεις ιστούς, ενώ την ίδια στιγμή παρατηρείται συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων έκφρασης με ευμενή πρόγνωση [125]. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η έκφραση της κλασικής mRNA ισομορφής του γονιδίου *KLK13* αποτελεί ένα νέο μοριακό δείκτη ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, ανεξάρτητο από τους ήδη χρησιμοποιούμενους προγνωστικούς δείκτες.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα συμφωνούν με σχετικά ευρήματα για τον καρκίνο του μαστού, της ωοθήκης και του στομάχου, όπου και στις τρεις αυτές περιπτώσεις η έκφραση του γονιδίου *KLK13* έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης ευμενούς πρόγνωσης, καθώς σχετίζεται με πρώιμη και λιγότερο επιθετική νόσο, αλλά και με αυξημένα διαστήματα επιβίωσης ελευθέρως υποτροπών ή/και ολικής επιβίωσης [119, 125, 128]. Αυτή η επαναλαμβανόμενη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* και της αυξημένης επιβίωσης ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου, πιθανώς να εξηγείται, τουλάχιστον εν μέρει, από την ικανότητα της *KLK13* να παράγει θραύσματα αγγειοστατινών από τη μερική πρωτεόλυση του πλασμινογόνου [104]. Τα θραύσματα αυτά αναστέλλουν την αγγειογένεση, μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη του όγκου [112]. Άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών που σχετίζονται με χαρακτηριστικά ευμενούς πρόγνωσης στον καρκίνο του προστάτη είναι τα γονίδια *KLK5* και *KLK11*, η αυξημένη έκφραση των οποίων συναντάται πιο συχνά σε ασθενείς πρώιμων σταδίων ή/και σε ασθενείς με λιγότερο επιθετικούς όγκους [79, 80].

Το γονίδιο της καλλικρεΐνης 15, *KLK15*, εμφανίζει μεγάλη δομική ομοιότητα με το γονίδιο *KLK3* (PSA) και εκφράζεται εντονότερα στο θυρεοειδή αδένα, ενώ μικρότερα επίπεδα ανιχνεύονται στον προστάτη, στους σιελογόνους αδένες και στα επινεφρίδια [130]. Η πρωτεΐνη *KLK15* έχει αναμενόμενη ενζυμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης και ο φυσιολογικός της ρόλος θεωρείται ότι είναι η ρευστοποίηση του σπέρματος μέσω της ενεργοποίησης του προ-PSA [132]. Αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης *KLK15* έχουν βρεθεί σε επιθετικές μορφές του καρκίνου του προστάτη και θεωρούνται δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης [134-136]. Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK15* έχουν βρεθεί σε καρκινικούς σε σχέση με καλοήθεις

όγκους ωοθήκης και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με καρκίνο της ωοθήκης [137]. Αντιθέτως, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK15* έχουν συσχετισθεί με ευμενή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού. Μια σειρά πολυμορφισμών (SNPs) στην περιοχή του γονιδίου *KLK15* σχετίζεται με την επιθετικότητα του καρκίνου του προστάτη [138] και με δυσμενή πορεία επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο της ωοθήκης [131].

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής για το γονίδιο *KLK15*, παρατηρήθηκε, αρχικά μέσω συμβατικής PCR, έκφραση τόσο του κλασικού όσο και των εναλλακτικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου σε δείγματα ιστών από ασθενείς με καλοήγη προστατική υπερπλασία και από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Η έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου εμφάνισε σημαντική αύξηση στον καρκίνο του προστάτη ($p < 0,001$) σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία, αλλά και σε μεγαλύτερους σε μέγεθος ($p = 0,007$) και πιο επιθετικούς όγκους ($p = 0,017$). Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση στη συχνότητα έκφρασης του εναλλακτικού μεταγράφου 2 στον καρκίνο του προστάτη ($p = 0,017$), ωστόσο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το κλασικό μετάγραφο. Με σκοπό την επιβεβαίωση των έντονων μεταβολών που παρατηρήθηκαν για το κλασικό μετάγραφο του γονιδίου *KLK15* και την ακριβή διερεύνηση της διαφοροδιαγνωστικής και προγνωστικής του αξίας αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο ειδική για το εν λόγω μετάγραφο και εφαρμόστηκε για την ποσοτικοποίηση του σε ένα σημαντικό μέγεθος δείγματος ($n = 150$).

Η ποσοτική ανάλυση επιβεβαίωσε τα αρχικά αποτελέσματα για το γονίδιο *KLK15*, καθώς προσδιορίστηκαν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης (7,5 φορές) του γονιδίου στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία ($p < 0,001$). Η αντίστοιχη συχνότητα έκφρασης του γονιδίου βρέθηκε και αυτή αυξημένη σημαντικά ($p < 0,001$). Η ανάλυση καμπυλών ROC έδειξε τη σημαντική διαφοροδιαγνωστική ικανότητα των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* ($AUC = 0,739$, $95\% \text{ CI} = 0,653 - 0,824$, $p < 0,001$). Η εφαρμογή της συνδυασμένης χρήσης των τιμών PSA και των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* αυξάνει την AUC, και επομένως βελτιώνει τη διαφοροδιαγνωστική αξία του PSA, από 0,777 σε 0,799. Η προβλεπτική ικανότητα των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* όσον αφορά την ύπαρξη καρκίνου του προστάτη μελετήθηκε σε πολυμεταβλητό επίπεδο μετά από διόρθωση για τις τιμές PSA και την ηλικία των ασθενών, προσφέροντας έτσι πληροφορία η οποία είναι ανεξάρτητη από τις μετρήσεις PSA ($p = 0,007$). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημαντική διαφοροδιαγνωστική αξία της έκφρασης του γονιδίου *KLK15*, ο προσδιορισμός της

οποίας μπορεί να οδηγήσει την αποφυγή άσκοπων επαναλαμβανόμενων βιοψιών. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η συχνότητα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* σχετίζεται με καρκίνο προστάτη προχωρημένου παθολογοανατομικού σταδίου ($p = 0,023$).

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι ασθενείς θετικοί ως προς την έκφραση του κλασικού μεταγράφου mRNA του γονιδίου *KLK15* παρουσιάζουν μικρότερη πιθανότητα επιβίωσης ελευθέρως νόσου σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίζονται ως *KLK15*-αρνητικοί ($p = 0,006$). Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε την προγνωστική αξία του γονιδίου *KLK15* ως δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης σε μονομεταβλητό ($p = 0,010$) και πολυμεταβλητό ($p=0,038$) επίπεδο μετά από προσαρμογή για τις τιμές των μεταβλητών Gleason score, παθολογοανατομικό στάδιο, επίπεδα PSA, ηλικία και το αποτέλεσμα δακτυλικής εξέτασης. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν το κλασικό μετάγραφο του γονιδίου ως ένα νέο βιοδείκτη δυσμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, ο οποίος μπορεί να παράσχει σημαντική κλινική πληροφορία ανεξάρτητη από τους ήδη χρησιμοποιούμενους δείκτες πρόγνωσης.

Τα αποτελέσματα που περιγράφουν το προφίλ της mRNA έκφρασης του γονιδίου *KLK15* και τα οποία παρουσιάστηκαν παραπάνω είναι σε συμφωνία με προσφάτως δημοσιευμένα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης *KLK15*. Η έκφραση της *KLK15*, όπως προσδιορίζεται μέσω ανοσοϊστοχημείας, σχετίζεται με επιθετικούς όγκους, καθώς και με μειωμένες πιθανότητες επιβίωσης ελευθέρως νόσου [135]. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματά που παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι σε συμφωνία με παλαιότερα, προκαταρκτικά αποτελέσματα που περιέγραφαν την υπερέκφραση του γονιδίου *KLK15* σε καρκινικούς σε σχέση με παρακείμενους μη καρκινικούς ιστούς προστάτη και τη θετική συσχέτιση του με όγκους προχωρημένου σταδίου [136].

Η ισχυρή συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου *KLK15*, σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης, με την επιθετικότητα του καρκίνου του προστάτη μπορεί να εξηγηθεί από το την ικανότητα της *KLK15* να αποικοδομεί και να ενεργοποιεί το προ-PSA [132]. Το PSA (*KLK3*) εμπλέκεται στην επαγωγή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή, στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και στην αύξηση της μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών προστατικών κυττάρων [79]. Ένα επιπλέον δεδομένο που ισχυροποιεί αυτήν την υπόθεση είναι η θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* και των συγκεντρώσεων

του PSA ($p < 0,001$). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματά της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο της ωοθήκης όπου έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα mRNA σε καρκινικούς σε σχέση με καλοήθεις όγκους [137]. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου *KLK15* σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο της ωοθήκης όσον αφορά την επιβίωση ελευθέρως νόσου και την ολική επιβίωση [137]. Άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών που ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα στον καρκίνο του προστάτη ή/και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση είναι οι καλλικρεΐνες *KLK2*, *KLK4* και *KLK14*. Η παρουσία υψηλών επιπέδων της *KLK2* στον ορό είναι ενδεικτική της παρουσίας καρκίνου στον προστάτη, αλλά και υποτροπής της νόσου. Αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης *KLK14* σε ιστούς προστάτη έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για βιοχημική υποτροπή, ενώ αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK4* έχουν βρεθεί σε καρκινικούς σε σχέση με καλοήθεις όγκους και συνδέονται με επιθετική νόσο [79, 80, 110].

Ένα ιδιαίτερα γρήγορα αναπτυσσόμενο πεδίο όσον αφορά την έρευνα σχετικά με τον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη, είναι η μελέτη του ρόλου των miRNAs. Τα miRNAs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μικρών μορίων RNA (μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων) που ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες και εμπλέκονται εκτενώς στη βιολογία του καρκίνου, από την καρκινογένεση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μέχρι τη διήθηση τοπικών ιστών και τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Για το λόγο αυτό, τα γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένα miRNAs έχουν χαρακτηριστεί ως νέα ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Πρόσφατες εργασίες παρουσιάζουν τα microRNAs ως νέους, πολλά υποσχόμενους καρκινικούς δείκτες για μια πληθώρα νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη [63, 139, 146, 151, 153, 155, 160]. Μελέτες των πέντε τελευταίων ετών προτείνουν ότι τα γονίδια των καλλικρεϊνών ρυθμίζονται εκτενώς από συγκεκριμένα miRNAs, καθώς έχει περιγραφεί ένας ισχυρός άξονας αλληλεπίδρασης miRNAs-KLKs. Στον καρκίνο του προστάτη, 55 miRNAs, από το σύνολο των miRNAs που απορρυθμίζονται, στοχεύουν γονίδια καλλικρεϊνών και 7 από αυτά στοχεύουν παραπάνω από μια καλλικρεΐνες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το miR-224 το οποίο στοχεύει το γονίδιο *KLK15* όπως και άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών (*KLK1* και *KLK10*) [105, 164, 165]. Το miR-224 συνδέεται με αρκετές νεοπλασίες όπου ενδέχεται να παρουσιάζει ογκοκατασταλτική ή ογκογόνο δράση και να υπερεκφράζεται ή να υποεκφράζεται, ανάλογα με τον τύπο της νεοπλασίας [161, 167, 170-199, 237-239]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι

το miR-224 μεταβάλλει το φαινότυπο των ηπατικών κυττάρων σε καρκινικό και αυξάνει την επιθετικότητά τους [178, 190], ενώ, αντιθέτως, έχει αναφερθεί ότι το miR-224 παρουσιάζει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες σε καρκινικά κύτταρα μαστού [195]. Όσον αφορά την κλινική αξία του miR-224, μέχρι στιγμής, η αύξηση των επιπέδων έκφρασής του έχει προταθεί ως δείκτης ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδή αδένος [198].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρατηρήθηκε εκτεταμένη απορρύθμιση της έκφρασης του miR-224 στον καρκίνο του προστάτη, γεγονός που μπορεί να αποτελεί αιτία των σημαντικών μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια. Μέσω της εφαρμογής της υπερευαίσθητης ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο που αναπτύχθηκε, αναδείχθηκε, αρχικά, ότι τα επίπεδα ($p < 0,001$) και η συχνότητα έκφρασης ($p = 0,006$) του miR-224 είναι μειωμένα σε σημαντικό βαθμό στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με τους καλοήθεις όγκους. Η κλινική αξία του miR-224 στο διαχωρισμό μεταξύ καρκινικών και καλοηθών δειγμάτων προστάτη αναδείχθηκε μέσω καμπυλών ROC (AUC = 0,672, $p < 0,001$) και μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης για την πρόβλεψη της ύπαρξης καρκίνου προστάτη τόσο σε μονομεταβλητό (OR = 0,534, $p = 0,015$) όσο και σε πολυμεταβλητό επίπεδο μετά από διόρθωση για ήδη χρησιμοποιούμενους δείκτες ύπαρξης προστατικού καρκίνου όπως το PSA και η DRE (OR = 0,381, $p = 0,021$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια σημαντική βαθμιαία μείωση των επιπέδων του miR-224 καθώς αυξάνεται ο βαθμός επιθετικότητας της νόσου ($p = 0,017$). Μειωμένα επίπεδα του miR-224 ανιχνεύτηκαν, επίσης, σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου, σε σχέση με ασθενείς περισσότερο πρώιμων σταδίων της νόσου ($p = 0,018$). Επομένως, παρατηρείται μια εμφανής μείωση των επιπέδων του miR-224 καθώς ο καρκίνος του προστάτη εξελίσσεται, γεγονός που είναι ενδεικτικό ενός πιθανού ογκοσταλτικού μηχανισμού που περιλαμβάνει το miR-224 και ο οποίος εξασθενεί καθώς τα επίπεδα του miR-224 μειώνονται.

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier απέδειξε ότι οι miR-224-θετικοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης ελευθέρως νόσου στην πάροδο του χρόνου, σε σχέση με τους miR-224-αρνητικούς ασθενείς ($p = 0,021$). Η μονομεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε τη συσχέτιση του miR-224 με την ευμενή πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του προστάτη ($p = 0,013$). Ωστόσο, μέσω της πολυμεταβλητής ανάλυσης φάνηκε ότι το miR-224 δε μπορεί να προσφέρει ανεξάρτητη προγνωστική πληροφορία από ήδη χρησιμοποιούμενους και ισχυρούς προγνωστικούς δείκτες όπως το Gleason score. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στη σημαντική συσχέτιση που

παρατηρήθηκε μεταξύ του miR-224 και των κλινικοπαθολογικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην πρόγνωση της νόσου.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι το miR-224 υποεκφράζεται σε καρκινικούς ιστούς προστάτη σε σχέση με παρακείμενους μη καρκινικούς [180]. Επιπρόσθετα, υποέκφραση του miR-224 έχει βρεθεί στον καρκίνο της ωοθήκης, του πνεύμονα, του μαστού και της στοματικής κοιλότητας [174, 176, 184, 194]. Οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες του miR-224 έχουν περιγραφεί στον καρκίνο του μαστού όπου το εν λόγω miRNA μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από την πρωτεΐνη Ubc9 κυτταρική αύξηση στοχεύοντας απευθείας τα σχετιζόμενα με τη μετάσταση γονίδια *CDC42* και *CXCR4* [195]. Επιπρόσθετα, το miR-224 μπορεί να επάγει απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα μέσω της στόχευσης του γονιδίου που αναστολέα της απόπτωσης *API5*, να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να αυξήσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου στη ακτινοβολία [171, 175]. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ωοθήκης μειώνεται, επίσης, μετά από υπερέκφραση του miR-224 [167]. Επιπλέον, το miR-224 υποεκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν αντίσταση στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα μεθοτρεξάτη [197]. Επίσης, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που παρουσιάζουν το miR-224 ως δείκτη ευμενούς πρόγνωσης στον καρκίνο του προστάτη συμφωνούν με δημοσιευμένα δεδομένα που αναφέρουν ότι η υπερέκφραση του συγκεκριμένου miRNA συσχετίζεται με καλύτερη πορεία επιβίωσης των ασθενών με θυρεοειδικό καρκίνο [198].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, το miR-224 υποεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη και σε περισσότερο επιθετικούς όγκους, ενώ, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, ορισμένα από τα γονίδια που στοχεύονται από το miR-224 (*CXCR4*, *HIF1A*) υπερεκφράζονται στις προαναφερθείσες παθολογικές καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *CXCR4* υπερεκφράζεται, μέσω μεταγραφικής ρύθμισης, στον καρκίνο του προστάτη και σχετίζεται με την ανάπτυξη μεταστατικής νόσου [199, 200]. Επίσης, το γονίδιο *HIF1A* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον προστατικό καρκίνο και ιδιαίτερα σε επιθετικούς όγκους [61]. Η υπερέκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων ενδεχομένως να οφείλεται στον περιορισμό του ρυθμιστικού δυναμικού του miR-224, ως αποτέλεσμα της παρατηρούμενης μειωμένης έκφρασής του. Παρόμοιο συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί και για το γονίδιο *KLK15*, το οποίο αποτελεί στόχο

του miR-224, και παρουσιάζει ένα αντίστροφο πρότυπο έκφρασης σε σχέση με το miR-224. Όπως προαναφέρθηκε η έκφραση του *KLK15* σε επίπεδο mRNA είναι αυξημένη σημαντικά στον καρκίνο του προστάτη και ιδιαίτερα σε όγκους προχωρημένου σταδίου, ενώ παράλληλα σχετίζεται και με δυσμενέστερη πρόγνωση. Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση μιας ισχυρής αρνητικής συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK15* και των επιπέδων miR-224 στον καρκίνο του προστάτη ($r_s = -0,434$ $p < 0,001$). Η συσχέτιση αυτή είναι ενδεικτική της πιθανής ρυθμιστικής σχέσης μεταξύ του miR-224 και της έκφρασης του γονιδίου *KLK15* στον καρκίνο του προστάτη *in vivo*. Προσφάτως, υπολογίστηκε ότι, σε ποσοστό >84% των περιπτώσεων ρύθμισης μέσω miRNAs, τα παρατηρούμενα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα οφείλονται στη μείωση των αντίστοιχων επιπέδων mRNA, λόγω της αποαδενυλίωσης και της επακόλουθης αποικοδόμησης τους [240].

Η ορμονοθεραπεία μέσω ανδρογονικού αποκλεισμού αποτελεί μια ικανοποιητική στρατηγική για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, καθώς αρχικά φαίνεται να καθυστερεί την εξέλιξη του όγκου. Ωστόσο, σε μετέπειτα στάδια ο καρκίνος καθίσταται ανθεκτικός στη χορήγηση ανδρογόνων και μεταβάλλεται σε μια ιδιαίτερα επιθετική, μεταστατική νόσο με αυξημένη ποσοστά θνησιμότητας. Σε αυτό το στάδιο, η χορήγηση συμβατικών χημειοθεραπευτικών ουσιών αποτελεί τη μόνη διαθέσιμη, αποτελεσματική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της νόσου [14, 46, 47]. Οι χημειοθεραπευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση αυτή είναι το docetaxel και το mitoxantrone. Το docetaxel ανήκει στην κατηγορία των ταξανών. Οι ταξάνες είναι ισχυροί αναστολείς της μίτωσης, καθώς προσδένονται στους μικροσωληνίσκους με υψηλή συγγένεια, σταθεροποιούν τη μιτωτική άτρακτο και παρεμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση. Το mitoxantrone ανήκει στην οικογένεια των ανθρακινονών και η κυτταροστατική του δράση οφείλεται στην αναστολή της τοποϊσομεράσης τύπου II και την επακόλουθη παρεμπόδιση της σύνθεσης και της επιδιόρθωσης του DNA. Παρά το γεγονός ότι τα οι δύο αυτές αντικαρκινικές ουσίες δρουν μέσω διαφορετικών μοριακών μηχανισμών, το τελικό αποτέλεσμα είναι η επαγωγή της απόπτωσης [45, 48, 49]. Είναι γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στην ανταπόκριση των ασθενών με επιθετικό καρκίνο του προστάτη στη χημειοθεραπεία και οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις δε μπορούν να προσφέρουν έγκαιρα πληροφορία σχετικά με την επιτυχία ή όχι της χημειοθεραπείας. Ο μόνος δείκτης που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των ασθενών που λαμβάνουν χημειοθεραπεία είναι το PSA, καθώς θεωρείται ότι η μείωση των επιπέδων του

PSA στο αίμα συσχετίζεται με καλή πρόγνωση. Ωστόσο, η παρακολούθηση της χημειοθεραπευτικής ανταπόκρισης μέσω του PSA εμφανίζει σημαντικές πολυπλοκότητες, καθώς δεν είναι βέβαιο ότι όλα τα βιοχημικά μονοπάτια που τροποποιούνται κατά την πορεία της χημειοθεραπείας οδηγούν πάντα σε μεταβολές του PSA. Ως εκ τούτου, μια μείωση στις τιμές του PSA δε συνεπάγεται σε κάθε περίπτωση ότι η αντικαρκινική θεραπεία είναι επιτυχημένη, αλλά ούτε η αύξηση ή η μη μεταβολή είναι πάντοτε ενδεικτικές μιας αποτυχημένης χημειοθεραπευτικής παρέμβασης [9, 71, 75, 76]. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η εύρεση νέων μοριακών δεικτών πρόγνωσης και παρακολούθησης των θεραπευτικών χειρισμών της νόσου, οι οποίοι μπορούν να αναζητηθούν στην οικογένεια των καλλικρεϊνών [236].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό μοντέλο η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU145, καθώς προσομοιάζει την μη ανταποκρινόμενη στα ανδρογόνα επιθετική μορφή της νόσου, λαμβάνοντας υπόψη ότι δε διαθέτει λειτουργικό υποδοχέα ανδρογόνων [201] και εκφράζει και τα δύο τα υπό μελέτη γονίδια *KLK13* και *KLK15*. Η επώαση των κυττάρων DU145 με τις χημειοθεραπευτικές ουσίες docetaxel και mitoxantrone σε διάφορες συγκεντρώσεις και χρονικά διαστήματα έδειξε ότι η βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προστάτη μειώνεται μέσω ενός δόσο- και χρόνο- εξαρτώμενου φαινομένου. Η προσέγγιση αυτή οδήγησε στην επιλογή της συγκέντρωσης, για κάθε αντικαρκινικό φάρμακο που είναι τοξική για το 50% του κυτταρικού πληθυσμού για κάθε χημειοθεραπευτική ουσία και οδηγεί τα κύτταρα κυρίως σε απόπτωση, χωρίς να επάγει σημαντικά νεκρωτικά φαινόμενα. Η μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων συνοδεύτηκε και από αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK13* αυξήθηκαν περίπου 2 φορές στην περίπτωση της επώασης παρουσία docetaxel αλλά και στην περίπτωση χορήγησης mitoxantrone. Το πρότυπο της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης, ωστόσο, ήταν διαφορετικό για τις δύο χημειοθεραπευτικές ουσίες, καθώς στην πρώτη περίπτωση η αύξηση παρουσιάζεται μετά από 48 h και διατηρείται και τις επόμενες 24 h, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παρουσιάζεται εμφανής αύξηση μόνο μετά από 72 h. Οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* ήταν περισσότερο εκτεταμένες, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση έως και 8 φορές στην περίπτωση της επώασης με mitoxantrone, ενώ το docetaxel οδήγησε σε αύξηση 2 φορές. Οι μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου *KLK15* παρατηρήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις μετά από 72 h επώασης. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα γονίδια *KLK13* και *KLK15* ενδεχομένως εμπλέκονται

στα μοριακά μονοπάτια ενεργοποιούνται από την παρουσία των χημειοθεραπευτικών παραγόντων και οδηγούν σε μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων προστάτη, ενδεχομένως μέσω της επαγωγής της απόπτωσης.

Έχει προταθεί ότι η οικογένεια των καλλικρεϊνών εμπλέκεται έμμεσα ή άμεσα στη διαδικασία της απόπτωσης. Οι καλλικρεΐνες KLK1, KLK2, KLK3 και KLK11 μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του αυξητικού παράγοντα IGF1, ο οποίος αναστέλλει την απόπτωση και προάγει την επιβίωση των κυττάρων. Αντιθέτως, η KLK3 μπορεί να επάγει την απόπτωση των οστεοκλαστών αλλά και των προστατικών καρκινικών κυττάρων [101, 104, 109]. Η KLK6 μειώνει την ευαισθησία των κυττάρων γλοιοβλαστώματος σε χημειοθεραπευτικές ουσίες και επάγει ανθεκτικότητα στην απόπτωση, μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα PAR1 [241]. Η KLK14 επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης μέσω αύξησης της έκφρασης και της ενεργότητας των κασπασών 9 και 3 [242]. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι και η έκφραση του γονιδίου *KLK5* αυξάνεται σε καρκινικές σειρές προστάτη μετά από επώαση με χημειοθεραπευτικές ουσίες [243, 244]. Επιπρόσθετα, αύξηση των επιπέδων του γονιδίου *KLK13* παρουσία αντικαρκινικών ουσιών έχει παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα στομάχου [129]. Επίσης, παρατηρούνται μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK4*, *KLK5* και *KLK14* σε καρκινικά κύτταρα μαστού μετά από χορήγηση κυτταροστατικών φαρμάκων, οι οποίες συνοδεύονται μάλιστα από αύξηση των επιπέδων του προαποπτωτικού μορίου BAX και μείωση των επιπέδων του προαποπτωτικού μορίου BCL2 [245].

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου τα γονίδια *KLK13* και *KLK15* εμπλέκονται στην ανταπόκριση των καρκινικών κυττάρων προστάτη στη χημειοθεραπεία είναι δύσκολο να στοιχειοθετηθεί επί του παρόντος, καθώς δεν είναι γνωστές οι επακριβείς λειτουργίες των προαναφερθέντων γονιδίων στον καρκίνο του προστάτη. Επομένως, οι παρατηρούμενες μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων *KLK13* ή *KLK15* θα μπορούσαν να είναι μέρος ενός μηχανισμού άμυνας των καρκινικών κυττάρων προστάτη στη χορήγηση των αντικαρκινικών ουσιών, είτε να αποτελεί το αποτέλεσμα της επαγωγής μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, όπως αναφέρει μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία, τα επίπεδα του miR-224 μειώνονται σημαντικά μετά από την επώαση καρκινικών σειρών με αντικαρκινικές ουσίες [196]. Επίσης, το miR-224 υποεκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που είναι ανθεκτικές στη χημειοθεραπεία, ενώ, τα επίπεδα των mRNA των γονιδίων στόχων του αυξάνονται [197]. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω

δεδομένα καθώς και την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *KLK15* παρουσία χημειοθεραπευτικών παραγόντων, είναι πιθανό ο άξονας *miR-224-KLK15* να έχει κάποιο ρόλο και στην ανταπόκριση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* υποδεικνύουν ότι η μελέτη του προφίλ έκφρασης των γονιδίων αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει, μετά από την περαιτέρω αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών στους οποίους συμμετέχουν, στην εύρεση πιθανών μοριακών δεικτών παρακολούθησης της ανταπόκρισης της χημειοθεραπείας στον καρκίνο του προστάτη.

Συμπερασματικά, τα μελετώμενα μόρια αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους μοριακούς δείκτες που θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη διαφοροδιάγνωση του καρκίνου του προστάτη, καθώς τα αποτελέσματά που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή είναι ενθαρρυντικά για τη διεξοδική μελέτη των αναλυθέντων βιομορίων σε επίπεδο βιοψίας και ορού του αίματος. Επιπρόσθετα, τα βιομόρια που μελετήθηκαν θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην περισσότερο έγκυρη πρόγνωση της νόσου παρέχοντας σαφείς πληροφορίες για την επιθετικότητα των όγκων και την πιθανότητα υποτροπής. Τέλος, η μελέτη του προφίλ έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* θα μπορούσε να οδηγήσει στην εύρεση πιθανών μοριακών δεικτών παρακολούθησης της ανταπόκρισης της χημειοθεραπείας στον καρκίνο του προστάτη.

Ανάλυση της έκφρασης, μελέτη και κλινική αξιολόγηση των καλλικρεϊνών KLK13 και KLK15 στον καρκίνο του προστάτη

Κωνσταντίνος Μαυρίδης

Διδακτορική Διατριβή

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί την πιο συχνή νεοπλασία του ανδρικού πληθυσμού στις ανεπτυγμένες χώρες. Κυρίαρχο ρόλο στη διάγνωση και την πρόγνωση των προστατικών νεοπλασιών κατέχει το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA/καλλικρεΐνη 3/KLK3). Ωστόσο, οι αυξημένες τιμές του PSA στην καλοήγη υπερπλασία μειώνουν σημαντικά τη διαγνωστική του ειδικότητα. Επιπρόσθετα, το PSA δε δύναται να διαχωρίσει επαρκώς τους κλινικά ασήμαντους όγκους από τους επιθετικούς με αποτέλεσμα να ακολουθούνται μη αναγκαίοι θεραπευτικοί χειρισμοί. Η παράλληλη εισαγωγή νέων μοριακών δεικτών μπορεί να περιορίσει τα μειονεκτήματα που πηγάζουν από την εκτεταμένη χρήση του PSA.

Οι καλλικρεΐνες αποτελούν μια οικογένεια από 15 γονίδια εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι ιδιαίτερα ευρύς, περιλαμβάνοντας διεργασίες από την ανάπτυξη του εξωκυττάριου χώρου ως τη ρευστοποίηση του σπέρματος. Πληθώρα δεδομένων υποστηρίζουν ότι οι καλλικρεΐνες εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της παθοβιοχημείας των ανθρώπινων νεοπλασιών από τη δημιουργία του όγκου μέχρι την τοπική διήθηση και τη μετάσταση. Απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *KLK13* έχει βρεθεί στον καρκίνο του μαστού, του στομάχου, του πνεύμονα και της ωοθήκης, ενώ η έκφραση του γονιδίου *KLK15* απορρυθμίζεται στον καρκίνο του προστάτη, της ωοθήκης και του μαστού.

Ένα ιδιαίτερα γρήγορα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας για τον καρκίνο είναι η μελέτη των μικρομοριακών RNAs (miRNAs). Τα miRNAs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μικρών μορίων RNA, τα οποία ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Πρόσφατα δεδομένα παρουσιάζουν τα miRNAs ως πολλά υποσχόμενους καρκινικούς δείκτες. Το miR-224 στοχεύει μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου *KLK15*, και σχετίζεται με την εξέλιξη αρκετών νεοπλασιών.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο την ανάλυση της έκφρασης, τη μελέτη και την κλινική αξιολόγηση, των καλλικρεϊνών *KLK13*, *KLK15* καθώς και του *miR-224* στον καρκίνο του προστάτη ως νέων μοριακών δεικτών για τη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου, καθώς και την παρακολούθηση της θεραπευτικής απόκρισης των ασθενών.

Για την εκπλήρωση των στόχων αυτών πραγματοποιήθηκε, σε πρώτο στάδιο, επεξεργασία ενός στατιστικά σημαντικού μεγέθους δείγματος καρκινικών και καλοηθών ιστών προστάτη. Αρχικά, τα δείγματα των ιστών ομογενοποιήθηκαν και απομονώθηκε ολικό RNA. Ακολούθησε ο ποιοτικός και ο ποσοτικός χαρακτηρισμός του απομονωθέντος ολικού RNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού, αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA σε cDNA. Στην περίπτωση του RNA που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των μορίων *miRNA*, προηγήθηκε ένα στάδιο πολυαδενυλίωσης και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή μέσω ενός τροποποιημένου poly(T) εκκινητή. Σε πρώτο επίπεδο, αναλύθηκε, ημιποσοτικά, η έκφραση των κλασικών και εναλλακτικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK15* και *KLK13*, σε ιστούς και καρκινικές σειρές προστάτη, μέσω συμβατικής PCR, ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και πυκνομέτρησης. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης *KLK13* σε ιστούς προστάτη μετά από στύπωση Western. Ακολούθησε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογιών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος ποιότητας των προαναφερθέντων μεθοδολογιών, και ακολούθησε η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK15* και *KLK13*, καθώς και του *miR-224* σε ιστούς προστάτη. Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης ιχνηθετών TaqMan και η μέθοδος της απόλυτης ποσοτικοποίησης, ενώ για την ανάλυση των επιπέδων του *miR-224* χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης της χρωστικής SYBR Green και η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης. Επιπρόσθετα, αναλύθηκε η επίδραση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, docetaxel και mitoxantrone, που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση της ορμονοανεξάρτητης νόσου, στη βιωσιμότητα της ορμονοανεξάρτητης καρκινικής κυτταρικής σειράς προστάτη DU145, μέσω των μεθοδολογιών MTT και Trypan Blue. Η επίδραση των προαναφερθέντων αντικαρκινικών ουσιών στην έκφραση των κλασικών μεταγράφων mRNA των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* μελετήθηκε μέσω ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο.

Η διερεύνηση της κλινικής αξίας των μελετώμενων βιομορίων πραγματοποιήθηκε μέσω εκτενούς βιοστατιστικής ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες για την ανάλυση της κατανομής των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στις διάφορες ομάδες ασθενών και την εύρεση πιθανών συσχετίσεων με αυτές. Ο προσδιορισμός της διαφοροδιαγνωστικής αξίας των μελετώμενων βιομορίων στον καρκίνο του προστάτη πραγματοποιήθηκε μέσω κατασκευής καμπύλων ευαισθησίας-ειδικότητας ROC. Για τον έλεγχο της επίδρασης της κάθε μεταβλητής στην επιβίωση ελεύθερας νόσου κατασκευάστηκαν καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox. Για τον έλεγχο της ανεξάρτητης επίδρασης των νέων μοριακών δεικτών, σε σχέση με τις καθιερωμένες παραμέτρους, στην επιβίωση ελεύθερας νόσου αναπτύχθηκαν μοντέλα πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα γονίδια *KLK15* και *KLK13* εκφράζονται σε ιστούς προστάτη, τόσο σε επίπεδο κλασικών όσο και εναλλακτικών μεταγράφων mRNA, και η έκφραση, κυρίως των κλασικών μεταγράφων, αυξάνεται στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία. Χρησιμοποιώντας κατάλληλο πολυκλωνικό αντίσωμα παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης *KLK13* σε ιστούς προστάτη.

Το κλασικό μετάγραφο mRNA του γονιδίου *KLK13* αυξάνεται σε περιορισμένο βαθμό στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία ($p=0,038$). Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου *KLK13* αποτελεί ένα δείκτη ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη ($p=0,015$). Επιπρόσθετα, αποκαλύφθηκε η ανεξάρτητη προγνωστική αξία του κλασικού mRNA μεταγράφου του γονιδίου *KLK13* μέσω πολυμεταβλητής ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox ($HR=0,319$, $p=0,038$).

Η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου *KLK15* έδειξε ότι η έκφρασή του είναι αυξημένη 7,5 φορές στον καρκίνο του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη προστατική υπερπλασία ($p<0,001$). Η μελέτη της έκφρασής του μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στη διαφορική διάγνωση του καρκίνου του προστάτη, όπως αποδεικνύεται και από την ανάλυση ευαισθησίας-ειδικότητας μέσω καμπύλης ROC ($AUC= 0,753$, $p<0,001$). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε όγκους προχωρημένου σταδίου ($p=0,023$). Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier ανέδειξε την έκφραση του

γονιδίου *KLK15* ως μοριακό δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης ($p=0,006$). Η έκφραση του συγκεκριμένου μεταγράφου αποτελεί ένα νέο προγνωστικό δείκτη για την εμφάνιση βιοχημικής υποτροπής ($HR=3,36$, $p=0,038$), ανεξάρτητο από αυτούς που χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πράξη.

Όσον αφορά το miR-224, το οποίο στοχεύει το γονίδιο *KLK15*, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του στον καρκίνο του προστάτη ($p<0,001$). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του miR-224 σε περισσότερο επιθετικούς όγκους ($p=0,017$) και σε όγκους προχωρημένου σταδίου ($p=0,018$). Η ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι η παρουσία του miR-224 αποτελεί ένα νέο δείκτη ευμενούς πρόγνωσης ($p=0,021$). Η προγνωστική αξία του miR-224 επιβεβαιώθηκε μέσω μονομεταβλητής ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox ($HR=0,314$, $p=0,013$). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK15* και των επιπέδων miR-224 στον καρκίνο του προστάτη ($r_s = -0,434$, $p<0,001$), που πιθανώς να είναι ενδεικτική της ρυθμιστικής ικανότητας του miR-224 στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK15* *in vivo*.

Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα docetaxel και mitoxantrone, οδήγησαν σε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, μέσω ενός φαινομένου που συνοδεύεται από αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15*. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KLK15* αυξάνονται με τη χορήγηση του docetaxel και ακόμα περισσότερο με τη χορήγηση του mitoxantrone (έως 8,4 φορές). Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν και για το γονίδιο *KLK13*, ωστόσο σε μικρότερη έκταση.

Εν κατακλείδι, βρέθηκε ότι τα μελετώμενα βιομόρια αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους μοριακούς δείκτες που θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη διαφορική διάγνωση του καρκίνου του προστάτη και να συμβάλλουν στην έγκυρη πρόγνωση της νόσου. Η μελέτη του προφίλ έκφρασης των γονιδίων *KLK13* και *KLK15* θα μπορούσε να οδηγήσει στην εύρεση πιθανών καρκινικών βιοδεικτών παρακολούθησης της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος του προστάτη; Καρκινικοί δείκτες; Μοριακοί δείκτες καρκίνου; Καλλικρεΐνες; Ειδικό προστατικό αντιγόνο; microRNA; miR-224; *KLK15*; *KLK13*; Ανάλυση έκφρασης γονιδίων; Διαγνωστικοί δείκτες; Προγνωστικοί δείκτες; Δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Expression analysis, study and clinical evaluation of kallikrein-related peptidases KLK13 and KLK15 in prostate cancer

Konstantinos Mavridis

Ph.D. Thesis

**Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology,
University of Athens**

ABSTRACT

Prostate cancer represents the most common malignancy of the male population in developed countries. Prostate specific antigen (PSA/KLK3) plays a major role in prostate cancer diagnosis and prognosis. Nonetheless, PSA testing is characterized by decreased diagnostic specificity, since augmented PSA levels are also observed in benign prostatic hyperplasia. Furthermore, PSA cannot efficiently discriminate tumors of indolent nature from more aggressive ones, resulting, in this way, to the overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer patients. It is believed that the parallel use of novel cancer biomarkers in appropriate combinations with PSA can tackle the discrepancies that arise from the extensive utilization of PSA in routine clinical practice.

Kallikrein-related peptidases (KLKs) form a multigene family that encodes for 15 secreted serine proteases. The physiological role of KLKs is broad and includes dissimilar biological processes from tissue remodeling to regulation of blood pressure. Several data suggest that KLKs are involved in every stage of the pathobiology of human malignancies, from initial tumor development to local invasion and metastasis. Aberrant *KLK13* gene expression is found in breast, gastric, lung and ovarian cancers, whereas *KLK15* gene expression is deregulated in prostate, ovarian and breast cancers.

A rapidly developing scientific field in cancer-related research is the study of microRNAs (miRNAs). MiRNAs constitute a large family of small molecules that negatively regulate, at the post-transcriptional level, the expression of genes involved in key-cellular processes. Recent data describe the marked deregulation of miRNA levels in human malignancies and suggest that they

might represent novel promising cancer biomarkers. MiR-224 targets members of the *KLK* gene family, including *KLK15* gene, and is associated with the progression of several neoplasms.

The aim of the present thesis was the expression analysis and study of *KLK13* and *KLK15* and miR-224 in prostate tumors, as well as their clinical evaluation as biomarkers helpful for the differential diagnosis, prognosis and treatment monitoring of prostate cancer patients.

In order to fulfill these objectives, a statistically significant sample size of malignant and benign prostate tissues was initially processed *via* homogenization. Total RNA was isolated from the abovementioned tissue specimens and was tested in terms of quality and quantity *via* agarose gel electrophoresis and spectrophotometric analysis, respectively. Subsequently, total RNA was reversed transcribed into cDNA. The total RNA that was used for miRNA expression analysis, was subjected to polyadenylation, prior to reverse transcription that was conducted in the presence of a modified poly(T) adapter. The expression of both the classical and the alternative mRNA transcripts of *KLK13* and *KLK15* was, firstly, studied in prostate tissues and prostate cancer cell lines, *via* regular RT-PCR, agarose gel electrophoresis and densitometric analysis. Additionally, the protein expression of *KLK13* was analyzed in prostate tissues *via* Western blotting immunoassays. The classical *KLK13* and *KLK15* mRNA transcripts, as well as miR-224 expression levels, were further quantified, using Real-Time PCR. *KLK13* and *KLK15* gene expression was analyzed *via* TaqMan chemistry and the absolute quantification approach, whereas in the case of miR-224 expression analysis, SYBR Green chemistry and the relative quantification method were employed. The effect of the chemotherapeutic agents docetaxel and mitoxantrone, which are currently used for the management of castrate-resistant metastatic prostate cancer, on the viability of the androgen independent prostate cancer cell line DU145, was also assessed through MTT and Trypan Blue methods. Furthermore, the modulation of the expression levels of *KLK13* and *KLK15* genes upon treatment with the aforementioned anticancer compounds was analyzed *via* quantitative Real-Time PCR.

The clinical evaluation of the prognostic and the differential diagnostic potential of the biomolecules under study was accomplished by using extensive biostatistical analyses. More precisely, non-parametric statistical tests were used to identify any associations between the expression levels of the genes under study and the patients' clinicopathological characteristics. ROC curve analysis was used in order to evaluate the differential diagnostic value of *KLK13*, *KLK15* and miR-224 expression levels. Kaplan-Meier curves and univariate logistic regression

analyses were used to study the effect of each factor in the biochemical progression-free survival of the prostate cancer patients. The independence of the prognostic information provided by the biomolecules under study was tested *via* multivariate Cox logistic regression analysis.

Expression analyses showed that both classical and alternatively spliced transcripts of *KLK13* and *KLK15* genes are expressed in prostate tissues. The expression levels of, mainly, the classical mRNA transcripts are increased in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia. By using an appropriate polyclonal antibody, *KLK13* expression was detected in prostate tissues.

Quantitative expression analysis showed that the classical *KLK13* transcript levels are slightly increased in prostate cancer compared to benign tumors ($p=0.038$). Kaplan-Meier survival analysis showed that *KLK13* mRNA expression levels constitute a novel biomarker of disease progression for prostate cancer patients ($p=0.015$). Multivariate Cox regression analysis identified *KLK13* expression as an independent biomarker of favorable prognosis ($HR=0.319$, $p=0.038$).

KLK15 classical mRNA transcript levels, quantified *via* Real-Time PCR, were significantly increased, approximately 7.5 times, in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia patients ($p<0.001$) and could aid towards the discrimination of these two patient groups, as shown by ROC curve analysis ($AUC= 0.753$, $p<0.001$). *KLK15* expression was also associated with advanced pathological stages ($p=0.023$). *KLK15*-positive prostate cancer patients presented significantly shorter disease-free survival intervals, determined by biochemical relapse ($p = 0.006$), compared to *KLK15*-negative ones. Multivariate Cox regression analysis revealed that *KLK15* expression is an independent predictor of disease recurrence in prostate cancer ($HR=3.36$, $p=0.038$).

Conversely, miR-224 expression levels are decreased in prostate cancer compared to benign tumors ($p<0.001$). Additionally, a negative correlation was observed between miR-224 expression levels and both aggressive tumors ($p=0.017$) and advanced disease stages ($p=0.018$). Survival analysis showed that miR-224 is a novel biomarker of favorable prognosis for prostate cancer patients ($p=0.021$). The prognostic value of miR-224 was corroborated using Cox logistic regression analysis at the univariate level ($HR=0.314$, $p=0.013$). Interestingly, a negative correlation was observed between miR-224 and *KLK15* levels in cancerous prostate tumors ($r_s = -$

0,434, $p < 0.001$), which might be indicative of the regulatory effect of miR-224 on *KLK15* mRNA levels *in vivo*.

Furthermore, it was shown that the administration of the chemotherapeutic compounds docetaxel and mitoxantrone led to a dose- and time- dependent decrease on DU145 cell viability; this phenomenon was accompanied by important modulations in the expression levels of *KLK13* and, mainly, *KLK15* genes. More precisely, *KLK15* classical mRNA transcript levels were increased upon docetaxel and, more profoundly, upon mitoxantrone treatment (up to 8.35 times). Similar alterations were observed regarding *KLK13* expression, though in a milder extent.

In conclusion, the biomolecules that were studied represent promising molecular indicators that could aid in the differential diagnosis of and provide accurate prognostic information for prostate cancer patients. The detailed expression profile analysis of *KLK13* and *KLK15* genes could lead to the identification of novel cancer biomarkers useful for monitoring the response of prostate cancer patients to chemotherapy.

Keywords: Prostate cancer; Cancer biomarkers; Biological Tumor Markers; kallikreins; KLKs; kallikrein-related peptidases; *KLK15*; *KLK13*; microRNAs; miRNAs; miR-224; PSA; Prognostic Biomarkers; Diagnostic Biomarkers; Gene expression analysis.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
2. WHO. World Health Organization web page. Cancer Fact sheet N°297, Reviewed January 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013 Jan;63(1):11-30.
4. Hong KW, Oh B. Overview of personalized medicine in the disease genomic era. *BMB Rep* 2010 Oct;43(10):643-8.
5. Overdevest JB, Theodorescu D, Lee JK. Utilizing the molecular gateway: the path to personalized cancer management. *Clin Chem* 2009 Apr;55(4):684-97.
6. Diamandis M, White NM, Yousef GM. Personalized medicine: marking a new epoch in cancer patient management. *Molecular cancer research* 2010 Sep;8(9):1175-87.
7. Ullah MF, Aatif M. The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Cancer Treat Rev* 2009 May;35(3):193-200.
8. Bradford TJ, Tomlins SA, Wang X, Chinnaiyan AM. Molecular markers of prostate cancer. *Urol Oncol* 2006 Nov-Dec;24(6):538-51.
9. Diamandis EP. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen testing: more answers or more confusion? *Clin Chem* 2010 Mar;56(3):345-51.
10. Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, Scherer B, Zincke H. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol* 2001 Jan;165(1):119-25.
11. Parnes HL, Thompson IM, Ford LG. Prevention of hormone-related cancers: prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005 Jan 10;23(2):368-77.
12. Punglia RS, D'Amico AV, Catalona WJ, Roehl KA, Kuntz KM. Impact of age, benign prostatic hyperplasia, and cancer on prostate-specific antigen level. *Cancer* 2006 Apr 1;106(7):1507-13.
13. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Maattanen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009 Mar 26;360(13):1320-8.
14. Lassi K, Dawson NA. Emerging therapies in castrate-resistant prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 2009 May;21(3):260-5.
15. Wheeler DC, Szymanski KM, Black A, Nelson DE. Applying strategies from libertarian paternalism to decision making for prostate specific antigen (PSA) screening. *BMC Cancer* 2011;11:148.

16. Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative biology of prostate cancer progression. *Annu Rev Pathol* 2006;1:243-71.
17. Cazares LH, Drake RR, Esquela-Kirscher A, Lance RS, Semmes OJ, Troyer DA. Molecular pathology of prostate cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 2010;9(1-6):441-59.
18. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 2006;11:1388-413.
19. Μουτζούρης Γ, Φ. Σ. Κεφάλαιο 24. Σύγχρονη Ουρολογία, Μελέκος ΜΔ, 1η έκ, Ιατρ Εκδ ΠΧ Πασχαλίδης 2006.
20. Δάβαρης Π. Κεφάλαιο 17. Βασική Παθολογική Ανατομική, 1η έκ, Ιατρ Εκδ ΠΧ Πασχαλίδης 2002.
21. Κουτσιλιέρης Μ, Κωστακόπουλος Α. Παθήσεις του Προστάτη, Τα Αίτια και οι Θεραπείες, 1η έκ, Ιατρ Εκδ ΠΧ Πασχαλίδης 2004.
22. Κωστακόπουλος ΑΝ. Παθήσεις του Προστάτη, 1η έκ, Ιατρ Εκδ ΠΧ Πασχαλίδης 1997.
23. Shand RL, Gelmann EP. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol* 2006 May;16(3):123-31.
24. McVary KT. BPH: epidemiology and comorbidities. *Am J Manag Care* 2006 Apr;12(5 Suppl):S122-8.
25. Bryant RJ, Hamdy FC. Screening for prostate cancer: an update. *Eur Urol* 2008 Jan;53(1):37-44.
26. Loeb S, Catalona WJ. What to do with an abnormal PSA test. *The oncologist* 2008 Mar;13(3):299-305.
27. Stephan C, Jung K, Lein M, Diamandis EP. PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur J Cancer* 2007 Sep;43(13):1918-26.
28. Kirby RS, Fitzpatrick JM, Irani J. Prostate cancer diagnosis in the new millennium: strengths and weaknesses of prostate-specific antigen and the discovery and clinical evaluation of prostate cancer gene 3 (PCA3). *BJU Int* 2009 Feb;103(4):441-5.
29. Al Otaibi M, Ross P, Fahmy N, Jeyaganth S, Trottier H, Sircar K, Begin LR, Souhami L, Kassouf W, Aprikian A, Tanguay S. Role of repeated biopsy of the prostate in predicting disease progression in patients with prostate cancer on active surveillance. *Cancer* 2008 Jul 15;113(2):286-92.
30. Heijnsdijk EA, der Kinderen A, Wever EM, Draisma G, Roobol MJ, de Koning HJ. Overdetection, overtreatment and costs in prostate-specific antigen screening for prostate cancer. *Br J Cancer* 2009 Dec 1;101(11):1833-8.
31. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, Partin AW. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 2005 Jul 27;294(4):433-9.

32. Cheung R, Tucker SL, Kuban DA. First-year PSA kinetics and minima after prostate cancer radiotherapy are predictive of overall survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006 Sep 1;66(1):20-4.
33. Shariat SF, Karakiewicz PI, Suardi N, Kattan MW. Comparison of nomograms with other methods for predicting outcomes in prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Clin Cancer Res* 2008 Jul 15;14(14):4400-7.
34. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol* 2010 Feb;183(2):433-40.
35. van Oort IM, Witjes JA, Kok DE, Kiemeny LA, Hulsbergen-Van De Kaa CA. The prognostic role of the pathological T2 subclassification for prostate cancer in the 2002 Tumour-Nodes-Metastasis staging system. *BJU Int* 2008 Aug;102(4):438-41.
36. Hoedemaeker RF, Vis AN, Van Der Kwast TH. Staging prostate cancer. *Microscopy research and technique* 2000 Dec 1;51(5):423-9.
37. van den Ouden D, Schroder FH. Management of locally advanced prostate cancer. 1. Staging, natural history, and results of radical surgery. *World journal of urology* 2000 Jun;18(3):194-203.
38. Korets R, Motamedinia P, Yeshchina O, Desai M, McKiernan JM. Accuracy of the Kattan nomogram across prostate cancer risk-groups. *BJU Int* 2011 Jul;108(1):56-60.
39. Boccon-Gibod L, Djavan WB, Hammerer P, Hoeltl W, Kattan MW, Prayer-Galetti T, Teillac P, Tunn UW. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *Int J Clin Pract* 2004 Apr;58(4):382-90.
40. Sweat GT. Guiding prostate cancer treatment choices. Early detection means more options for more men. *Postgraduate medicine* 2005 Apr;117(4):45-50.
41. Management of localised prostate cancer: watchful waiting, surgery or radiation therapy, depending on the natural course, which is often relatively slow. *Prescrire international* 2012 Oct;21(131):242-8.
42. Hegarty J, Beirne PV, Walsh E, Comber H, Fitzgerald T, Wallace Kazer M. Radical prostatectomy versus watchful waiting for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010(11):CD006590.
43. Hammerer P, Madersbacher S. Landmarks in hormonal therapy for prostate cancer. *BJU Int* 2012 Oct;110 Suppl 1:23-9.
44. van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 2008 Apr 3;452(7187):564-70.
45. Berry WR. The evolving role of chemotherapy in androgen-independent (hormone-refractory) prostate cancer. *Urology* 2005 Jun;65(6 Suppl):2-7.
46. Gulley J, Dahut WL. Chemotherapy for prostate cancer: finally an advance! *Am J Ther* 2004 Jul-Aug;11(4):288-94.
47. Hadaschik BA, Gleave ME. Therapeutic options for hormone-refractory prostate cancer in 2007. *Urol Oncol* 2007 Sep-Oct;25(5):413-9.

48. Pienta KJ, Smith DC. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. *CA Cancer J Clin* 2005 Sep-Oct;55(5):300-18; quiz 23-5.
49. Amaral TM, Macedo D, Fernandes I, Costa L. Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment. *Prostate cancer* 2012;2012:327253.
50. Dutt SS, Gao AC. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol* 2009 Nov;5(9):1403-13.
51. Shore ND, Mantz CA, Dosoretz DE, Fernandez E, Myslicki FA, McCoy C, Finkelstein SE, Fishman MN. Building on sipuleucel-T for immunologic treatment of castration-resistant prostate cancer. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 2013 Jan;20(1):7-16.
52. Konishi N, Shimada K, Ishida E, Nakamura M. Molecular pathology of prostate cancer. *Pathology international* 2005 Sep;55(9):531-9.
53. Porkka KP, Visakorpi T. Molecular mechanisms of prostate cancer. *Eur Urol* 2004 Jun;45(6):683-91.
54. Chokkalingam AP, Stanczyk FZ, Reichardt JK, Hsing AW. Molecular epidemiology of prostate cancer: hormone-related genetic loci. *Front Biosci* 2007;12:3436-60.
55. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006 Feb 15;97(3):433-47.
56. Rubin MA, De Marzo AM. Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* 2004 Mar;17(3):380-8.
57. Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 2006 Jun;42(9):1213-8.
58. Foster CS, Bostwick DG, Bonkhoff H, Damber JE, van der Kwast T, Montironi R, Sakr WA. Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors. *Scandinavian journal of urology and nephrology Supplementum* 2000(205):19-43.
59. Richter E, Srivastava S, Dobi A. Androgen receptor and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007;10(2):114-8.
60. Dehm SM, Tindall DJ. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006 Oct 1;99(2):333-44.
61. Hochachka PW, Rupert JL, Goldenberg L, Gleave M, Kozlowski P. Going malignant: the hypoxia-cancer connection in the prostate. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2002 Aug;24(8):749-57.
62. Clarke NW, Hart CA, Brown MD. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian journal of andrology* 2009 Jan;11(1):57-67.
63. Hassan O, Ahmad A, Sethi S, Sarkar FH. Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *Journal of hematology & oncology* 2012;5:9.
64. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative urology* 1979 Sep;17(2):159-63.
65. Rao AR, Motiwala HG, Karim OM. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int* 2008 Jan;101(1):5-10.

66. Makarov DV, Carter HB. The discovery of prostate specific antigen as a biomarker for the early detection of adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 2006 Dec;176(6 Pt 1):2383-5.
67. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999 Aug;162(2):293-306.
68. Diamandis EP, Bast RC, Jr., Gold P, Chu TM, Magnani JL. Reflection on the Discovery of Carcinoembryonic Antigen, Prostate-Specific Antigen, and Cancer Antigens CA125 and CA19-9. *Clin Chem* 2013 Jan;59(1):22-31.
69. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. 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 Jan 1;51(1):222-6.
70. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, Lovgren T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991 Sep;37(9):1618-25.
71. Bjork T, Lilja H, Christensson A. The prognostic value of different forms of prostate specific antigen and their ratios in patients with prostate cancer. *BJU Int* 1999 Dec;84(9):1021-7.
72. Lilja H, Haese A, Bjork T, Friedrich MG, Piironen T, Pettersson K, Huland E, Huland H. Significance and metabolism of complexed and noncomplexed prostate specific antigen forms, and human glandular kallikrein 2 in clinically localized prostate cancer before and after radical prostatectomy. *J Urol* 1999 Dec;162(6):2029-34; discussion 34-5.
73. Ulmert D, O'Brien MF, Bjartell AS, Lilja H. Prostate kallikrein markers in diagnosis, risk stratification and prognosis. *Nat Rev Urol* 2009 Jul;6(7):384-91.
74. Tornblom M, Norming U, Adolfsson J, Becker C, Abrahamsson PA, Lilja H, Gustafsson O. Diagnostic value of percent free prostate-specific antigen: retrospective analysis of a population-based screening study with emphasis on men with PSA levels less than 3.0 ng/mL. *Urology* 1999 May;53(5):945-50.
75. Fleming MT, Morris MJ, Heller G, Scher HI. Post-therapy changes in PSA as an outcome measure in prostate cancer clinical trials. *Nat Clin Pract Oncol* 2006 Dec;3(12):658-67.
76. Sridhara R, Eisenberger MA, Sinibaldi VJ, Reyno LM, Egorin MJ. Evaluation of prostate-specific antigen as a surrogate marker for response of hormone-refractory prostate cancer to suramin therapy. *J Clin Oncol* 1995 Dec;13(12):2944-53.
77. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2008 Dec;54(12):1951-60.
78. Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett* 2007 Apr 28;249(1):5-13.
79. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem* 2012 April;393(5):301-17.

80. Mavridis K, Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol* 2010 Feb;6(2):269-85.
81. Perdon S, Bruzzese D, Ferro M, Autorino R, Marino A, Mazzearella C, Perruolo G, Longo M, Spinelli R, Di Lorenzo G, Oliva A, De Sio M, Damiano R, Altieri V, Terracciano D. Prostate health index (phi) and prostate cancer antigen 3 (PCA3) significantly improve diagnostic accuracy in patients undergoing prostate biopsy. *Prostate* 2013 Feb 15;73(3):227-35.
82. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962 Jan;237:89-93.
83. Wafa LA, Cheng H, Plaa N, Ghaidi F, Fukumoto T, Fazli L, Gleave ME, Cox ME, Rennie PS. Carbidopa abrogates L-dopa decarboxylase coactivation of the androgen receptor and delays prostate tumor progression. *Int J Cancer* 2012 Jun 15;130(12):2835-44.
84. Margiotti K, Wafa LA, Cheng H, Novelli G, Nelson CC, Rennie PS. Androgen-regulated genes differentially modulated by the androgen receptor coactivator L-dopa decarboxylase in human prostate cancer cells. *Molecular cancer* 2007;6:38.
85. Avgeris M, Koutalellis G, Fragoulis EG, Scorilas A. Expression analysis and clinical utility of L-Dopa decarboxylase (DDC) in prostate cancer. *Clin Biochem* 2008 Oct;41(14-15):1140-9.
86. Koutalellis G, Stravodimos K, Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A, Lazaris A, Constantinides C. L-dopa decarboxylase (DDC) gene expression is related to outcome in patients with prostate cancer. *BJU Int* 2012 Sep;110(6 Pt B):E267-73.
87. Vickers A, Cronin A, Roobol M, Savage C, Peltola M, Pettersson K, Scardino PT, Schroder F, Lilja H. Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-kallikrein panel: an independent replication. *J Clin Oncol* 2010 May 20;28(15):2493-8.
88. Lundwall A, Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci* 2008 Jul;65(13):2019-38.
89. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001 Apr;22(2):184-204.
90. Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Sep 16;276(1):125-33.
91. Yousef GM, Kopolovic AD, Elliott MB, Diamandis EP. Genomic overview of serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 May 23;305(1):28-36.
92. Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Magklara A, Borgono CA, Kishi T, Memari N, Michael P, Sidiropoulos M, Kurlender L, Economopolou K, Kapadia C, Komatsu N, Petraki C, Elliott M, Scorilas A, Katsaros D, Levesque MA, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv Clin Chem* 2005;39:11-79.
93. Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 2007 Aug;53(8):1423-32.

94. Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ, Olsson AY, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stenman UH, Stephan C, Talieri M, Yousef GM. A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol Chem* 2006 Jun;387(6):637-41.
95. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 2009 Nov 27;284(48):32989-94.
96. Pampalakis G, Sotiropoulou G. Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007 Sep;1776(1):22-31.
97. Daniela Cretu GMY, Andreas Scorilas, Eleftherios P. Diamandis. Chapter 1: Genomic Structure of the KLK locus. Volume 1: Kallikrein-related Peptidases Characterization, Regulation, and Interactions Within the Protease Web 2012.
98. Paliouras M, Diamandis EP. The kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. *Biol Chem* 2006 Jun;387(6):643-52.
99. Lawrence MG, Lai J, Clements JA. Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev* 2010 Aug;31(4):407-46.
100. Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, Diamandis EP. A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochim Biophys Acta* 2005 May 25;1755(1):1-14.
101. Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 Nov;4(11):876-90.
102. Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett* 2007 Apr 28;249(1):61-79.
103. Emami N, Diamandis EP. Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. *Clin Chem* 2008 Oct;54(10):1600-7.
104. Emami N, Diamandis EP. New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Molecular oncology* 2007 Dec;1(3):269-87.
105. White NM, Youssef YM, Fendler A, Stephan C, Jung K, Yousef GM. The miRNA-kallikrein axis of interaction: a new dimension in the pathogenesis of prostate cancer. *Biol Chem* 2012 Apr 1;393(5):379-89.
106. Yousef GM, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem* 2002 Jul-Aug;383(7-8):1045-57.
107. Obiezu CV, Diamandis EP. Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett* 2005 Jun 16;224(1):1-22.
108. Bayani J, Petraki C, Dimitromanolakis A, Milou V, Diamandis E.P., Schmitt M. Chapter 8: Expression of Kallikrein-related Peptidases under (Patho-)Physiological Conditions.

Volume 1: Kallikrein-related Peptidases Characterization, Regulation, and Interactions Within the Protease Web 2012.

109. Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Molecular cancer research* 2004 May;2(5):257-80.

110. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol Chem* 2010 May;391(5):505-11.

111. Hollenberg MD, Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Ramachandran R, Diamandis EP. Kallikreins and proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of inflammatory diseases and cancer. *Biol Chem* 2008 Jun;389(6):643-51.

112. Duffy M, McGowan P, Gallagher W. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008 Feb;214(3):283-93.

113. Scorilas A, Mavridis K. Kallikrein-related peptidases (KLKs) as novel potential biomarkers in gastric cancer: an open yet challenging road lies ahead. *Journal of surgical oncology* 2012 Mar;105(3):223-4.

114. Kontos CK, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2012 Nov;50(11):1877-91.

115. Yousef GM, Chang A, Diamandis EP. 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 Apr 21;275(16):11891-8.

116. Chang A, Yousef GM, Jung K, Rajpert-De Meyts E, Diamandis EP. Identification and molecular characterization of five novel kallikrein gene 13 (KLK13; KLK-L4) splice variants: differential expression in the human testis and testicular cancer. *Anticancer research* 2001 Sep-Oct;21(5):3147-52.

117. Petraki CD, Karavana VN, Diamandis EP. Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2003 Apr;51(4):493-501.

118. Darling MR, Jackson-Boeters L, Daley TD, Diamandis EP. Human kallikrein 13 expression in salivary gland tumors. *The International journal of biological markers* 2006 Apr-Jun;21(2):106-10.

119. Chang A, Yousef GM, Scorilas A, Grass L, Sismondi P, Ponzzone R, Diamandis EP. Human kallikrein gene 13 (KLK13) expression by quantitative RT-PCR: an independent indicator of favourable prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 2002 May 6;86(9):1457-64.

120. Kapadia C, Chang A, Sotiropoulou G, Yousef GM, Grass L, Soosaipillai A, Xing X, Howarth DH, Diamandis EP. 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 Jan;49(1):77-86.

121. Kapadia C, Yousef GM, Mellati AA, Magklara A, Wasney GA, Diamandis EP. Complex formation between human kallikrein 13 and serum protease inhibitors. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004 Jan;339(1-2):157-67.

122. Kapadia C, Ghosh MC, Grass L, Diamandis EP. Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Oct 22;323(3):1084-90.

123. Andrade D, Assis DM, Santos JA, Alves FM, Hirata IY, Araujo MS, Blaber SI, Blaber M, Juliano MA, Juliano L. Substrate specificity of kallikrein-related peptidase 13 activated by salts or glycosaminoglycans and a search for natural substrate candidates. *Biochimie* 2011 Oct;93(10):1701-9.

124. White NM, Mathews M, Yousef GM, Prizada A, Popadiuk C, Dore JJ. KLK6 and KLK13 predict tumor recurrence in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2009 Oct 6;101(7):1107-13.

125. Scorilas A, Borgono CA, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, Diamandis EP. Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker. *J Clin Oncol* 2004 Feb 15;22(4):678-85.

126. Planque C, Blechet C, Ayadi-Kaddour A, Heuze-Vourc'h N, Dumont P, Guyetant S, Diamandis EP, El Mezni F, Courty Y. Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of the kallikrein-related peptidases 13 and 14 in lung. *Biol Chem* 2008 Jun;389(6):781-6.

127. Chou RH, Lin SC, Wen HC, Wu CW, Chang WS. Epigenetic activation of human kallikrein 13 enhances malignancy of lung adenocarcinoma by promoting N-cadherin expression and laminin degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Jun 10;409(3):442-7.

128. Konstantoudakis G, Florou D, Mavridis K, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene expressional status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas. *Clin Biochem* 2010 Oct;43(15):1205-11.

129. Florou D, Mavridis K, Scorilas A. The kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene is substantially up-regulated after exposure of gastric cancer cells to antineoplastic agents. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2012 Dec;33(6):2069-78.

130. Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Ashworth LK, Diamandis EP. Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15). Up-regulation in prostate cancer. *J Biol Chem* 2001 Jan 5;276(1):53-61.

131. Batra J, Nagle CM, O'Mara T, Higgins M, Dong Y, Tan OL, Lose F, Skeie LM, Srinivasan S, Bolton KL, Song H, Ramus SJ, Gayther SA, Pharoah PD, Kedda MA, Spurdle AB, Clements JA. A Kallikrein 15 (KLK15) single nucleotide polymorphism located close to a novel exon shows evidence of association with poor ovarian cancer survival. *BMC Cancer* 2011;11:119.

132. Takayama TK, Carter CA, Deng T. Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry* 2001 Feb 13;40(6):1679-87.
133. Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Memari N, Ponzzone R, Sismondi P, Biglia N, Abd Ellatif M, Diamandis EP. The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer* 2002 Nov 18;87(11):1294-300.
134. Mavridis K, Avgeris M, Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A. Expression analysis and study of the KLK15 mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Sci* 2010 Mar;101(3):693-9.
135. Rabien A, Fritzsche FR, Jung M, Tolle A, Diamandis EP, Miller K, Jung K, Kristiansen G, Stephan C. KLK15 is a prognostic marker for progression-free survival in patients with radical prostatectomy. *Int J Cancer* 2010 Nov 15;127(10):2386-94.
136. Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Bharaj BS, Nakamura T, Loening SA, Diamandis EP. Quantitative analysis of kallikrein 15 gene expression in prostate tissue. *J Urol* 2003 Jan;169(1):361-4.
137. Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Fracchioli S, Iskander L, Borgono C, Rigault de la Longrais IA, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP. Prognostic value of the human kallikrein gene 15 expression in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2003 Aug 15;21(16):3119-26.
138. Batra J, Lose F, O'Mara T, Marquart L, Stephens C, Alexander K, Srinivasan S, Eeles RA, Easton DF, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Guy M, Muir K, Lophatananon A, Rahman AA, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Chambers S, Gardiner RA, Aitken J, Yaxley J, Kedda MA, Clements JA, Spurdle AB. Association between Prostinogen (KLK15) genetic variants and prostate cancer risk and aggressiveness in Australia and a meta-analysis of GWAS data. *PLoS One* 2011;6(11):e26527.
139. Manuela Ferracin GAC, and Massimo Negrini. Chapter 1: MicroRNAs in Cancer (An Overview). *MicroRNAs in Cancer Translational Research*, William CS Cho Editor, 2011.
140. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009 Jan 23;136(2):215-33.
141. John B, Sander C, Marks DS. Prediction of human microRNA targets. *Methods Mol Biol* 2006;342:101-13.
142. Leung AK, Sharp PA. Function and localization of microRNAs in mammalian cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2006;71:29-38.
143. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and cellular pharmacology* 2011;3(3):83-92.
144. Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 2008 Feb;65(4):545-62.

145. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
146. Ashhar S. Ali SA, Aamir Ahmad, Philip A. Philip, and Fazlul H. Sarkar. Chapter 17: MicroRNAs in Cancer Invasion and Metastasis
MicroRNAs in Cancer Translational Research, William CS Cho Editor 2011.
147. Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2010 Mar 15;126(6):1283-90.
148. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006 Oct 9;25(46):6188-96.
149. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
150. Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010 Mar;17(1):F1-17.
151. Paolo Gandellini MF, and Nadia Zaffaroni. Chapter 6: MicroRNAs in Prostate Cancer: A Possible Role as Novel Biomarkers and Therapeutic Targets?, . MicroRNAs in Cancer Translational Research, William CS Cho Editor 2011.
152. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007 Jul 1;67(13):6130-5.
153. Schaefer A, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Schrader M, Miller K, Stephan C, Jung K. MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urol Oncol* 2010 Jan-Feb;28(1):4-13.
154. Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, Senzer N, Eklund AC, Han J, Nemunaitis J. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer gene therapy* 2009 Mar;16(3):206-16.
155. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2010 Mar 1;126(5):1166-76.
156. Kelly BD, Miller N, Healy NA, Walsh K, Kerin MJ. A review of expression profiling of circulating microRNAs in men with prostate cancer. *BJU Int* 2013 Jan;111(1):17-21.
157. Xi Chen JZ, Ke Zen, and Chen-Yu Zhang. Chapter 21: MicroRNAs as Blood-based Biomarkers of Cancer. MicroRNAs in Cancer Translational Research, William CS Cho Editor 2011.
158. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009;4(7):e6229.

159. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011 May;77(5):1265 e9-16.
160. Gandellini P, Folini M, Zaffaroni N. Emerging role of microRNAs in prostate cancer: implications for personalized medicine. *Discovery medicine* 2010 Mar;9(46):212-8.
161. Fendler A, Jung M, Stephan C, Honey RJ, Stewart RJ, Pace KT, Erbersdobler A, Samaan S, Jung K, Yousef GM. miRNAs can predict prostate cancer biochemical relapse and are involved in tumor progression. *International journal of oncology* 2011 Jul 18;39(5):1183-92.
162. Maugeri-Sacca M, Coppola V, Bonci D, De Maria R. MicroRNAs and prostate cancer: from preclinical research to translational oncology. *Cancer J* 2012 May-Jun;18(3):253-61.
163. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stoppler H, Simko J, Hilton JF, Carroll P, Belloch R. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res* 2011 Jan 15;71(2):550-60.
164. Yousef GM, White, Nicole M.A. Chapter 8: microRNAs: A New Control Mechanism for Kallikrein-related Peptidases in Kidney and Other Cancers. Volume 2: Kallikrein-related Peptidases Novel Cancer-related Biomarkers 2012.
165. Chow TF, Crow M, Earle T, El-Said H, Diamandis EP, Yousef GM. Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental-based analysis. *Biol Chem* 2008 Jun;389(6):731-8.
166. White NM, Yousef GM. MicroRNAs: exploring a new dimension in the pathogenesis of kidney cancer. *BMC medicine* 2010;8:65.
167. White NM, Chow TF, Mejia-Guerrero S, Diamandis M, Rofael Y, Faragalla H, Mankaruous M, Gabril M, Girgis A, Yousef GM. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2010 Apr 13;102(8):1244-53.
168. Sun R, Fu X, Li Y, Xie Y, Mao Y. Global gene expression analysis reveals reduced abundance of putative microRNA targets in human prostate tumours. *BMC genomics* 2009;10:93.
169. Hao Y, Zhao Y, Zhao X, He C, Pang X, Wu TC, Califano JA, Gu X. Improvement of prostate cancer detection by integrating the PSA test with miRNA expression profiling. *Cancer investigation* 2011 May;29(4):318-24.
170. Hildebrand J, Rutze M, Walz N, Gallinat S, Wenck H, Deppert W, Grundhoff A, Knott A. A comprehensive analysis of microRNA expression during human keratinocyte differentiation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 2011 Jan;131(1):20-9.
171. Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem* 2008 May 9;283(19):13205-15.

172. Yao G, Yin M, Lian J, Tian H, Liu L, Li X, Sun F. MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4. *Mol Endocrinol* 2010 Mar;24(3):540-51.
173. Fellenberg J, Saehr H, Lehner B, Depeweg D. A microRNA signature differentiates between giant cell tumor derived neoplastic stromal cells and mesenchymal stem cells. *Cancer Lett* 2012 Feb 7;321(2):162-8.
174. Giricz O, Reynolds PA, Ramnauth A, Liu C, Wang T, Stead L, Childs G, Rohan T, Shapiro N, Fineberg S, Kenny PA, Loudig O. Hsa-miR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity. *J Pathol* 2012 Jan;226(1):108-19.
175. Gokhale A, Kunder R, Goel A, Sarin R, Moiyadi A, Shenoy A, Mamidipally C, Noronha S, Kannan S, Shirsat NV. Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway. *J Cancer Res Ther* 2010 Oct-Dec;6(4):521-9.
176. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007 Sep 15;67(18):8699-707.
177. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 2008 Jun;47(6):1955-63.
178. Li Q, Wang G, Shan JL, Yang ZX, Wang HZ, Feng J, Zhen JJ, Chen C, Zhang ZM, Xu W, Luo XZ, Wang D. MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells and involved in cellular migration and invasion. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 Jan;25(1):164-71.
179. Liu H, Brannon AR, Reddy AR, Alexe G, Seiler MW, Arreola A, Oza JH, Yao M, Juan D, Liou LS, Ganesan S, Levine AJ, Rathmell WK, Bhanot GV. Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma. *BMC Syst Biol* 2010;4:51.
180. Martens-Uzunova ES, Jalava SE, Dits NF, van Leenders GJ, Moller S, Trapman J, Bangma CH, Litman T, Visakorpi T, Jenster G. Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* 2012 Jul 18;31(8):978-91.
181. Mees ST, Mardin WA, Sielker S, Willscher E, Senninger N, Schleicher C, Colombo-Benkmann M, Haier J. Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2009 Aug;16(8):2339-50.
182. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 May;93(5):1600-8.
183. Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG, Lee DH, Stephens RM, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Ambs S. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate* 2008 Aug 1;68(11):1152-64.

184. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, Farinella F, Mazzotta M, Carinci F. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010 Oct-Dec;23(4):1229-34.
185. Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, De Iaco R, D'Onorio de Meo P, Cervello M, Montalto G, Pollicino T, Raimondo G, Levrero M, Pediconi N. Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFkappaB inflammatory pathways. *Journal of hepatology* 2012 Apr;56(4):855-61.
186. Wang Y, Toh HC, Chow P, Chung AY, Meyers DJ, Cole PA, Ooi LL, Lee CG. MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2012 Mar 29.
187. Lichner Z, Mejia-Guerrero S, Ignacak M, Krizova A, Bao TT, Girgis AH, Youssef YM, Yousef GM. Pleiotropic action of renal cell carcinoma-dysregulated miRNAs on hypoxia-related signaling pathways. *The American journal of pathology* 2012 Apr;180(4):1675-87.
188. Han Y, Chen J, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Jiang Z, Zhang Z, Yang R, Li Z, Tang A, Li X, Ye J, Guan Z, Gui Y, Cai Z. MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2011;6(3):e18286.
189. Boguslawska J, Wojcicka A, Piekliko-Witkowska A, Master A, Nauman A. MiR-224 targets the 3'UTR of type 1 5'-iodothyronine deiodinase possibly contributing to tissue hypothyroidism in renal cancer. *PLoS One* 2011;6(9):e24541.
190. Wang Y, Lee CG. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention? *Epigenomics* 2011 Apr;3(2):235-43.
191. Oberg AL, French AJ, Sarver AL, Subramanian S, Morlan BW, Riska SM, Borralho PM, Cunningham JM, Boardman LA, Wang L, Smyrk TC, Asmann Y, Steer CJ, Thibodeau SN. miRNA Expression in Colon Polyps Provides Evidence for a Multihit Model of Colon Cancer. *PLoS One* 2011;6(6):e20465.
192. Wang YX, Zhang XY, Zhang BF, Yang CQ, Chen XM, Gao HJ. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis. *J Dig Dis* 2010 Feb;11(1):50-4.
193. Li X, Shen Y, Ichikawa H, Antes T, Goldberg GS. Regulation of miRNA expression by Src and contact normalization: effects on nonanchored cell growth and migration. *Oncogene* 2009 Dec 3;28(48):4272-83.
194. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006 Mar;9(3):189-98.
195. Zhu S, Sachdeva M, Wu F, Lu Z, Mo YY. Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner. *Oncogene* 2010 Mar 25;29(12):1763-72.

196. Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007 Sep;56(3):248-53.
197. Mencia N, Selga E, Noe V, Ciudad CJ. Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. *Biochemical pharmacology* 2011 Dec 1;82(11):1572-82.
198. Mian C, Pennelli G, Fassan M, Balistreri M, Barollo S, Cavedon E, Galuppini F, Pizzi M, Vianello F, Pelizzo MR, Girelli M, Rugge M, Opocher G. microRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2012 May 3.
199. Gladson CL, Welch DR. New insights into the role of CXCR4 in prostate cancer metastasis. *Cancer biology & therapy* 2008 Nov;7(11):1849-51.
200. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 2003 Jun 1;89(3):462-73.
201. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol* 2005 Feb;173(2):342-59.
202. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. *J Urol* 2005 Feb;173(2):360-72.
203. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
204. Ruben RL. *Advances in Cell Culture*. Vol 6 New York: Academic 1988.
205. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987 Apr;162(1):156-9.
206. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 2006;1(2):581-5.
207. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques* 2005 Oct;39(4):519-25.
208. Lutfalla G, Uze G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods in enzymology* 2006;410:386-400.
209. McPherson M.J. *MSG. Pcr, the basics*, ed 1st. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd 2000.
210. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
211. <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>.

212. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2005 Jan;85(1):154-9.
213. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, Jung K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med (Berl)* 2005 Dec;83(12):1014-24.
214. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993 Sep;11(9):1026-30.
215. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001 Dec;25(4):386-401.
216. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 2005 Jun;6(4):279-84.
217. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education* 2005 Sep;29(3):151-9.
218. Markopoulos C, Xepapadakis G, Venizelos V, Tsiftoglou A, Mitsizis J, Panoussis D, Antonopoulou Z, Stathoulopoulou M, Zobolas V, Gogas H. Clinical experience of using Oncotype DX as an additional treatment decision tool in early breast cancer - a retrospective analysis from 5 Greek institutions. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2012 May;38(5):413-9.
219. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 2008;3(6):1101-8.
220. Real-time pcr systems 7900ht fast real-time pcr system and 7300/7500/7500fast real-time pcr systems, chemistry guide.
221. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
222. http://www.biorad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/gene_expression/qPCR_real-time_PCR/technology_detail/gxt28_img3.gif.
223. Absolute quantification, applied biosystems 7300/7500/7500 fast real-time pcr system.
224. Nonn L, Vaishnav A, Gallagher L, Gann PH. mRNA and micro-RNA expression analysis in laser-capture microdissected prostate biopsies: valuable tool for risk assessment and prevention trials. *Experimental and molecular pathology* 2010 Feb;88(1):45-51.
225. Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Lubovac Z, Andren O, Olsson B, Klinga-Levan K. Validation of suitable endogenous control genes for expression studies of miRNA in prostate cancer tissues. *Cancer genetics and cytogenetics* 2010 Oct 15;202(2):71-5.

226. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
227. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 1984 Dec;10(3-4):203-9.
228. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*. Pacific Grove: Duxbury 2006.
229. Dinse GE, Lagakos SW. Nonparametric estimation of lifetime and disease onset distributions from incomplete observations. *Biometrics* 1982 Dec;38(4):921-32.
230. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982 Apr;143(1):29-36.
231. Long JS. *Regression Models for categorical and limited dependent variables*. Thousand Oaks, CA: Sage Publications 1997.
232. Hanley JA. Appropriate uses of multivariate analysis. *Annual review of public health* 1983;4:155-80.
233. Peduzzi P, Concato J, Feinstein AR, Holford TR. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *Journal of clinical epidemiology* 1995 Dec;48(12):1503-10.
234. Christensen E. Multivariate survival analysis using Cox's regression model. *Hepatology* 1987 Nov-Dec;7(6):1346-58.
235. Crook J, Gillan C, Yeung I, Austen L, McLean M, Lockwood G. PSA kinetics and PSA bounce following permanent seed prostate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007 Oct 1;69(2):426-33.
236. Mavridis K, Schmitt, Manfred, Scorilas, Andreas Chapter 10: Kallikrein-related Peptidases as Biomarkers in Personalized Cancer Medicine. Volume 2: Kallikrein-related Peptidases Novel Cancer-related Biomarkers 2012.
237. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, Neilly MB, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Zhang DE, Larson RA, Le Beau MM, Thirman MJ, Golub TR, Rowley JD, Chen J. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Oct 7;105(40):15535-40.
238. Mahajan NP, Liu Y, Majumder S, Warren MR, Parker CE, Mohler JL, Earp HS, Whang YE. Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 May 15;104(20):8438-43.
239. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006 Apr 20;25(17):2537-45.
240. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010 Aug 12;466(7308):835-40.

241. Drucker KL, Paulsen AR, Giannini C, Decker PA, Blaber SI, Blaber M, Uhm JH, O'Neill BP, Jenkins RB, Scarisbrick IA. Clinical significance and novel mechanism of action of kallikrein 6 in glioblastoma. *Neuro-oncology* 2013 Mar;15(3):305-18.
242. Zhang R, Shi H, Chen Z, Feng W, Zhang H, Wu K. Effects of kallikrein-related peptidase 14 gene inhibition by small interfering RNA in ovarian carcinoma cells. *Molecular medicine reports* 2012 Jan;5(1):256-9.
243. Mavridis K, Talieri M, Scorilas A. KLK5 gene expression is severely upregulated in androgen-independent prostate cancer cells after treatment with the chemotherapeutic agents docetaxel and mitoxantrone. *Biol Chem* 2010 Apr;391(4):467-74.
244. Thomadaki H, Mavridis K, Talieri M, Scorilas A. Treatment of PC3 prostate cancer cells with mitoxantrone, etoposide, doxorubicin and carboplatin induces distinct alterations in the expression of kallikreins 5 and 11. *Thrombosis and haemostasis* 2009 Feb;101(2):373-80.
245. Papachristopoulou G, Talieri M, Scorilas A. Significant alterations in the expression pattern of kallikrein-related peptidase genes KLK4, KLK5 and KLK14 after treatment of breast cancer cells with the chemotherapeutic agents epirubicin, docetaxel and methotrexate. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2013 Feb;34(1):369-78.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής

1. **Mavridis K**, Stravodimos K, Scorilas A. Downregulation and Prognostic Performance of MicroRNA 224 Expression in Prostate Cancer *Clin Chem*; 59(1), 2013.
2. **Mavridis K**, Stravodimos K, Scorilas A. Quantified KLK15 gene expression levels discriminate prostate cancer from benign tumors and constitute a novel independent predictor of disease progression. *Prostate; In Press*, [Epub ahead of print], 2013.
3. Avgeris M, **Mavridis K**, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem*; 393(5):301-17, 2012.
4. **Mavridis K**, Avgeris M, Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A. Expression analysis and study of the KLK15 mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Sci*; 101(3):693-9, 2010.
5. **Mavridis K**, Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol*; 6(2):269-8, 2010.
6. Avgeris M, **Mavridis K**, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol Chem*; 391(5):505-11, 2010.

Συγγραφή κεφαλαίου σε διεθνές επιστημονικό βιβλίο

7. **Mavridis K.**, Schmitt M. Scorilas, A. Chapter 10: Kallikrein-related Peptidases as Biomarkers in Personalized Cancer Medicine *Kallikrein-related peptidases: Novel cancer-related biomarkers*, pp: 201-218. Edited by Magdolen V., Sommerhoff C.P., Fritz H., Schmitt M., **DE GRUYTER**, 2012.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

(Τελευταία ενημέρωση: Μάιος 2013)

Κωνσταντίνος Μαυρίδης

Έτος και τόπος γέννησης: 1984, Αθήνα, Ελλάδα
Υπηκοότητα: Ελληνική
Διεύθυνση Εργασίας: Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιοχημείας-Ερευνητική Μονάδα IV, 15 701, Πανεπιστημιόπολη, Ιλίσια, Αθήνα, Ελλάδα.
Τηλ: +30-210-727-4695
Φαξ: +30-210-727-415
E-mail: mavridiskos@gmail.com

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά, Certificate of Proficiency in English.

Πανεπιστημιακή Εκπαίδευση

Πτυχίο Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας (2002-2007).

Συνοπτική Παρουσίαση του Επιστημονικού Έργου

- ✓ 16 δημοσιεύσεις σε Διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές.
- ✓ Συνολικός συντελεστής εμβέλειας **I.F. = 55,47**.
- ✓ 78 βιβλιογραφικές αναφορές (Scopus, May 2013).
- ✓ Συγγραφή κεφαλαίου σε διεθνές επιστημονικό βιβλίο.
- ✓ 30 Δημοσιεύσεις σε πρακτικά διεθνών και εθνικών συνεδρίων.
- ✓ 5 Προφορικές παρουσιάσεις σε συνέδρια (κατόπιν διαδικασίας επιλογής).
- ✓ 25 Αναρτημένες ανακοινώσεις σε συνέδρια.
- ✓ **Reviewer in:** BMC Cancer, European Journal of Clinical Investigation, Annals of Clinical Biochemistry, Preparative Biochemistry and Biotechnology.

Βραβεία και διακρίσεις

- Απονομή του διεθνούς επιστημονικού βραβείου E.K.Frey-E.Werle Young Investigator Award 2011.
- Συμμετοχή, μετά από διεθνή διαδικασία επιλογής, στο 61st Lindau Nobel Laureate Meeting dedicated to Physiology/Medicine, June 2011 (με υποτροφία από το Alexander S. Onassis Public Benefit Foundation).
- Βραβείο για την καλύτερη προφορική ανακοίνωση στο “18^ο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας”, April, 2012.
- Βραβείο για την καλύτερη αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο “8th Tumor markers-targeted Therapy Congress”, Athens, Greece, November 2010.
- Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του Συνεδρίου “4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011)”.
- Υποτροφίες για συμμετοχή στα συνέδρια της Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology (FEBS): FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, July 2009 και 33th FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, Athens, July, 2008.
- Υποτροφία από το ΙΚΥ για το δεύτερο έτος σπουδών στο Τμήμα Βιολογίας (2004).
- Reviewer στα επιστημονικά περιοδικά: BMC Cancer, European Journal of Clinical Investigation, Annals of Clinical Biochemistry, Preparative Biochemistry and Biotechnology.

Κατάλογος δημοσιεύσεων σε διεθνή περιοδικά με κριτές (2011 impact factors)

A. Original Research Papers

1. **Mavridis K**, Stravodimos K, Scorilas A. Down-regulation and prognostic significance of microRNA 224 (miR-224) expression in prostate cancer. *Clin Chem*, 59(1):261-9, 2013 (I.F= 7.905).
2. **Mavridis K**, Stravodimos K, Scorilas A. Quantified KLK15 Gene Expression Levels Discriminate Prostate Cancer From Benign Tumors and Constitute a Novel Independent Predictor of Disease Progression., *Prostate*;73(11):1191-201, 2013 (I.F= 3.485).

3. Florou D, **Mavridis K**, Scorilas A. The kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene is substantially up-regulated after exposure of gastric cancer cells to antineoplastic agents. *Tumour Biol*, 33(6):2069-782012 (IF=2.143).
4. Koutalellis G, Stravodimos K, Avgeris M, **Mavridis K**, Scorilas A, Lazaris A, Constantinides C. L-dopa decarboxylase (DDC) gene expression is related to outcome in patients with prostate cancer. *BJU Int*, 110(6 Pt B):267-73, 2012 (IF=2.844).
5. Xinopoulos D, Bassioulas SP, Kypreos D, Korkolis D, Scorilas A, **Mavridis K**, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E. Pancreatic duct guidewire placement for biliary cannulation in a single-session therapeutic ERCP. *World J Gastroenterol*, 17(15):1989-95, 2011 (IF= 2.471).
6. Xinopoulos D, Kypreos D, Bassioulas SP, Korkolis D, **Mavridis K**, Scorilas A, Dimitroulopoulos D, Loukou A, Paraskevas E. Comparative study of balloon and metal olive dilators for endoscopic management of benign anastomotic rectal strictures: clinical and cost-effectiveness outcomes. *Surg Endosc*, 25(3):756-63, 2010 (I.F=4.013).
7. **Mavridis K**, Avgeris M., Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A. Expression analysis and study of the *KLK15* mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia *Cancer Sci*, 101 (3):693 – 699, 2010 (IF= 3.325)
8. **Mavridis K**, Talieri M, Scorilas A. *KLK5* gene expression is severely upregulated in androgen independent prostate cancer cells after treatment with the chemotherapeutic agents docetaxel and mitoxantrone. *Biol Chem*, 391(4):467-74., 2010 (IF=2.965).
9. Konstantoudakis G, Florou D, **Mavridis K**, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene expressional status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas. *Clin Biochem*, 43(15):1205-11, 2010 (I.F=2.076).
10. Thomadaki H, **Mavridis K**, Talieri M, Scorilas A. Treatment of PC3 prostate cancer cells with mitoxantrone, etoposide, doxorubicin and carboplatin induces distinct alterations in the expression of kallikreins 5 and 11. *Thromb Haemostasis*, 101(2):373-80, 2009 (I.F=5.044).

B. Reviews

11. Kontos CK, **Mavridis K**, Talieri M, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs) in gastrointestinal cancer: Mechanistic and clinical aspects. *Thromb Haemost*;109(5), 2013 (I.F=5.044).
12. Avgeris M, **Mavridis K**, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem*, 393(5):301-17, 2012 (IF=2.965).
13. Avgeris M, **Mavridis K**, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol Chem*, 391(5):505-11 2010 (IF=2.965)
14. **Mavridis K** and Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol*, 6(2):269-85, 2010 (IF=3.163).

C. Editorials

15. Scorilas A, **Mavridis K**, Magdolen V, Fritz H. Highlight: the 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-related peptidases. *Biol Chem*, 393(5):299-300, 2012 (IF=2.965).
16. Scorilas A, **Mavridis K**. Kallikrein-related peptidases (KLKs) as novel potential biomarkers in gastric cancer: An open yet challenging road lies ahead. *J Surg Oncol*, 105(3):223-4, 2012. (I.F= 2.100).

D. Book Chapters

17. **Mavridis K.**, Schmitt M. Scorilas, A. Chapter 10: Kallikrein-related Peptidases as Biomarkers in Personalized Cancer Medicine *Kallikrein-related peptidases: Novel cancer-related biomarkers*, pp: 201-218. Edited by Magdolen V., Sommerhoff C.P., Fritz H., Schmitt M., **DE GRUYTER**, 2012.

Δημοσιεύσεις σε Πρακτικά Συνεδρίων

1. **Mavridis K.**, Stravodimos K., Scorilas A. Quantitative analysis and evaluation of KLK15 classical mRNA transcript levels as a biomarker of disease progression in prostate cancer. Proc Advances in Circulating Tumour Cells (ACTC 2012), P32, pp110, Athens, September 2012.
2. **Mavridis K.**, Avgeris M., Stravodimos K. and Scorilas A. Expression analysis of miR-145 and miR-224 in prostate cancer: differential diagnostic and prognostic significance. *P28-10, P28-9 Proc FEBS 2012, Seville, Spain, 2012 & FEBS Journal 279 (Suppl. 1) 600–608, pp 602-603, 2012.*
3. Kontos C.K., **Mavridis K** and Scorilas A. Quantitative Expression Analysis And Study Of BCL2L12 And Other Members Of The BCL2 Apoptosis-Related Gene Family, As Promising Biomarkers For Monitoring Of Prostate And Colon Cancer Cellular Response To Chemotherapy. *Proc 22nd ETRS meeting, pp 72, 4-5 October 2012, Athens, Greece, 2012.*
4. Kontos C.K., Thomadaki H., **Mavridis K.**, Ardavanis A., and Scorilas A. Identification and molecular cloning of novel splicing variants of BCL2L12, a new member of the BCL2 family, and their expression analysis in breast, prostate, and colon cancer cells. *Proc. of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Cancer Res 2012;72(8 Suppl):Abstract nr 2006, Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; Mar 31-Apr 4, 2012.*
5. Michaelidou K., Tzovaras A., Tsoukalas N., **Mavridis K.**, Tsoukalas G., Tsapralis N., Stamatopoulou S., Zylis D., Misitzis I., Ardavanis A. and Scorilas A. Evaluation of the Clinical Utility of Kallikrein-Related Peptidase 6 Gene (KLK6) downregulation in Breast Cancer. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting 2012, Chicago, Illinois, June 2012.
6. **Μαυρίδης Κ.**, Τζοβάρας Α., Στραβοδήμος Κ., Σταματοπούλου Σ., Ντόκου Α., Καλτσάς Σ., Α. Αρδαβάνης Α. και Σκορίλας Α. Ποσοτική Ανάλυση και Κλινική Αξιολόγηση της Έκφρασης του Νέου Γονιδίου της Καλλικρεΐνης 15 (KLK15) και του Σχετιζομένου

Ρυθμιστικού Μικρομοριακού RNA miR-224 στον Καρκίνο Του Προστάτη. 18ο συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Athens, Greece, April 2012 (1^ο Βραβείο προφορικής παρουσίασης).

7. **Mavridis K.**, Stravodimos K., Scorilas A. Quantitative Analysis And Study Of The microRNA 224 (mir-224) And Its Target, *KLK15* Gene, In Prostate Tumors: Investigation Of Their Clinical Significance *Proc. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011)*, Rhodes, Greece, OP18, pp.50, September 2011 (selected oral presentation).
8. Florou D., **Mavridis K.**, Scorilas A. Exposure Of Gastric Cancer Cells To Various Antineoplastic Drugs Modifies *KLK13* mRNA Expression Levels. *Proc. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011)*, Rhodes, Greece, P32, pp.78, September 2011.
9. Karaliotas G. I., **Mavridis K.**, Scorilas A., Babis G. C. Expression Analysis Of The mRNA Levels Of Kallikrein-Related Peptidases In Human Osteoarthritis. *Proc. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011)*, Rhodes, Greece, P23, pp.73, September 2011.
10. Tzovaras A., **Mavridis K.**, Ardavanis A. and Scorilas A. Expression Analysis and Study of BCL2 and the Novel Member of the Apoptotic Genes BCL2L12, as Promising Biomarkers for Monitoring of Prostate Cancer Cells' Response to Chemotherapy. *European Multidisciplinary Cancer Congress, 16th ECCO, 36th ESMO, 30th ESTRO Congress*, Stockholm, *European Journal Of Cancer* Volume: 47 Supplement: 1 pp: S173-S173 , September 2011.
11. Karaliotas G.I., **Mavridis K.**, Scorilas A., Babis G. mRNA expression Analysis Of *BCL2*, *BAX* And *BCL2L12* Apoptotic Genes In Osteoarthritis., *Proc.American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting, San Diego, CA, USA, February 2011*, pp226, Poster No. P188, 2011.
12. **Mavridis K.**, Thomadaki H., Ardavanis A., Scorilas A. Treatment of androgen independent prostate cancer cells with methotrexate leads to apparent upregulation of the mRNA levels of Kallikrein genes *KLK5*, *KLK13* and *KLK15*. *Journal of BUON*, Vol.15,

- Supp1, OP58, pp20, 6 and 8th Congress of the Balkan Union of Oncology, Sibiu, Romania, September 2010. September 2010 (*selected oral presentation*).
13. Tzovaras A., **Mavridis K.**, Thomadaki H., Doufexis D., Maliou S., Kountourakis P., Malamos N., Ardavanis A., Scorilas A. Molecular analysis and study of BCL2 gene family members of the apoptotic genes as promising biomarkers for monitoring breast, prostate and ovarian cancer cells' response to chemotherapy *Journal of BUON*, Vol.15, Supp1, OP55, pp20 and 6. 8th Congress of the Balkan Union of Oncology, Sibiu, Romania, September 2010 (*selected oral presentation*).
 14. **Μαυρίδης Κ.**, Στραβοδήμος Κ.. Αρδαβάνης Α. και Σκορίλας Α. Ποσοτική Ανάλυση Της Έκφρασης του Γονιδίου της Καλλικρεΐνης 13 (KLK13) στον Καρκίνο του Προστάτη και στην Καλοήγη Προστατική Υπερπλασία, “8th Tumor markers-targeted Therapy Congres”, Athens, Greece, November 2010. *1^ο Βραβείο αναρτημένης εργασίας*.
 15. **Mavridis K.**, Thomadaki H., Talieri M., Scorilas A. Prostate Cancer Cells Respond to Mitoxantrone and Doxorubicin treatment by modulating the Expression Profiles of *BCL2* Apoptotic Family Genes and the kallikrein-related peptidase 5 (*KLK5*). *Proc International Society for Enzymology, Conference On Enzymes New Roles for Old Molecules*, P16, 2010.
 16. Koutalellis G., Stravodimos K., Avgeris M., **Mavridis K.**, Scorilas A., Constandinides C. Clinical and molecular differences between benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Proc. 3rd World Congress on Controversies in Urology (CURy)*, A-25, 2010.
 17. Dimitrakopoulou D., **Mavridis K.**, Margaritis A., Stravodimos K. and Scorilas A. Evaluation of the Differential Diagnostic Potential of the mRNA Transcripts Encoded by the Novel Gene *KLK15* in Prostate Tumors. *Proc. 32nd Annual Congress of Hellenic Society for Biological Sciences*, pp 95, 2010.
 18. Tzovaras A., K. **Mavridis K.**, Doufexis D., Maliou S., Thomadaki H., Kountourakis P., Talieri M., Ardavanis A. and Scorilas A. Expression analysis and study of the role of novel genes as molecular markers for determining prostate, breast and ovarian cancer cells' response to chemotherapy *Proc. 16th Annual Hellenic Congress on Clinical Oncology*, 2010.

19. **Mavridis K.**, Scorilas A. Treatment of prostate cancer cells with chemotherapeutic agents induces distinct alterations in the mRNA expression pattern of the kallikrein-related peptidases genes *KLK13* and *KLK15*. *Proc. International Conference on Molecular Cancer Research* O-24, 2009 (selected oral presentation).
20. **Mavridis K.**, Talieri M., Scorilas A. Expression profiles of the *KLK5* and *KLK15* genes in the androgen independent prostate cancer cells after treatment with the anticancer agents mitoxantrone, doxorubicin and epirubicin *Proc Int Symp Kallikreins*: L9.4, 2009 (selected oral presentation).
21. Florou D, Konstantoudakis G, **Mavridis K.**, Papadopoulos IN, Scorilas A. Quantitative analysis of *KLK13* mRNA expressional status and its clinical value in human primary gastric carcinomas *Proc Int Symp Kallikreins*: P12, 2009.
22. **Mavridis K.**, Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A., Quantitative analysis of the kallikrein-related peptidase 13 in prostate tumors *Proc Int Symp Kallikreins*: P19, 2009.
23. Micahaelidou K., **Mavridis K.**, Scorilas A. Expression analysis of the kallikrein genes *KLK11* and *KLK13* in cancer cells and prostate tumors. *Proc 31th Annual Congress of Hellenic Society for Biological Sciences*, pp231, 2009.
24. **Mavridis K.**, Scorilas A. Preclinical evaluation of the novel Kallikrein genes *KLK13* and *KLK15* as new putative molecular markers for difeerencial diagnosis and suitabkle therapeutic handing of prostate cancer. *FEBS JOURNAL*, 69, 143-143, 2009.
25. Thomadaki H, **Mavridis K.** and Scorilas A. BCL-2, BAX and BCL2L12 are modulated at the mRNA level in response of leukemic cells to the ABL protein tyrosine kinase inhibitor, Gleevec *FEBS JOURNAL*, 275: 110-110, 2008.
26. Thomadaki H, **Mavridis K.**, Tsiapalis CM, Gourgiotis D and Scorilas A. Effect of Zn²⁺, a caspase regulator, on survival of U937 cells, a human histolytic lymphoma cell line: implication of polyadenylation. *Proc Int Prot Soc*: P 291, 2007.
27. Avgeris M, **Mavridis K.**, Thomadaki H, Kontos Ch, Avzioti K, Papalexis P, **Scorilas A.** Expression analysis of the genes *KLK4* and *KLK15* in cancer cell lines. *Proc Int Symp Kallikreins*: P43, 2007.

28. **Mavridis K.**, Avgeris M, Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A. Clinical evaluation of the KLK15 mRNA spliced variants in prostate tumors. *Proc Int Symp Kallikreins*: P44, 2007.
29. Thomadaki H, **Mavridis K.**, Talieri M, Scorilas A. Kallikreins 11 and 15 are new putative molecular markers for suitable therapeutic handling of prostate cancer. *Proc Int Symp Kallikreins*: P46, 2007.
30. **Mavridis K.**, Avgeris M., Koutalellis G, Stravodimos K, Scorilas A. Expression analysis and study of the novel KLK15 (Kallikrein 15) gene in prostate tumors. *Proc 29th Annual Congress of Hellenic Society for Biological Sciences*, pp 75, 2007.

Επιστημονικά Συνέδρια

A. Προφορικές ανακοινώσεις

1. 18^ο συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Athens, Greece, April 2012 (**1^ο Βραβείο**).
2. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011), Rhodes, Greece, September 2011.
3. 8th Congress of the Balkan Union of Oncology, Sibiu, Romania, September 2010.
4. 1st International Conference on Molecular Cancer Research, Athens, Greece, November 2009.
5. 3rd International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related peptidases, Munich, Germany, September 2009

B. Αναρτημένες ανακοινώσεις (posters)

1. 37th FEBS Congress and 22nd IUBMB Meeting, Seville, Spain, September 2012
2. Advances in Circulating Tumour Cells (ACTC 2012), Athens, September 2012.
3. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2012, Chicago, Illinois, April 2012.
4. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting 2012, Chicago, Illinois, June 2012.

5. 22nd ETRS meeting, October 2012, Athens, Greece, 2012.
6. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011), Rhodes, Greece, September 2011.
7. European Society for Medical Oncology (ESMO) 2011 Congress, Stockholm, September 2011.
8. European Multidisciplinary Cancer Congress, 16th ECCO, 36th ESMO, 30th ESTRO Congress, Stockholm, September 2011
9. American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting, San Diego, CA, USA, February 2011.
10. ISE International Conference On Enzymes New Roles for Old Molecules: Enzymes in Personalized Medicine, Crete, Greece, 2010.
11. International Society for Enzymology (ISE) International Conference On Enzymes New Roles for Old Molecules: Enzymes in Personalized Medicine, Chania, Greece, May 2010.
12. “8th Tumor markers-targeted Therapy Congress”, Athens, Greece, November 2010 (**1^o Βραβείο**).
13. 32nd Annual Congress of Hellenic Society for Biological Sciences, Karpenisi, Greece, May 2010
14. 16th Annual Hellenic Congress on Clinical Oncology, Athens, Greece, April 2010
15. 3rd World Congress on Controversies in Urology (CURy), Athens, Greece, February 2010
16. 3rd International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related peptidases, Munich, Germany, September 2009.
17. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets, Patras, Greece, July 2009.
18. 31st Annual Congress of Hellenic Society for Biological Sciences, Patra, Greece, May 2009
19. 33th FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, Athens, July, 2008.
20. 2nd International Symposium on Kallikreins and Kallikrein Related Paptidases, Santorini, October 2007.

21. 5th meeting of International Proteolysis Society, Patras, Greece, October 2007.

22. 29th Annual Congress of Hellenic Society for Biological Sciences, Kavala, Greece, May 2007.