

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ΝΕS1* (*KLK10*) ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

A@HNA 2014

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. (Επιβλέπων) Φραγκούλης Γ. Εμμανουήλ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. Σίδερης Διαμάντης, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Φραγκούλης Γ. Εμμανουήλ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. Γουργιώτης Δημήτριος, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α. Παπαδόπουλος Ιορδάνης, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α. Σίδερης Διαμάντης, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. Ιωάννης Τρουγκάκος, Επίκ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. Δημήτριος Κλέτσας, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος".

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

Στην οικογένεια μου

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2006 – Σεπτέμβριος 2013 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) με επιστημονικό υπεύθυνο τον Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση αλλά και την υποστήριξη σε άλλες επιλογές που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Αποτελεί μεγάλη μου τιμή η συμμετοχή του Καθηγητή Εμμανουήλ Φραγκούλη στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεχίσω και να ολοκληρώσω τη διατριβή μου στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Επίσης, θα ήθελα ολόθερμα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή Διαμάντη Σίδερη για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής, τις εύστοχες υποδείξεις του, και το ειλικρινές ενδιαφέρον που έχει για όλους τους φοιτητές.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες και απεριόριστο σεβασμό οφείλω στον Καθηγητή του Πανεπιστημίου του Τορόντο, Ελευθέριο Διαμαντή, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω μέρος της διδακτορικής μου διατριβής στο εργαστήριό του. Ευχαριστώ ακόμα τον Antoninus Soosaipillai για την τεχνική βοήθεια και τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής στο εργαστήριο του Καθηγητή Ε. Διαμαντή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α., Ιορδάνη Παπαδόπουλο, για την πολύπλευρη βοήθειά του ιδιαίτερα σε ότι αφορούσε θέματα σχετικά με την συλλογή και αξιολόγηση του βιολογικού υλικού, καθώς και τον ιατρό Σπύρο Χριστιδούλου, για τη λεπτομερή βάση κλινικοπαθολογικών δεδομένων και δεδομένων επιβίωσης των ασθενών.

Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες τους πρώτους από τους συναδέλφους μου που γνώρισα στο ξεκίνημα αυτή της διδακτορικής διατριβής και να μην τους ευχαριστήσω για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν, για την άψογη

i

συνεργασία αλλά και για το φιλικό εκτός από το επαγγελματικό ενδιαφέρον. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω το Δρα Παναγιώτη Πρέζα, τη Δρα Κωνσταντίνα Μαθιουδάκη, τη Δρα Θεώνη Λεουτσάκου, τη Δρα Ελληνίδα Θωμαδάκη καθώς επίσης και τη Δρα Μαρουλιώ Ταλιέρη, χωρίς την υποστήριξη και καθοδήγηση της οποίας, δεν ξέρω αν θα είχα ξεκινήσει αυτή τη διατριβή. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να αναφερθώ στους συναδέλφους μου, με τους οποίους συνεργάστηκα στα πλαίσια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, παρέγοντας μου έμπρακτη βοήθεια και πολύτιμες συμβουλές. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά από το εργαστήριο, ξεκινώντας από τους Κωνσταντίνο Μαυρίδη, Δήμητρα Φλώρου, Αυγέρη Μαργαρίτη, Δημήτριο Κορμπάκη, Κλείτα Μιχαηλίδου και Αθηνά Κλάδη-Σκανδάλη, καθώς επίσης και στους συναδέλφους από τα γειτονικά εργαστήρια Δήμητρα Βερούλη, Ιωάννα Χαλατσά, Ιωάννα Κοκκίνου, Μαριάννα Κυρίτση, και Βαγγέλη Καρούση, και για την επιστημονική βοήθεια αλλά και για το πολύ ευχάριστο περιβάλλον εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρα Χρήστο Κοντό, καθώς η συνεισφορά του και η ανταλλαγή επιστημονικών απόψεων μαζί του υπήρξαν εξαιρετικά γρήσιμες στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Τέλος, θερμά ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Εμμανουήλ Παπαδόπουλο, γιατί μου συμπαραστάθηκε και επιστημονικά και φιλικά σε ο,τιδήποτε χρειάστηκα αυτά τα χρόνια.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Ελένη, και στον αδερφό μου Παναγιώτη, που μου έχουν μάθει να προσπαθώ και να διεκδικώ όλα όσα θέλω στη ζωή μου, αλλά κυρίως που είναι δίπλα μου σε κάθε επιλογή μου.

Συντομογραφίες

ADRA2A:	alpha-2A-adrenergic receptor, αδρενεργικός υποδοχέας άλφα-2Α
AJCC:	American Joint Committee on Cancer, Αμερικανική Επιτροπή κατά του
	Καρκίνου
AK1:	adenylate kinase 1, αδενυλική κινάση 1
ALP:	alkaline phosphatase, αλκαλική φωσφατάση
AMV:	Avian Myeloblastosis Virus, ιός μυελοβλάστωσης των πτηνών
APAF1:	apoptotic peptidase activating factor 1
APC:	adenomatous polyposis coli
APS:	ammonium persulfate, υπερθειικό αμμώνιο
AR:	androgen receptor, ανδρογονικός υποδοχέας
ASCO:	American Society of Clinical Oncology, Αμερικανική Εταιρία Κλινικής
	Ογκολογίας
ATCC:	American Type Culture Collection
B2M:	beta-2-microglobulin, β2-μικροσφαιρίνη
BAD:	BCL2-associated agonist of cell death
BAK1:	BCL2-antagonist/killer 1
BAX:	BCL2-associated X protein
BBC3:	BCL2 binding component 3
BCIP:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BCL2, BCL2:	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2A1:	BCL2-related protein A1
BCL2L1:	BCL2-like 1
BCL2L10:	BCL2-like 10
BCL2L11:	BCL2-like 11
BCL2L12:	BCL2-like 12
BCL2L13:	BCL2-like 13
BCL2L14:	BCL2-like 14
BCL2L15:	BCL2-like 15
BCL2L2:	BCL2-like 2
BCL2L3:	BCL2-like 3
BCL2L4:	BCL2-like 4

BCL2L5:	BCL2-like 5
BCL2L7:	BCL2-like 7
BCL2L8:	BCL2-like 8
BCL2L9:	BCL2-like 9
BECN1:	beclin 1, μπεκλίνη 1
BH:	BCL2 homology domain, δομική περιοχή ομολογίας με την πρωτεΐνη BCL2
BH1:	BCL2-homology region 1
BH2:	BCL2-homology region 2
BH3:	BCL2-homology region 3
BH4:	BCL2-homology region 4
BID:	BH3 interacting domain death agonist
BIK:	BCL2-interacting killer
BIRC5:	baculoviral IAP repeat containing 5
BMF:	Bcl2 modifying factor
BNIP1:	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
BNIP2:	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
BNIP3:	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BOD:	BCL2-related ovarian death gene
BOK:	BCL2-related ovarian killer
BSA:	bovine serum albumin, αλβουμίνη βόειου ορού
CA 125:	cancer antigen 125, καρκινικό αντιγόνο 125
CA 19-9:	carbohydrate antigen 19-9, υδατανθρακικό αντιγόνο 19-9
CA 50:	cancer antigen 50, καρκινικό αντιγόνο 50
CA 72-4:	cancer antigen 72-4, καρκινικό αντιγόνο 72-4
cAMP:	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate, 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CARD:	caspase recruitment domain, δομική περιοχή στράτευσης κασπασών
CASP3:	caspase 3, κασπάση 3
CASP5:	caspase 5, κασπάση 5
CASP8:	caspase 8, κασπάση 8
CCT5:	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)
CDK2:	cyclin-dependent kinase 2, κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 2
CDK4:	cyclin-dependent kinase 4, κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 4
CDKN1A:	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, οι εξαρτώμενοι από κυκλίνες αναστολείς
	κινασών 1Α

CDKs:	cyclin-dependent kinases, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες
CEA:	carcinoembryonic antigen, καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο
CIN:	chromosomal instability, χρωμοσωμική αστάθεια
C _T :	threshold cycle, οριακός κύκλος
CTL:	cytotoxic T cells, κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
DCC:	deleted in colorectal carcinoma
DEPC:	diethylpyrocarbonate, διαιθυλοπυροκαρβονικό
DFS:	disease-free survival, ελεύθερη νόσου επιβίωση
DISC:	death-inducing signalling complex, σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	dimethyl sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξείδιο
DNA:	deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs:	deoxyribonucleotides 5'-triphosphate, 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
DPC4:	deleted in pancreatic carcinoma locus 4
dsDNA:	double-stranded DNA, δίκλωνο DNA
EBV:	Epstein-Barr Virus, ιός Epstein-Barr
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό
EGF:	epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR:	epidermal growth factor receptor, υποδοχέας του EGFR
ES-D:	erythrocytic esterase D, ερυθροκυτταρική εστεράση D
FAC:	5-Fluorouracil, Adriamycin, Cyclophosphamide
FADD:	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAP:	familial adenomatous polyposis, οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση
FBS:	fetal bovine serum, βόειος εμβρυϊκός ορός
FOLFIRI:	folinic acid, fluorouracil, irinotecan
FOLFOX:	folinic acid, fluorouracil, oxaliplatin
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer, μεταφορά ενέργειας συντονισμού με
	φθορισμό
G6PD:	glucose-6-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής
	γλυκόζης
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής
	γλυκεραλδεΰδης
GLO1:	glyoxalase 1, γλυοξαλάση 1
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HNPCC:	hereditary non-polyposis colorectal cancer, κληρονομικό ορθοκολικό
	καρκίνωμα χωρίς πολυποδίαση
HRK:	harakiri
HUWE:	HECT, UBA and WWE domain containing 1
IAP:	inhibitor of apoptosis proteins
IgA:	immunoglobulin A, ανοσοσφαιρίνη A
IgG:	immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη G
KLK1:	kallikrein-related peptidase 1, καλλικρεΐνη 1
KLK2:	kallikrein-related peptidase 2, καλλικρεΐνη 2
KLK3:	kallikrein-related peptidase 3, καλλικρεΐνη 3
KLK4:	kallikrein-related peptidase 4, καλλικρεΐνη 4
KLK5:	kallikrein-related peptidase 5, καλλικρεΐνη 5
KLK6:	kallikrein-related peptidase 6, καλλικρεΐνη 6
KLK7:	kallikrein-related peptidase 7, καλλικρεΐνη 7
KLK8:	kallikrein-related peptidase 8, καλλικρεΐνη 8
KLK9:	kallikrein-related peptidase 9, καλλικρεΐνη 9
KLK10:	kallikrein-related peptidase 10, καλλικρεΐνη 10
KLK11:	kallikrein-related peptidase 11, καλλικρεΐνη 11
KLK12:	kallikrein-related peptidase 12, καλλικρεΐνη 12
KLK13:	kallikrein-related peptidase 13, καλλικρεΐνη 13
KLK14:	kallikrein-related peptidase 14, καλλικρεΐνη 14
KLK15:	kallikrein-related peptidase 15, καλλικρεΐνη 15
KLKs:	kallikrein-related peptidases, καλλικρεΐνες
KSHV:	Kaposi Sarcoma Herpesvirus, ερπητοϊός σαρκώματος Kaposi
LTBP1:	latent transforming growth factor beta binding protein 1
MCL1:	myeloid cell leukemia sequence 1
ME2:	malate enzyme 2, μηλικό ένζυμο 2
MOAP1:	modulator of apoptosis 1
MSI:	microsatellite instability, μικροδορυφορική αστάθεια
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MULE:	MCL1 ubiquitin ligase E3
NBT:	nitro blue tetrazolium chloride
NCI:	National Cancer Institute, Εθνικό Ίδρυμα Καρκίνου
NK:	natural killer cells, φυσικά φονικά κύτταρα

open reading frame, ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
overall survival, ολική επιβίωση
poly(ADP-ριβόζη)-πολυμεράση
phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
platelet-derived growth factor beta polypeptide, β -πολυπεπτίδιο του
προερχόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα
peptidase D, πεπτιδάση D
positron emission tomography, τομογραφίας εκπομπής ποσιτρονίων
phosphogluconate dehydrogenase, αφυδρογονάση του φωσφογλυκονικού
phosphoglucomutase 1, φωσφογλυκομουτάση 1
phosphoglucomutase 3, φωσφογλυκομουτάση 3
protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A
tissue plasminogen activator, ενεργοποιητής του πλασμινογόνου των ιστών
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
prostate-specific antigen, ειδικό προστατικό αντιγόνο
Roswell Park Memorial Institute - 1640
reverse transcription, αντίστροφη μεταγραφή
reverse transcriptase, αντίστροφη μεταγραφάση
reverse transcription – polymerase chain reaction, antistrogh $\mu\epsilon\tau\alpha\gamma\rho\alpha\phi\eta$ –
αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
small cell lung cancer, μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
serologically defined colon cancer antigen 3
sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα
πολυακρυλαμιδίου
SMAD family member 4
serine/threonine kinase 11, κινάση 11 σερίνης/θρεονίνης
Tris-HCl, Borate, EDTA
truncated BID
TATA box binding protein
tetramethylethylenediamine
melting temperature, θερμοκρασία τήξης

tumour necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
tumour necrosis factor receptor, υποδοχέας μελών της οικογένειας TNF
tumour necrosis factor receptor superfamily, υπεροικογένεια των υποδοχέων
των ΤΝΓ
tumours, nodes, metastases
tumour protein p53, ογκοπρωτεΐνη p53
tetratricopeptide repeat
tris(hydroxymethyl)aminomethane
thymidylate synthase, συνθάση του θυμιδυλικού
Tegafur-uracil
International Union Against Cancer, Διεθνής Ένωση Κατά του Καρκίνου
Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Πίνακας Περιεχομένων

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.	Ανατομία και φυσιολογία του παχέος εντέρου	1
1.2.	Καρκίνος του παχέος εντέρου: αίτια και επιδημιολογία	2
1.3.	Ορθοκολικός καρκίνος	3
1.3.1.	Αλληλουχία αδενώματος - καρκινώματος	4
1.3.2.	Ορθοκολικός καρκίνος και κληρονομικότητα	6
1.3.2.1.	Κληρονομούμενος μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer- HNPCC)/Σύνδρομο Lynch)	6
1.3.2.2.	Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis- FAP)	7
1.3.2.3.	Πολυποδίαση σχετιζόμενη με το MUTYH (MUTYH-Associated Polyposis- MAP)	10
1.3.2.4.	Σύνδρομο Peutz-Jeghers	11
1.3.2.5.	Νεανικοί πολύποδες και οικογενής νεανική πολυποδίαση (Juvenile Polyposis)	13
1.4.	Παθολογοανατομική εικόνα	14
1.5.	Γενετικά μονοπάτια καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και το ορθό	17
1.5.1.	Χρωμοσωμική αστάθεια	18
1.5.2.	Αστάθεια μικροδορυφορικών αλληλουχιών	19
1.6.	Σταδιοποίηση των ορθοκολικών όγκων	20
1.7.	Πρόγνωση των ορθοκολικών όγκων	23
1.8.	Καρκινικοί δείκτες	24
1.8.1.	Καρκινικοί δείκτες στην κλινική πράξη	25
1.8.2.	Καρκινικοί δείκτες και καρκίνος του παχέος εντέρου	26
1.8.2.1.	Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)	26
1.8.2.2.	Το υδατανθρακικό αντιγόνο 19-9 (CA 19-9)	27
1.8.2.3.	Το καρκινικό αντιγόνο 72-4 (CA 72-4)	28
1.9.	Θεραπευτική αγωγή του καρκίνου του παχέος εντέρου	29
1.9.1.	Χειρουργική επέμβαση	29
1.9.1.1.	Ακτινοβολία	30
1.9.1.2.	Χημειοθεραπεία	31
1.10.	Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες	34

1.10.1.	Φυσιολογικές λειτουργίες των καλλικρεϊνών	35
1.10.2.	Πρωτεϊνική δομή των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών	36
1.10.3.	Ενζυμική ρύθμιση της δράσης των καλλικρεϊνών	37
1.10.4.	Εξειδίκευση υποστρώματος των καλλικρεϊνών	38
1.10.5.	Συμμετοχή των καλλικρεϊνών σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες	39
1.10.6.	Η γονιδιακή οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών	39
1.10.6.1.	Το γονίδιο <i>KLK1</i>	40
1.10.6.2.	Το γονίδιο <i>KLK2</i>	41
1.10.6.3.	Το γονίδιο <i>KLK3</i>	42
1.10.6.4.	Το γονίδιο <i>KLK4</i>	43
1.10.6.5.	Το γονίδιο <i>KLK5</i>	44
1.10.6.6.	Το γονίδιο <i>KLK6</i>	45
1.10.6.7.	Το γονίδιο <i>KLK7</i>	46
1.10.6.8.	Το γονίδιο <i>KLK</i> 8	47
1.10.6.9.	Το γονίδιο <i>KLK</i> 9	48
1.10.6.10.	Το γονίδιο <i>KLK10</i>	48
1.10.6.11.	Το γονίδιο <i>KLK11</i>	49
1.10.6.12.	Το γονίδιο <i>KLK12</i>	50
1.10.6.13.	Το γονίδιο <i>KLK13</i>	50
1.10.6.14.	Το γονίδιο <i>KLK14</i>	51
1.10.6.15.	Το γονίδιο <i>KLK15</i>	52
1.10.7.	Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των ανθρώπινων καλλικρεϊνών	52
1.10.7.1.	Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων KLK2 και KLK3	53
1.10.7.2.	Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου <i>KLK10</i>	54
1.10.8.	Φυλογενετική και εξέλιξη της οικογένειας των καλλικρεϊνικών γονιδίων	56
1.10.9.	Συσχέτιση των καλλικρεϊνών με ανθρώπινες ασθένειες	57
1.10.9.1.	Συσχέτιση των καλλικρεϊνών με τον καρκίνο	57
1.10.9.2.	Παθοβιολογία των καλλικρεϊνών σε άλλες περιπτώσεις	59
1.10.10.	Θεραπευτικές εφαρμογές των ανθρώπινων καλλικρεϊνών	59
1.11.	Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Απόπτωση)	60
1.11.1.	Ρόλος των κασπασών στην απόπτωση	62
1.11.2.	Μονοπάτια ενεργοποίησης κασπασών	64
1.11.3.	Οικογένεια BCL2	65

ΣΚΟΠΟΣ	Σ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	71
1.11.6.	Σχέση μεταξύ της οικογένειας BCL2 και του καρκίνου	68
1.11.5.	Ρόλος των μελών της οικογένειας BCL2 στην απόπτωση	67
1.11.4.	Ταξινόμηση των μελών της οικογένειας BCL2	66

2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
2.1.	Βιολογικό υλικό	73
2.2.	Κυτταροκαλλιέργειες	73
2.2.1.	Καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου	74
2.2.1.1.	Ιδιότητες της καρκινικής κυτταρικής σειράς DLD-1	74
2.2.1.2.	Ιδιότητες της καρκινικής κυτταρικής σειράς ΗΤ-29	75
2.2.2.	Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργειών	76
2.2.3.	Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών	77
2.2.4.	Συλλογή καρκινικών κυττάρων για ομογενοποίηση	77
2.2.5.	Διατήρηση προσκολλώμενων καρκινικών κυττάρων σε υγρό άζωτο	78
2.2.6.	Δ ιερεύνηση της ικανότητας ανά π τυξης και της βιωσιμότητας των κυττάρων	79
2.3.	Ομογενοποίηση και απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές και ιστούς παχέος εντέρου	81
2.3.1.	Ομογενοποίηση ιστολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου	81
2.3.2.	Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές και ομογενοποιημένους ιστούς παχέος εντέρου	81
2.3.3.	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA	82
2.3.4.	Έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	83
2.4.	Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (reverse transcription, RT)	83
2.4.1.	Αρχή της μεθόδου	83
2.4.2.	Συνθήκες αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA από απομονωμένο ολικό RNA	84
2.5.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)	85
2.5.1.	Αρχή της μεθόδου	85
2.5.2.	Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)	86
2.5.3.	Σχεδιασμός εκκινητών συμβατικής PCR	86

2.5.4.	Συνθήκες συμβατικής PCR	87
2.5.4.1.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου GAPDH, σε ιστούς παχέος εντέρου και κύτταρα DLD-1	87
2.5.4.2.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου <i>B2M</i> , σε ιστούς παχέος εντέρου και κύτταρα DLD-1	88
2.5.4.3.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των μεταγράφων του γονιδίου <i>KLK10</i> , σε ιστούς παχέος εντέρου και κύτταρα DLD-1	89
2.5.4.4.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των μεταγράφων BCLX _L και BCLX _S του γονιδίου BCLX, σε κύτταρα HT-29	91
2.5.4.5.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA δύο εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου MCL1, σε κύτταρα HT-29	92
2.5.4.6.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου <i>BAX</i> , σε κύτταρα HT-29	93
2.5.4.7.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου <i>BAK1</i> , σε κύτταρα HT-29	94
2.5.4.8.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου του γονιδίου BID, σε κύτταρα HT-29	95
2.5.4.9.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA δύο εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου <i>PUMA</i> (<i>BBC3</i>), σε κύτταρα HT-29	96
2.5.4.10.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA τριών εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου <i>BIRC5</i> (Survivin), σε κύτταρα HT-29	97
2.5.4.11.	Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου P21 (CDKN1A), σε κύτταρα HT-29	98
2.5.5.	Ανίχνευση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	98
2.6.	Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR)10	00
2.6.1.	Αρχή της μεθόδου10	00
2.6.2.	Σύστημα ανίχνευσης με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green10	01
2.6.3.	AmpliTaq Gold [®] DNA polymerase, LD10	02
2.6.4.	Σχεδιασμός εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο10	03
2.6.4.1.	Εκκινητές real-time PCR για τον ποσοτική μελέτη έκφρασης της B2M10	03
2.6.4.2.	Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη συνολικής έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου <i>KLK10</i> , σε ιστούς παχέος εντέρου	03
2.6.4.3.	Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη έκφρασης του μετάγραφου BCL2-alpha του γονιδίου BCL2, σε κύτταρα HT-29	04
2.6.4.4.	Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη συνολικής έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου BAX, σε κύτταρα HT-2910	04

2.6.4.5.	Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη έκφρασης του γονιδίου BIM, σε κύτταρα HT-29105
2.6.4.6.	Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη έκφρασης του γονιδίου NOXA (PMAIP1), σε κύτταρα HT-29106
2.6.5.	Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR106
2.6.5.1.	Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA των γονιδίων B2M και KLK10, σε ιστούς παχέος εντέρου
2.6.5.2.	Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA των γονιδίων BCL2, BAX, BIM και NOXA, σε κύτταρα HT29
2.6.6.	Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της real-time PCR 108
2.6.6.1.	Ανίχνευση και ανάλυση των προϊόντων της real-time PCR
2.6.6.2.	Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της real-time PCR110
2.6.6.3.	Σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων <i>KLK10</i> , BCL2, BAX, BIM και NOXA ως προς την έκφραση του γονιδίου B2M, με τη μέθοδο σύγκρισης των C _T (2 ^{-ΔΔC} _T)110
2.7.	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων112
2.8.	Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)113
2.8.1.	Αρχή της μεθόδου113
2.8.2.	Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία τύπου σάντουιτς (Sandwich ELISA)
2.8.3.	Προετοιμασία κυτταρολυμάτων από ιστούς115
2.8.4.	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford116
2.8.5.	Συνθήκες ELISA τύπου σάντουιτς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της KLK10 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιστών παχέος εντέρου
2.9.	Απομόνωση πρωτεϊνών, στύπωση Western και ανοσοεντοπισμός της poly(ADP-ριβόζη)-πολυμεράσης (PARP)117
2.9.1.	Απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών από την καρκινική κυτταρική σειρά ΗΤ-29
2.9.2.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες118
2.9.3.	Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης119
2.9.4.	Ανοσοεντοπισμός της poly(ADP-ριβόζη)-πολυμεράσης (PARP) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης120
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 121
3.1.	Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και ομογενοποιημένους ιστούς παχέος εντέρου121

ПАРАР	ΤΗΜΑ : ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ
ВІВЛІС	ΣΓΡΑΦΙΑ
ABSTR	ACT
ΠΕΡΙΛ	НΨН 175
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ
3.5.3.	Μελέτη της έκφρασης mRNA αποπτωτικών γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα HT-29142
3.5.2.	Διερεύνηση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων ΗΤ-29 παρουσία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων138
3.5.1.	Διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς ΗΤ-29137
3.5.	Μελέτη της επίδρασης αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου137
3.4.	Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης KLK10 στον καρκίνο του παχέος εντέρου
3.3.4.	Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK10</i> και της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου
3.3.3.	Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA της <i>KLK10</i> και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου
3.3.2.	Διαγνωστική αξία της έκφρασης mRNA της <i>KLK10</i> για τον καρκίνο του παχέος εντέρου
3.3.1.	Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK10</i> σε ιστούς παχέος εντέρου
3.3.	Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK10</i> στον καρκίνο του παχέος εντέρου
3.2.4.	Έλεγχος εγκυρότητας της μεθόδου σύγκρισης των C _T (2 ^{-ΔΔC} T) για το σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων mRNA του γονιδίου <i>KLK10</i> ως προς τα επίπεδα mRNA του γονιδίου <i>B2M</i>
3.2.3.	Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη έκφρασης mRNA του γονιδίου KLK10 σε καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου με ποσοτική real-time PCR
3.2.2.	Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου <i>KLK10</i> σε καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου με συμβατική PCR
3.2.1.	Μελέτη της συνολικής έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK10</i> σε καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου με συμβατική PCR
3.2.	Ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου <i>KLK10</i> σε ιστούς παχέος εντέρου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ανατομία και φυσιολογία του παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο αποτελεί τη συνέχεια του λεπτού εντέρου, αρχίζοντας από την ειλεοτυφλική βαλβίδα του Bauhini και καταλήγοντας στον πρωκτικό δακτύλιο. Η ειλεοκολική βαλβίδα είναι μια εγκάρσια σχισμή, που έχει δύο χείλη, το πάνω και το κάτω, τα οποία απολήγουν σε δύο χαλινούς. Είναι έτσι κατασκευασμένη που επιτρέπει το πέρασμα του περιεχομένου του λεπτού εντέρου μόνο από αυτό στο τυφλό, ενώ απαγορεύει το αντίθετο. Το τυφλό έντερο είναι η πρώτη από τις μοίρες του παγέος εντέρου και βρίσκεται στο δεξιό λαγόνιο βόθρο. Προς τα πάνω συνδέεται με το ανιόν κόλο, αφού ενωθεί με το λεπτό έντερο με την ειλεοκολική βαλβίδα. Στο κάτω μέρος του βρίσκεται η σκωληκοειδής απόφυση. Στο παχύ έντερο υπάγονται το κόλον, το ορθό και ο πρωκτικός δακτύλιος. Το κόλον είναι η δεύτερη μοίρα του παχέος εντέρου και χωρίζεται σε τέσσερις μικρότερες μοίρες: το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατιόν και το σιγμοειδές κόλον. Το ανιόν κόλον αποτελεί τη συνέχεια του τυφλού, αρχίζοντας δε από τον δεξιό λαγόνιο βόθρο προχωρεί προς τα πάνω και κάτω από το ήπαρ, κάνοντας μία γωνία, τη δεξιά κολική καμπή, μεταπίπτει στο εγκάρσιο κόλο. Το εγκάρσιο κόλον αρχίζει από τη δεξιά κολική καμπή, σαν συνέγεια του ανιόντος, φθάνει έως το κάτω άκρο του σπληνός και σε μια απότομη και οξεία καμπή, την αριστερή κολική καμπή, μεταπίπτει στο κατιόν κόλο. Το κατιόν κόλον αρχίζει από την αριστερή κολική καμπή, φέρεται προς τα κάτω κατά μήκος του οπίσθιου κοιλιακού τοιχώματος, φθάνει στο πάνω στόμιο της ελάσσονος πυέλου και μεταπίπτει στο σιγμοειδές. Το σιγμοειδές κόλον αρχίζει από την είσοδο της ελάσσονος πυέλου, σαν συνέχεια του κατιόντος και αφού κάνει δύο καμπές μέσα στην πύελο, στο ύψος του τρίτου ιερού σπονδύλου μεταπίπτει στο απευθυσμένο, ή ορθό. Το απευθυσμένο, ή ορθό έντερο είναι το τρίτο και τελευταίο τμήμα του παχέος εντέρου. Το ορθό και ο πρωκτικός δακτύλιος σχηματίζουν το λειτουργικό σύστημα ολοκλήρωσης του εντερικού σωλήνα. Αποτελείται από το σηραγγώδες σώμα του ορθού (corpus cavernosum recti), τον έσω σφιγκτήρα μυ του δακτυλίου που αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες, τον έξω σφιγκτήρα που αποτελείται από σκελετικές μυϊκές ίνες και το ευαίσθητο και διατάσιμο δέρμα του πρωκτικού δακτυλίου [1]. Σημειώνεται, πως περίπου το 60% όλων των καρκινωμάτων ανευρίσκονται στο ορθό και το 20-25% στο σιγμοειδές κόλον. Με άλλα λόγια, πάνω από το 80% όλων των ορθοκολικών καρκινωμάτων εντοπίζονται στο «ορθοσιγμοειδές» [2].

Το κόλον είναι όργανο προετοιμασίας και αποβολής συστατικών της τροφής που δεν έχουν απορροφηθεί. Εκτελεί λειτουργίες απορρόφησης και έκκρισης. Η κινητικότητα του παχέος εντέρου ρυθμίζεται με την αλληλεπίδραση χολινεργικών, αδρενεργικών, πεπτιδεργικών νευρώνων και γαστρεντερικών ορμονών. Επιπρόσθετα, το κόλον και το ορθό, περιλαμβάνοντας λεμφικό ιστό σχετιζόμενο με το βλεννογόνο, είναι ανοσολογικά όργανα, τα οποία έρχονται σε επαφή με αντιγόνα του αυλού (βακτηρίδια, ιοί και συστατικά των τροφών) και συμμετέχουν στη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης του οργανισμού [3].

1.2. Καρκίνος του παχέος εντέρου: αίτια και επιδημιολογία

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μία συχνή κακοήθης πάθηση, η πιο συχνή ανάμεσα στους τύπους καρκίνου του πεπτικού συστήματος σε ΗΠΑ και Ευρώπη. Σύμφωνα με στοιγεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), τα οποία βασίζονται σε μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες, η νόσος είναι πιο συχνή σε αναπτυγμένα κράτη (Βόρεια Αμερική, Δυτική Ευρώπη, Αυστραλία) και λιγότερο συχνή στα υπό ανάπτυξη (Αφρική, Ασία, Νότιος Αμερική). Το 2000, ο καρκίνος του παχέος εντέρου ήταν ο τρίτος συχνότερα αναφερόμενος καρκίνος, με 945.000 νέα περιστατικά διεθνώς, αποτελώντας τη συνηθέστερη μορφή καρκίνου στις ανεπτυγμένες χώρες. Παγκοσμίως, ο καρκίνος του παγέος εντέρου αποτελεί το 9,4% όλων των περιστατικών καρκίνου στους άνδρες και το 10,1% στις γυναίκες, ενώ υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο 394.000 άνθρωποι πεθαίνουν παγκοσμίως από καρκίνο του παγέος εντέρου [4]. Ενδεικτικά, αναφέρεται, ότι στις ΗΠΑ, με στοιχεία του 2013, η νόσος ευθύνεται για το 8,7% όλων των θανάτων που οφείλονται σε καρκίνο [5]. Στην Ευρώπη, ο ορθοκολικός καρκίνος είναι η δεύτερη πιο συνηθισμένη νεοπλασία (μετά τον καρκίνο του μαστού) στις γυναίκες και η τρίτη πιο συνηθισμένη νεοπλασία στους άνδρες, μετά τους καρκίνους του προστάτη και του πνεύμονα, και επίσης η δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου των δύο φύλων, καθώς ευθύνεται για το 12% όλων των θανάτων που αποδίδονται στον καρκίνο [6]. Στη χώρα μας, ο καρκίνος του παχέος εντέρου καταλαμβάνει την τέταρτη θέση των αιτιών θανάτου από νεοπλάσματα [7].

Οι κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι οι εξής: διατροφικοί παράγοντες, προδιαθεσικές-προκαρκινικές παθήσεις, κληρονομικότητα, επάγγελμα, φύλο, ιατρογενείς παράγοντες και νεοπλασματικά νοσήματα. Όταν η διατροφή αναφέρεται ως αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του παχέος εντέρου, εννοείται τόσο η συμπερίληψη της προσλαμβανόμενης τροφής, όσο και η δράση στο έντερο αναερόβιων μικροβίων, κυρίως βακτηριοειδών και κλωστηριδίων. Τα μικρόβια αυτά, με τη βοήθεια ένζυμων τα οποία παράγουν, μεταβολίζουν τα χολικά οξέα, τη χοληστερίνη, τα λίπη και τα

λευκώματα σε διάφορες καρκινογόνες ουσίες, οι οποίες και ενοχοποιούνται στην παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επιπλέον, υπάρχει συσχέτιση του επαγγέλματος με την παρουσία καρκίνου του παχέος εντέρου. Για παράδειγμα, υποστηρίζεται ότι άτομα που εργάζονται σε εργοστάσια παραγωγής συνθετικών ινών ή αγροτικών προϊόντων ή έχουν υποστεί παρατεταμένη έκθεση σε αμίαντο, παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα καρκίνου του παχέος εντέρου. Όσον αφορά το φύλο, αυξημένη συχνότητα καρκίνου του αριστερού κόλου, φαίνεται να παρατηρείται σε άτεκνες ή παχύσαρκες γυναίκες. Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που ζουν σε χώρες με αυξημένη συχνότητα παχέος εντέρου εμφανίζουν ελαφρά μεγαλύτερη συχνότητα καρκίνου του δεξιού κόλου από τους άνδρες της ίδιας ηλικίας, ενώ μετά την ηλικία των 55 ετών η διαφορά αυτή κλείνει προς την πλευρά των ανδρών. Η συμπερίληψη των ιατρογενών παραγόντων στην λίστα των πιθανών αιτιών υποστηρίζεται κυρίως από πειραματικά δεδομένα. Ενδεικτικά, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου παγέος εντέρου αυξάνεται μετά από χολοκυστεκτομή, ενώ είναι επίσης γνωστό ότι η ουρηθροσιγμοειδοστομία είναι δυνατό να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου στο σημείο της αναστόμωσης. Τέλος, η συσχέτιση της ύπαρξης καρκίνου του παχέος εντέρου με νεοπλασματικά νοσήματα, εστιάζεται ιδιαίτερα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, του ενδομήτριου ή των ωοθηκών, καθώς αυτοί παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου [8].

1.3. Ορθοκολικός καρκίνος

Καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε τμήμα του εντέρου. Οι καλοήθεις και οι κακοήθεις όγκοι είναι συχνοί στο κόλον και το ορθό. Είναι, μάλιστα, κατά πολύ συχνότεροι απ' ότι στο μεγαλύτερου μήκους λεπτό έντερο. Η πλειοψηφία των καρκίνων στο παχύ έντερο προκύπτουν από μη κακοήθεις όγκους στο εντερικό επιθήλιο, γνωστούς ως αδενώματα, που στα πρώιμα στάδια θυμίζουν πολύποδα (υπερπλασία κυττάρων). Περισσότερο από το 95% των ορθοκολικών καρκίνων είναι αδενοκαρκινώματα, δηλαδή κακοήθεις όγκοι επιθηλιακής φύσης [9]. Αυτοί οι πολύποδες, αν εντοπιστούν σε πρώιμο στάδιο μπορούν εύκολα να αφαιρεθούν. Ωστόσο, όπως και τα περισσότερα πρώιμου σταδίου αδενώματα, εμφανίζονται χωρίς συμπτώματα και μπορεί να μην ανιχνευτούν για πολύ καιρό. Αυτοί οι σχηματισμοί είναι συνήθως καλοήθεις, όμως ορισμένοι μπορούν να εξελιχθούν σε κακοήθεις όγκους.

Όταν υποψιαζόμαστε καρκίνο παχέος εντέρου, πρέπει να γίνει ακτινολογικός έλεγχος ή/και κολονοσκόπηση για να επιβεβαιωθεί και να εντοπισθεί η θέση του όγκου. Ο ακτινολογικός έλεγχος (βαριούχος υποκλυσμός) είναι μια σειρά ακτινογραφιών της κοιλιάς

του ασθενούς, μετά την πλήρωση του παχέος εντέρου, με ένα λευκό υγρό που περιέχει βάριο. Το βάριο σκιαγραφεί την εσωτερική επιφάνεια του εντέρου στις ακτινογραφίες. Ο καρκίνος παρουσιάζεται σαν έλλειμμα σκιαγράφησης στον αυλό του παχέος εντέρου. Η κολονοσκόπηση είναι μία διαδικασία κατά την οποία ο γιατρός εισάγει ένα εύκαμπτο κολονοσκόπιο (σωλήνα) μέσω του πρωκτού στο παχύ έντερο και ελέγχει μέσω μιας κάμερας το εσωτερικό του παχέος εντέρου. Η κολονοσκόπηση είναι η πιο ακριβής μέθοδος, ιδιαιτέρως στη διάγνωση μικρών πολυπόδων. Εάν ανακαλυφθούν πολύποδες, τότε συνήθως αφαιρούνται διαμέσου του κολονοσκοπίου και στέλνονται για ιστολογική εξέταση. Εάν στη διάρκεια της κολονοσκόπησης ανακαλυφθεί καρκινικός όγκος, στέλνονται δείγματα του ιστού για ιστολογική εξέταση προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση [8].

Στα αρχικά του στάδια, ο ορθοκολικός καρκίνος δεν προκαλεί συμπτώματα. Με την πάροδο του χρόνου προκαλούνται ήπιοι πόνοι στη κοιλιά, τυμπανισμός του στομάχου, αιμορραγίες, έμετος και αλλαγή στις εντερικές συνήθειες. Αυτά τα συμπτώματα αγνοούνται πολλές φορές από τον ασθενή και τον ιατρό. Στα προχωρημένα του στάδια προκαλείται αδυναμία και καταβολή, σιδηροπενική αναιμία, απώλεια βάρους μέχρι και επίσχεση αερίων και κοπράνων λόγω απόφραξης του εντέρου (ειλεός). Επίσης, συχνά παρατηρείται καρκινική διήθηση της χολής με αποτέλεσμα αιματουρία (αίμα στα ούρα) και/ή πνευματουρία (αέρα στα ούρα), ή διήθηση του κόλπου, η οποία συνοδεύεται από κολπικά εκκρίματα, τοπικά. Τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με το που εντοπίζεται ο καρκίνος όσο κοντύτερα στον πρωκτό αναπτύσσεται ο όγκος, τόσο πιο έντονα είναι [10].

1.3.1. Αλληλουχία αδενώματος - καρκινώματος

Ο σποραδικός ορθοκολικός καρκίνος εκδηλώνεται σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό ή με ασήμαντη εκδήλωση στην οικογένεια. Το 70%-75% περίπου του ορθοκολικού καρκίνου είναι αποτέλεσμα σποραδικά εμφανιζόμενων αδενωμάτων. Ένα αδένωμα είναι ένας καλοήθης όγκος των αδένων προέλευσης. Αδενώματα μπορούν να αναπτυχθούν από πολλά όργανα.Το αδένωμα φαίνεται να προκύπτει από ένα κύτταρο του εντέρου, που εντοπίζεται σε κάποια κρύπτη του εντερικού βλεννογόνου, και το οποίο επιλέγεται με κλωνική επικράτηση μετά από τη συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων. Αν και αυτές οι αυξήσεις είναι καλοήθεις, με την πάροδο του χρόνου μπορεί να εξελιχθούν σε κακοήθεις (αδενοκαρκινώματα). Οι καλοήθεις επιθηλιακοί όγκοι (αδενώματα) είναι πολύ διαδεδομένοι στην ορθοκολική περιοχή. Εντούτοις, πάνω από το 70% του συνόλου των ορθοκολικών καρκίνων αναπτύσοονται από σποραδικά εμφανιζόμενα αδενώματα, ενώ η μέγιστη συχνότητα των εμφανιζόμενων αδενωμάτων παρατηρείται κατά την έκτη και την έβδομη δεκαετία της ζωής [2].

Η καρκινογένεση του παγέος εντέρου είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία. Η αλληλουχία των επαγόμενων αλλαγών του εντερικού επιθηλίου φαίνεται να σχετίζεται με μια σειρά γενετικών αλλαγών, οι οποίες περιλαμβάνουν πολλαπλά ειδικά γεγονότα που οδηγούν στην απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την εξελικτική μεταβίβαση από την εμφάνιση αδενώματος (πολύποδα) στην ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος. Άθροιση και άλλων μεταλλάξεων, συνοδευόμενη πολλές φορές από την επίδραση της χρωμοσωμικής και μικροδορυφορικής αστάθειας, οδηγεί τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου [11]. Η διαδικασία της εναλλαγής αυτής περιγράφεται ως αλληλουχία αδενώματος - καρκινώματος. Υπό το πρίσμα αυής της διαδικασίας, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα ορθοκολικά αδενώματα αποτελούν προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις του βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Ο σποραδικός ορθοκολικός καρκίνος είναι μια νόσος της προχωρημένης ηλικίας.

Ιστολογικά, διακρίνονται τέσσερις τύποι αδενωμάτων, σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ.: τα σωληνώδη, τα λαχνωτά, τα σωληνολαχνωτά και τα αδενώματα με οδοντωτή ψευδοθηλώδη επιφάνεια. Αυτά που απαντώνται συχνότερα, με συχνότητα 60-65%, είναι τα σωληνώδη αδενώματα, η μεγαλύτερη τάση για κακοήθη εξαλλαγή παρουσιάζεται στα λαχνωτά αδενώματα, ενώ στο 20-25% των περιπτώσεων παρατηρούνται πολλαπλά αδενώματα.

Όπως είναι λογικό, αυτό στο οποίο δίνεται μεγαλύτερη σημασία, όσον αφορά τα αδενώματα, εφόσον η παρουσία τους τείνει να παραμένει ασυμπτωματική ή σχεδόν ασυμπτωματική, είναι το δυναμικό κακοήθους εξαλλαγής τους. Το δυναμικό αυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι σπουδαιότεροι των οποίων φαίνεται να είναι: το μέγεθος του αδενώματος, το μέγεθος της βάσης του αδενώματος, η ιστολογική διαφοροποίηση του αδενώματος, ο βαθμός δυσπλασίας και ο τύπος ανάπτυξης του αδενώματος. Ωστόσο, η κακοήθης εξαλλαγή δεν γίνεται να προβλεφθεί πάντα, πόσο μάλλον να τοποθετηθεί χρονικά ο κίνδυνος εμφάνισής της. Στην περίπτωση διαπίστωσης ύπαρξης πολύποδα, πρέπει να ακολουθεί άμεσα ενδοσκοπική πολυπεκτομή και μελέτη της ιστοπαθολογίας του, προς εκτίμηση της βιολογικής του συμπεριφοράς [10]. Τα άτομα με αυτούς τους πολύποδες μετά την ολική αφαίρεση, τίθενται υπό ενδοσκοπική επαγρύπνηση.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα κλινικά συμπτώματα της ύπαρξης του καρκινώματος εξαρτώνται από την εντόπισή του. Τα ορθοσιγμοειδή καρκινώματα προκαλούν αιμορραγίες στο 75-80% των περιπτώσεων, καρκινώματα του εγγύς παχέος εντέρου συνοδεύονται από μεταβολές των εντερικών συνηθειών, ενώ καρκινώματα στο

δεξιό κόλον έχουν συχνά ως πρώτο σύμπτωμα την αναιμία. Στις βαριές επιπλοκές της νόσου υπάγονται εκτεταμένες αιμορραγίες, συμπτώματα ειλεού και διατρήσεις με κοπρανώδη περιτονίτιδα [8].

Καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι οι οποίοι εκκινούν πρωτοπαθώς από εντόπιους μεσεγχυματικούς ιστούς του εντερικού τοιχώματος, είναι σχετικά σπάνιοι σε σύγκριση με τους επιθηλιακούς όγκους. Συχνότερα συναντούμε λιπωματώδεις και μυογενείς όγκους. Πολλές φορές, δεν είναι δυνατή μια αδιαμφισβήτητη κυτταρογενετική κατάταξη [12].

1.3.2. Ορθοκολικός καρκίνος και κληρονομικότητα

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ότι περίπου το 20% των περιπτώσεων καρκίνου παχέος εντέρου έχει γενετική βάση, δηλαδή προκαλείται από μεταβίβαση μεταλλάξεων που έχουν συμβεί στη γαμετική σειρά. Από αυτά, το 5% ανήκει στα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα, ενώ το υπόλοιπο 15% ανήκει σε οικογενείς περιπτώσεις νόσησης δύο τουλάχιστον ατόμων νεαρής ηλικίας μίας οικογένειας [13].

1.3.2.1. Κληρονομούμενος μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer- HNPCC)/Σύνδρομο Lynch)

Το σύνδρομο του κληρονομούμενου καρκίνου του παχέος εντέρου χωρίς πολυποδίαση, ή αλλιώς σύνδρομο Lynch, αποτελεί τη συχνότερη κληρονομήσιμη μορφή καρκίνου του παχέος εντέρου. Το σύνδρομο αυτό, το οποίο χαρακτηρίσθηκε από τον ογκολόγο Henry Lynch, ευθύνεται για το 5% των περιπτώσεων [14].

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου έχουν περιγραφεί εκτενώς. Το σύνδρομο Lynch κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και προδιαθέτει, πλην του καρκίνου του παχέος εντέρου, για διάφορες άλλες μορφές καρκίνου, όπως του ενδομητρίου, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου, του λεπτού εντέρου και των ωοθηκών. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου στους ασθενείς με το σύνδρομο εντοπίζεται, συνηθέστερα, στο εγγύς κόλον. Στην πλειοψηφία τους οι καρκίνοι αυτοί είναι χαμηλής διαφοροποίησης [15]. Ο κίνδυνος για έναν ασθενή με σύνδρομο του Lynch να νοσήσει από καρκίνο μέχρι το εβδομηκοστό έτος είναι 91% για τους άντρες και 69% για τις γυναίκες, ενώ ο δια βίου κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου στα άτομα με κληρονομικότητα για το σύνδρομο είναι 80% για καρκίνο του παχέος εντέρου, με μέσο όρο εμφάνισης στα 45 έτη [16], σε αντίθεση με τα σποραδικά περιστατικά στα οποία, όπως αναφέρθηκε, η τυπική ηλικία εμφάνισης είναι η έκτη και έβδομη δεκαετία της ζωής. Υπεύθυνες για τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Lynch είναι οι μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (Mismatch Repair Genes: MMR). Συχνότερα, φαίνεται να σχετίζονται τα γονίδια *MLH1* και *MLH2*, στα οποία εντοπίζονται το 50% και 39% των γνωστών μεταλλάξεων, αντίστοιχα [17]. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *MSH6* φέρονται να είναι υπεύθυνες για το 7% των περιπτώσεων και χαρακτηρίζονται από ηπιότερο φαινότυπο [18]. Επιβεβαιωμένη είναι και η συμβολή των μεταλλάξεων του γονιδίου *PMS2*, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό περιπτώσεων, το οποίο ανέρχεται στο 1-2%. Στις περιπτώσεις αυτές η εμφάνιση του καρκίνου γίνεται σε ακόμη νεαρότερη ηλικία, συγκριτικά με άλλα MMR γονίδια. Δύο ακόμη γονίδια, τα *PMS1* και *MSH3*, εμπλέκονται αμφότερα στην παθογένεια του συνδρόμου Lynch, χωρίς όμως η συμβολή τως να έχει ξεκαθαρισθεί απόλυτα [19].

Το σύνδρομο Lynch διακρίνεται σήμερα σε Ι και ΙΙ. Το σύνδρομο Lynch ΙΙ, σε αντίθεση με το πρώτο, χαρακτηρίζεται επιπλέον από πολυάριθμους εξωεντερικούς όγκους στο ενδομήτριο, τον στόμαχο, τα χοληφόρα αγγεία, τις ουροφόρες οδούς, τις ωοθήκες και τους μαστούς. Η διεθνής ομάδα συνεργασίας για το σύνδρομο HNPCC (International Collaborative Group on HNPCC- ICG HNPCC) θέσπισε τα πρώτα διαγνωστικά κριτήρια, τα κριτήρια του Amsterdam Ι, για το σύνδρομο [20]. Θεωρείται ότι ένας αριθμός ασθενών διαφεύγει του ελέγχου, καθώς τα κριτήρια αυτά φαίνεται να είναι υπέρ του δέοντος αυστηρά. Για το λόγο αυτό, η ίδια ομάδα επαναδιατύπωσε τα κριτήρια ως Amsterdam ΙΙ [21]. Το 2004 περιγράφηκαν, εν τέλει, οι ισχύουσες οδηγίες (οδηγίες Bethesda), οι οποίες συμπεριλαμβάνουν και τον έλεγχο αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (MicroSatellite Instability: MSI) στους όγκους των ασθενών [22].

1.3.2.2. Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis-FAP)

Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis- FAP) αποτελεί το πρώτο σύνδρομο του καρκίνου του παχέος εντέρου του οποίου οι οι γενετικές βάσεις διαλευκάνθυκαν. Αυτό συνέβη, κυρίως, λόγω των χαρακτηριστικών φαινοτυπικών εκδηλώσεών του. Η πρώτη αναφορά για το σύνδρομο καταγράφεται το 1847, ενώ ο Busey το 1979 περιέγραψε πρώτος τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου [23]. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός και η κλωνοποίηση του υπέυθυνου γονιδίου το 1991 από δύο ερευνητικές ομάδες, ανεξάρτητα [24, 25]. Το σύνδρομο FAP ευθύνεται για το 1% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου και μεταβιβάζεται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο. Περίπου το 20-30% όλων των περιπτώσεων οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης στο κόλον

αποδίδονται σε de novo μεταλλαγή του γονιδίου της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης.

Σχετικά με τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου FAP, η ανάπτυξη εκατοντάδων έως χιλιάδων αδενωματωδών πολυπόδων στο παχύ έντερο, είναι η πιο ιδιαίτερη φαινοτυπική εκδήλωση. Οι πολύποδες αναπτύσσονται κατά τη δεύτερη και τρίτη δεκαετία της ζωής. Η πιθανότητα εξαλλαγής τους σε καρκίνο, δεδομένου του μεγάλου αριθμού τους, είναι 100%, σε περίπτωση μη χειρουργικής αφαίρεσης. Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου στον πληθυσμό είναι 1:8.000 [26].

Οι πολύποδες των ασθενών με το σύνδρομο FAP είναι αδενωματώδεις, ελαφριάς ή μέτριας δυσπλασίας, και μπορεί να είναι έμμισχοι ή άμισχοι καλύπτοντας τον αυλό του παχέος εντέρου. Η πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζουν εξωεντερικές αλλοιώσεις με πιο συχνή την εμφάνιση πολυπόδων στο δωδεκαδάκτυλο και κυρίως στο φύμα του Vater. Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό εμφανίζει πολυάριθμους μικρούς και άμισχους πολύποδες στο σώμα του στομάχου [27].

Στους ασθενείς με σύνδρομο FAP, οι εξωεντερικές αλλοιώσεις δεν περιορίζονται στην πολυποδίαση, αλλά επεκτείνονται και σε κακοήθεις σχηματισμούς που προσβάλλουν πλειάδα οργάνων. Συχνότερο φαινόμενο είναι η ανάπτυξη δεσμοειδών όγκων στην κοιλιακή χώρα ή και στο κοιλιακό τοίχωμα, συνοδευόμενοι από χαρακτηριστικό κοιλιακό άλγος. Παρόλο που, στην πλειοψηφία τους, οι όγκοι αυτοί είναι καλοήθεις, ινώδους σύστασης, αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου των ασθενών με το σύνδρομο, καθώς προκαλούν, σε πολλές περιπτώσεις, απόφραξη του εντέρου [28]. Οι δεσμοειδείς όγκοι είναι συνήθως μονήρεις, ενώ η πιθανότητα ανάπτυξης τους στις γυναίκες είναι κατά δύο φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους άνδρες, γεγονός που έχει σχετισθεί με την πρόσληψη παραγόμενων κατά την εγκυμοσύνη οιστρογόνων και άλλων ορμονών. Οι όγκοι αυτοί αντιμετωπίζονται με χειρουργική αφαίρεση. Εντούτοις, η πιθανότητα επανεμφάνισής τους είναι υψηλή [29]. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδούς, και συγκεκριμένα του θηλώδους τύπου, υπολογίζεται στο 1-2% για τους ασθενείς του συνδρόμου FAP, ενώ είναι ιδιαίτερα συχνός στις γυναίκες, σε σχέση με τους άνδρες (17:1). Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης ορίζεται στα 27 χρόνια [30]. Οι καρκίνοι αυτοί δεν χαρακτηρίζονται από επιθετικότητα και ενέχουν μικρές πιθανότητες μετάστασης, ενώ αν εξαιρεθούν δεν αποτελούν κίνδυνο [31]. Η ανάπτυξη ηπατοβλαστώματος, μιας σπάνιας μορφής καρκίνου του ήπατος εμφανιζόμενη κατά τη βρεφική ή παιδική ηλικία, εκδηλώνεται σε τέκνα ασθενών με συχνότητα 1:225 ασθενείς. Το ηπατοβλάστωμα σχηματίζεται από πρόδρομα ηπατικά κύτταρα τα οποία έχουν αυξημένες μεταστατικές ιδιότητες, καθιστώντας τη μορφή αυτή συχνά θανατηφόρα [32]. Ο

καρκίνος του εγκεφάλου είναι ένα αρκετά σπάνιο φαινόμενο στους ασθενείς με το σύνδρομο. Η ανάπτυξή του λαμβάνει χώρα κατά την πρώτη ή δεύτερη δεκαετία της ζωής [33].

Οι ασθενείς με το σύνδρομο FAP χαρακτηρίζονται από μία σειρά ιδιαίτερων φαινοτυπικών εκδηλώσεων, οι οποίες, όμως, δεν επηρεάζουν σημαντικά την κλινική εικόνα. Το 66%-92% των πασχόντων παρουσιάζουν συγγενή υπερτροφία του μελανινοφόρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς, γνωστή ως CHRPE (Congenital Hypertrophy of the Retinal Pigment Epithelium), η οποία δεν επηρεάζει την όραση και, συνήθως, παρουσιάζεται κατά τη γέννηση. Η CHRPE είναι σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς αποτελεί ένα από τα βασικά διαγνωστικά κριτήρια, η εμφάνιση του οποίου κρούει τον κώδωνα του κινδύνου. Η διαταραχή αυτή διαγιγνώσκεται με βυθοσκόπηση από εξειδικευμένο οφθαλμίατρο και πιστοποιείται με την εμφάνιση τουλάχιστον τεσσάρων στιγμάτων μελανίνης. Η παρουσία πολλαπλών και αμφοτερόπλευρων εστιών είναι χαρακτηριστικός μάρτυρας του συνδρόμου FAP με ειδικότητα που αγγίζει το 95% [34].

Στην κατηγορία των καλοήθων εκδηλώσεων ανήκουν και τα οστεώματα του κρανίου και της γνάθου, καθώς και οι οδοντικές ανωμαλίες, αλλά και οι κύστες της επιδερμίδας και των σμηγματογόνων αδένων. Τα ιδιαίτερα αυτά γνωρίσματα, τα οποία είναι συχνότερα στον υπότυπο του συνδρόμου Gardner, εμφανίζονται πολλά χρόνια πριν τους εντερικούς πολύποδες. Καθίστανται, συνεπώς, καλοί δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση [35].

Το σύνδρομο FAP κατηγοριοποιείται σε τρεις υποκατηγορίες: την οξεία, την κλασική και την ήπια πολυποδίαση. Η κατηγοριοποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης των πολυπόδων, τον αριθμό τους, καθώς και την ηλικία ανάπτυξης καρκίνου. Η οξεία πολυποδίαση (severe polyposis) περιγράφει τον πιο βαρύ φαινότυπο, όπου ο ασθενής εμφανίζει περισσότερους από 5000 πολύποδες στο παχύ έντερο κατά τη διάρκεια της πρώτης και της δεύτερης δεκαετίας της ζωής του. Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου ορίζεται στα 34 χρόνια [36]. Κατά την κλασική πολυποδίαση (classic polyposis) ο ασθενής εμφανίζει εκατοντάδες έως χιλιάδες πολύποδες στο παχύ έντερο κατά τη δεύτερη με τρίτη δεκαετία της ζωής του, ενώ ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης καρκίνου υπολογίζεται στα 40 έτη. Συχνή είναι η εμφάνιση εξω-εντερικών εκδηλώσεων που βοηθούν στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου [37]. Η ήπια πολυποδίαση (attenuated polyposis) χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση λιγότερων από εκατό πολυπόδων στο παχύ έντερο, οι οποίοι εκδηλώνονται κατά την τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής,

ενώ ο καρκίνος εμφανίζεται αργότερα, συνήθως στο δεξί κόλον, ενώ οι εξωεντερικές εκδηλώσεις είναι σπάνιες [38].

Το γονίδιο APC, που είναι υπεύθυνο για το σύνδρομο FAP, χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5q21 έπειτα από μελέτες σύνδεσης σε οικογένειες με χαρακτηριστική πολυποδίαση. Το 1991 κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίσθηκε [39]. Το γονίδιο APC καλύπτει μία περιοχή 100 χιλιάδων βάσεων. Η κωδική περιοχή περιλαμβάνει 8.553 ζεύγη βάσεων και είναι οργανωμένη σε 15 εξόνια [40]. Περισσότερο από το 75% της κωδικής αλληλουχίας περιλαμβάνεται στο εξώνιο 15, καθιστώντας το τον πιο συχνό στόχο σωματικών και γαμετικών μεταλλάξεων [41]. Παρά το μεγάλο μήκος του γονιδίου, το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων, τόσο των σωματικών όσο και των γαμετικών, λαμβάνει χώρα σε μία συγκεκριμένη περιοχή, η οποία ορίζεται από τα κωδικόνια 1.280 έως 1.500, και είναι γνωστή ως περιοχή συσσώρευσης μεταλλάξεων (mutation cluster region: MCR). Η έκφραση του εξωνίου 10Α, το οποίο όταν μεταγράφεται προσθέτει 18 αμινοξέα, αλλά και του εξωνίου 9Α, το οποίο όταν μεταγράφεται προσθέτει 100 αμινοξέα, είναι αποτελέσματα εναλλακτικού ματίσματος, στο οποίο υπόκειται το γονίδιο υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγοντας ισομορφές [42]. Το APC εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού, αλλά το ποσοστό έκφρασης των ισομορφών αυτών ποικίλει ανάλογα με τον ιστό [43].

Από τις αρχικές ακόμα μελέτες του γονιδίου και του συνδρόμου, διαφάνηκαν συσχετίσεις μεταξύ των θέσεων των μεταλλάξεων που φέρουν οι ασθενείς και των φαινοτυπικών εκδηλώσεών τους. Συνεπώς, η θέση της μετάλλαξης καθορίζει τόσο τη σοβαρότητα της πολυποδίασης, όσο και την εκδήλωση εξωεντερικών εκδηλώσεων.

1.3.2.3. Πολυποδίαση σχετιζόμενη με το MUTYH (MUTYH-Associated Polyposis-MAP)

Το σύνδρομο MAP περιγράφηκε ως νέο σύνδρομο το 2002, ύστερα από τη μελέτη μίας οικογένειας από τη Βρετανία. Στην οικογένεια αυτή τρία αδέρφια εμφάνισαν πολλαπλά αδενώματα εντέρου και νόσησαν από καρκίνο του παχέος εντέρου. Η αλληλούχιση του γονιδίου APC απέκλεισε την παρουσία γαμετικών μεταλλάξεων, ενώ ο χαρακτηρισμός των σωματικών μεταλλάξεων στους όγκους αυτούς έδειξε ότι στην πλειονότητα τους ήταν G:C>T:A μεταστροφές. Το γεγονός αυτό καταδείκνυε την πιθανότητα κληρονόμησης μιας συγκεκριμένης δυσλειτουργίας στο μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες. Σαρώνοντας τα γονίδια που παίρνουν μέρος στον παραπάνω

μηχανισμό, ανιχνεύθηκαν δύο μεταλλάξεις στο γονίδιο MUTYH, σε καθένα από τα δύο αλληλόμορφα των ασθενών [44].

Ο φαινότυπος των ατόμων με ΜΑΡ είναι πανομοιότυπος με αυτόν των ατόμων με την ήπια μορφή FAP, δηλαδή με την εμφάνιση 10-100 αδενωματώδων πολυπόδων ή ακόμα και με την κλασική μορφή του FAP (100-1000 αδενωματώδεις πολύποδες). Σε αρκετούς ασθενείς, επίσης, παρουσιάζονται λιγότερα από 10 αδενώματα μέχρι την ηλικία των 50, ενώ πολλοί από αυτούς εμφανίζουν καρκίνο [45]. Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης της πολυποδίασης είναι τα 46 έτη, ενώ ο μέσος όρος για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου είναι τα 48 έτη. Τα αδενώματα εντοπίζονται τις περισσότερες φορές στο εγγύς κόλον. Το 25% των ασθενών που εμφανίζουν χαρακτηριστικά συμπτώματα της ήπιας μορφής του συνδρόμου FAP, χωρίς όμως να έχουν κάποια ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο APC, φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο MUTYH. Η μεταβίβαση του συνδρόμου γίνεται με υπολειπόμενο τρόπο, ενώ τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου, φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παγέος εντέρου [46]. Τα διαγνωστικά κριτήρια για το σύνδρομο MAP έχουν θεσπισθεί ως εξης: ο ασθενής πρέπει να παρουσιάζει τουλάχιστον 10 ορθοκολικά αδενώματα, να απουσιάζουν τυχόν μεταλλάξεις στο γονίδιο APC και να υπάρχει συμβατό οικογενειακό ιστορικό όχι μόνο με την ύπαρξη του συνδρόμου, αλλά και με τον τρόπο κληρονομικότητας.

Το γονίδιο *MUTYH* εντοπίζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 1p34.3-p32.1 και κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική αλυσίδα 546 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη MUTYH παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης. Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότερες από 100 μεταλλάξεις, ενώ πιο αναλυτικές μελέτες έχουν οδηγήσει στην ανίχνευση μεταλλάξεων που εμφανίζουν πολύ υψηλή συχνότητα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς [47]. Καθίσταται, συνεπώς, απαραίτητη η συσχέτιση των στρατηγικών μοριακής διαγνωστικής με τον υπό μελέτη πληθυσμό.

1.3.2.4. Σύνδρομο Peutz-Jeghers

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS; MIM 175200) είναι ένα από τα σπάνια σύνδρομα πολυποδίασης, το οποίο αρχικά περιγράφηκε σε μια ολλανδική οικογένεια από τον Peytz το 1921 και τον Jeghers το 1949 [48]. Η κύρια φαινοτυπική εκδήλωση του συνδρόμου είναι η αμαρτωματώδης πολυποδίαση του γαστρεντερικού συστήματιος, η οποία συνοδεύεται από χαρακτηριστική βλεννογονο-δερματική υπέρχρωση με εναπόθεση μελανίνης περιστοματικά, στα γεννητικά όργανα και στα δάχτυλα των άνω και κάτω άκρων. Η

συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου υπολογίζεται σε 1:120.000 άτομα, ενώ ο τρόπος μεταβίβασής του είναι επικρατής αυτοσωμικός [49].

Τα πλέον συνήθη κλινικά συμπτώματα ενός ασθενούς με σύνδρομο Peutz-Jeghers είναι ο εγκολεασμός του λεπτού εντέρου, η απόφραξη του παχέος εντέρου, το κοιλιακό άλγος και η αιμορραγία του ορθού. Η κυριότερη φαινοτυπική εκδήλωση που χαρακτηρίζει το σύνδρομο και αποτελεί το αίτιο των προαναφερθέντων κλινικών συμπτωμάτων είναι η πολυποδίαση αμαρτωματώδους τύπου του γαστρεντερικού συστήματος, ο οποίος συνήθως εντοπίζεται στο λεπτό έντερο [50]. Πολύποδες είναι δυνατό να εμφανισθούν, επίσης, στο στομάχι και στην ορθοκολική περιοχή. Σε απόλυτη συσχέτιση με την αμαρτωματώδη φύση τους, οι πολύποδες των ασθενών με Peutz-Jeghers είναι καλοήθεις, εμφανίζονται έμμισχοι και με σχεδόν φυσιολογική κυτταρική σύσταση. Το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους είναι το δενδροειδές εσωτερικό τους, όπου κατά βάση καλύπτεται από λείες μυικές ίνες και μπορεί να γίνει ορατό ακόμα και με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, ενώ καλύπτονται από επιθήλιο, το οποίο βρίσκεται στον υποκείμενο ιστό [51].

Το κυριότερο διαγνωστικό στοιχείο που συνοδεύει το σύνδρομο είναι η εναπόθεση μελανίνης με τη μορφή κηλίδων, η οποία κάνει την εμφάνισή της στη νηπιακή ηλικία και εμφανίζεται εντονότερη κατά την εφηβεία. Οι κηλίδες αυτές είναι συνήθως διαμέτρου μικρότερης των πέντε χιλιοστών και η χρώση τους με την πάροδο των χρόνων εξασθενεί, με εξαίρεση τις περιστοματικές κηλίδες, οι οποίες παραμένουν [52]. Οι χαρακτηριστικές δερματολογικές εκδηλώσεις αποτελούν διαγνωστικό κριτήριο κατά τον κλινικό έλεγχο, αν και δεν σχετίζονται με την παθογένεια του συνδρόμου. Προκειμένου να πιστοποιηθεί η κλινική διάγνωση είναι απαραίτητο να πληρούνται τουλάχιστον δύο από τα βασικά κριτήρια που διέπουν το σύνδρομο, τα οποία είναι η παρουσία πολλαπλών πολυπόδων αμαρτωματώδους τύπου με τη χαρακτηριστική σύσταση των μυϊκών ινών, η

Το σύνδρομο Peutz-Jeghers συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Υπολογίζεται ότι οι ασθενείς αντιμετωπίζουν από τέσσερις έως και 18 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ενώ ο δια βίου κίνδυνος αγγίζει το 93%, με μέσο όρο ηλικίας εμφάνισης τα 43 χρόνια [53]. Σε ασθενείς με το σύνδρομο παρατηρείται συχνά εμφάνιση καρκίνου του γαστρεντερικού σωλήνα, αλλά και εμφάνιση εξεντερικού καρκίνου, ιδιαίτερα του μαστού, των ωοθηκών, των όρχεων, του πνεύμονα και του ενδομητρίου, σε μικρότερη συχνότητα. Πριν από το 30ο έτος της ηλικίας, οι περιπτώσεις θανάτου σχετίζονται, γενικά, με την εντερική πολυποδίαση (εγκολεασμοί,

αιμορραγίες), ενώ μετά το 30ο έτος της ηλικίας σχετίζονται με την ανάπτυξη κακοήθων όγκων [54].

Η ανακάλυψη του υπεύθυνου γονιδίου για το σύνδρομο Peutz-Jeghers, επιτεύχθηκε με μελέτες σύνδεσης σε δώδεκα οικογένειες που έφεραν τα ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά [55]. Οι μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *LKB1/STK11*, το οποίο κωδικοποιεί μία κινάση της σερίνης/θρεονίνης και εδράζεται στο χρωμόσωμα 19p13.3, βρέθηκαν ως η κύρια αιτία του συνδρόμου [56]. Η ανθρώπινη LKB1 έχει μεγάλη ομολογία με την κυτταροπλασματική κινάση της σερίνης/θρεονίνης XEEK1 του *Xenopus laevis* και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς [57]. Η ανθρώπινη πρωτεϊνική αλυσίδα έχει 433 αμινοξέα, η ενεργοποίηση της οποίας ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης. Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότερες από 200 διαφορετικές γαμετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *LKB1/STK11* που προδιαθέτουν για το σύνδρομο. Δεδομένου του εύρους των τύπων καρκίνων που σχετίζονται με το σύνδρομο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση συγκεκριμένων μεταλλάξεων (γονότυπος) με τις κλινικές εκδηλώσεις. Φαίνεται να υπάρχει συγκεκριμένο πρότυπο μεταξύ θέσεως μετάλλαξης και είδους καρκίνου, όπως υπάρχει και στο σύνδρομο FAP.

1.3.2.5. Νεανικοί πολύποδες και οικογενής νεανική πολυποδίαση (Juvenile Polyposis)

Οι νεανικοί πολύποδες και η οικογενής νεανική πολυποδίαση (Juvenile Polyposis) είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση των πολλαπλών πολυπόδων στο γαστρεντερικό σωλήνα, συνήθως σε άτομα που βρίσκονται στην παιδική ηλικία, στην εφηβεία ή σε νεαρούς ενήλικες. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η εμφάνιση των πολυπόδων γίνεται κατά το τέταρτο έως το πέμπτο έτος της ζωής, ενώ υπάρχει και μια φάση εκδήλωσης σε ενήλικα άτομα, που μπορεί να έχουν ηλικία 25 ετών ή μεγαλύτερα [3]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, για τη διάγνωση του συνδρόμου νεανική πολυποδίαση πρέπει να ισχύει ένα από τα εξής κριτήρια: ύπαρξη περισσότερων από πέντε νεανικών πολυπόδων στο ορθό, ύπαρξη νεανικών πολυπόδων σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, ύπαρξη οποιουδήποτε αριθμού νεανικών πολυπόδων σε άτομο με βεβαρυμένο οικογενειακό ιστορικό νεανικής πολυποδίασης. Οι νεανικοί πολύποδες οδηγούν σε ανώδυνες αιμορραγίες από το ορθό [12].

Ο εντοπισμός των νεανικών πολυπόδων λαμβάνει χώρα, συνήθως, στο ορθό και συναντώνται εκεί ως πολλαπλοί πολύποδες στο 14-20% των περιπτώσεων. Αντίθετα, η νεανική πολυποδίαση (juvenile polyposis) που εντοπίζεται σε όλη την έκταση του

γαστρεντερικού σωλήνα, είναι εξαιρετικά σπάνια. Για την αιτιολογία και παθογένεια των νεανικών πολυπόδων υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις. Συγκεκριμένα, εν μέρει θεωρούνται ως συγγενείς αναπτυξιακές ανωμαλίες, δηλαδή αμαρτώματα του εντερικού βλεννογόνου, και εν μέρει ως φλεγμονώδεις ψευδοπολύποδες. Ιστολογικά παρατηρούνται κυστικά διατεταγμένα αδένια (πολύποδες από κατακράτηση), μέσα σε φλεγμονώδες χαλαρό στρώμα. Το καλυπτικό επιθήλιο εμφανίζει τη συνήθη για την περιογή διαφοροποίηση. Λείος μυϊκός ιστός δεν ανευρίσκεται στο στρώμα του πολύποδα, γεγονός που αποτελεί κριτήριο διαφορικής διάγνωσης από τους ανάλογους πολύποδες στο σύνδρομο Peutz-Jeghers. Η επιφάνεια των νεανικών πολυπόδων είναι συχνά διαβρωμένη λόγω της φλεγμονής. Ασθενείς με οικογενή νεανική πολυποδίαση (50-200 πολύποδες) διατρέχουν κίνδυνο 20-60% να νοσήσουν από ορθοκολικό καρκίνωμα μέχρι το 60ο έτος της ηλικίας. Επιπλέον, υπάργει αυξημένος κίνδυνος να αναπτύξουν καρκινώματα του στομάγου και του δωδεκαδάκτυλου. Περίπου στο 10% των ασθενών με οικογενή νεανική πολυποδίαση παρατηρούνται ποικίλες αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως αρτηριοφλεβώδη συρίγγια των πνευμόνων, μακροκεφαλία, υπερτελορισμός, κρυψορχία, ελλείμματα του μεσοκοιλιακού διαφράγματος, αναπτυξιακές ανωμαλίες της νεφρικής πυέλου, υπερτροφικές οστεοαρθροπάθειες και διαταραχές της ανάπτυξης του κινητικού συστήματος.

Περίπου το 30% των ασθενών με οικογενή νεανική πολυποδίαση εμφανίζουν μια μεταλλαγή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου SMAD4 (SMAD family member 4), γνωστό και ως DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4). Αναλύσεις μοριακής γενετικής συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι τουλάχιστον ένας ακόμα γονιδιακός τόπος πρέπει να είναι υπεύθυνος για την οικογενή νεανική πολυποδίαση. Η μεικτή μορφή μιας πολυποδίασης με αδενώματα και νεανικούς πολύποδες σε οικογενή βάση χαρτογραφήθηκε πρόσφατα στο χρωμοσωμικό τόπο 7q16 [58].

1.4. Παθολογοανατομική εικόνα

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζει διαφορετική συχνότητα κατανομής στα διάφορα τμήματα του εντέρου (σύμφωνα με στοιχεία του Π.Ο.Υ.): 11% στο τυφλό, 9% στο ανιόν κόλον, 12% στο εγκάρσιο κόλον, 6% στο κατιόν κόλον, 26% στο σιγμοειδές, 11% στο ορθοσιγμοειδές και 25% στο ορθό. Αυτό σημαίνει ότι 62% των καρκίνων εντοπίζονται στο περιφερικό κόλον και ορθό με αποτέλεσμα στο 25% των περιπτώσεων ο καρκίνος να μπορεί να διαγνωσθεί μόνο με δακτυλική εξέταση και στο 50% των περιπτώσεων με

ενός σημεία του παχέος εντέρου ανέρχεται σε 4% περίπου. Έχει παρατηρηθεί, τα τελευταία χρόνια, αύξηση της επίπτωσης των εγγύς εντοπιζόμενων αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου, κάτι το οποίο μπορεί να σχετίζεται με την παρατηρούμενη μείωση των καρκίνων του ορθού, εξαιτίας της εφαρμογής προγραμμάτων πρωιμότερης ενδοσκοπικής διάγνωσης. Τα πλακώδη και αδενοπλακώδη καρκινώματα του παχέος εντέρου είτε μονήρη, είτε σε συνδυασμό με ταυτόχρονα ή και μετάχρονα αδενοκαρκινώματα σε άλλα σημεία του παχέος εντέρου, παρουσιάζουν, σαφώς, χαμηλότερη συχνότητα [59].

Στη μελέτη της παθολογικής εικόνας του ασθενούς με ορθοκολικό καρκίνο, η μορφολογική διάγνωση παίζει αποφασιστικό ρόλο για την επιλογή θεραπείας. Μακροσκοπικά διακρίνονται πέντε κύριες διαφορετικές μορφές [60]:

- Ο πολυποειδής ή ανθοκραμβοειδής καρκίνος εμφανίζεται ως ανθοκραμβοειδής μάζα, που αναπτύσσεται ταχέως, με ανώμαλη συνήθως επιφάνεια που προβάλλει μέσα στον αυλό του εντέρου. Η έκταση της διήθησης του εντερικού τοιχώματος είναι συνήθως μικρή.
- Ο ελκωτικός καρκίνος εμφανίζεται ως τυπικό κακοήθες έλκος με ανώμαλα προέχοντα χείλη και ρυπαρό πυθμένα. Μπορεί να περιορίζεται στο ένα μόνο τεταρτημόριο του τοιχώματος του εντέρου, συνηθέστερα όμως καταλαμβάνει περισσότερα του ενός. Παρουσιάζει εκτεταμένη διήθηση και δημιουργεί σημαντική παραμόρφωση και κάποιο βαθμό στένωσης. Τα καρκινώματα περιγράφονται ως ελκωτικά πινακοειδή ή ζωνοειδή με κυκλοτερή ανάπτυξη.
- Ο δακτυλιοειδής ή στενωτικός καρκίνος πρόκειται, κατά πάσα πιθανότητα, για προχωρημένο ελκωτικό καρκίνο ο οποίος έχει διηθήσει κυκλοτερώς και τα τέσσερα τεταρτημόρια του εντερικού τοιχώματος. Η έκταση του καρκίνου κατά τον επιμήκη άξονα του εντέρου ποικίλλει από δύο έως οκτώ εκατοστά.
- Ο διάχυτος διηθητικός καρκίνος αντιστοιχεί μορφολογικά στην πλαστική λινίτιδα του στομάχου. Προκαλεί πάχυνση του εντερικού τοιχώματος, η οποία έχει έκταση τουλάχιστον πέντε έως οκτώ εκατοστά κατά των επιμήκη άξονα. Συχνά, ο τύπος αυτός αποτελεί προέκταση άλλων μακροσκοπικών μορφών.
- Με τον όρο κολλοειδής καρκίνος περιγράφεται μια μεγάλη μάζα με ζελατινοειδή εμφάνιση, όπου είναι δυνατή η ύπαρξη μεγάλου βαθμού διήθησης και εξέλκωσης. Τα κολλοειδή καρκινώματα χαρακτηρίζονται από σωληνώδεις ή μικτούς κυτταρικούς σχηματισμούς που πληρούνται ή περιβάλλονται από μεγάλες ποσότητες βλέννης.

Κατά τη μακροσκοπική εξέταση και περιγραφή του χειρουργικού παρασκευάσματος κολεκτομής πρέπει πάντα να προσδιορίζεται το βάθος διήθησης του όγκου, καθώς και αν αυτός επεκτείνεται πέρα από το εντερικό τοίχωμα ή διηθεί μικροσκοπικές περινεοπλασματικές φλέβες. Τέλος, πρέπει να επισκοπείται ο λοιπός εντερικός βλεννογόνος και να γίνεται ψηλάφηση του εντερικού τοιχώματος.

Με βάση τα στοιχεία του Π.Ο.Υ., τα καρκινώματα του παχέος εντέρου ταξινομούνται ιστολογικά σε υψηλής, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα, μικροκυτταρικά καρκινώματα, καρκινώματα με χοριοκαρκινωματώδη στοιχεία, χοριοκαρκινώματα, καρκινώματα με θέσεις οστικής μετάπλασης, μικροαδενικά καρκινώματα, διαυγοκυτταρικά καρκινώματα, καρκινώματα με ψαμμώδη σωμάτια και, τέλος, καρκινώματα με μικτούς χαρακτήρες. Ο συνηθέστερος ιστολογικός τύπος είναι το βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα μέσης διαφοροποίησης που αποτελείται από σωληνώδεις, ηθμοειδείς, θηλώδεις και συμπαγείς καρκινωματώδεις βλάστες [61].

Μικροσκοπικά, ο ορθοκολικός καρκίνος, στο 95% των περιπτώσεων, αποτελείται από αδενοκαρκινώματα με μεγάλες, ωστόσο, διαφορές ως προς το βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων. Τα αδενοκαρκινώματα είναι τα οργανοτυπικά καρκινώματα της ορθοκολικής περιοχής. Στα διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα, τα καρκινικά κύτταρα είναι σχεδόν όμοια με τα φυσιολογικά και σχηματίζουν αδένες όμοιους με εκείνους της φυσιολογικής εντερικής βλενογόννου. Αυτά έχουν και την καλύτερη πρόγνωση. Αντίθετα, στα αμετάπλαστα αδενοκαρκινώματα τα καρκινικά κύτταρα δεν μοιάζουν με αυτά της φυσιολογικής βλεννογόνου. Σύμφωνα με τους ορισμούς του Π.Ο.Υ, και ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης, τα καρκινώματα διακρίνονται ιστολογικά σε χαμηλόβαθμης κακοήθειας καρκινώματα: καλής διαφοροποίησης (G1) ή και μέτριας διαφοροποίησης (G2), υψηλόβαθμης κακοήθειας καρκινώματα: χαμηλής διαφοροποίησης και (G3). αδιαφοροποίητα (G4).

Ο ορθοκολικός καρκίνος, στη συνέχεια, μπορεί να εισχωρήσει σε γειτονικούς ιστούς με τους εξής τρόπους: με άμεση επέκταση κατά συνέχεια ιστών, λεμφογενώς, αιματογενώς, με διασπορά καρκινικών κυττάρων που αποφολιδώνονται και πέφτουν μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα και με εμφύτευση καρκινικών κυττάρων που διαφεύγουν κατά τη διάρκεια της εγχείρησης [8].
1.5. Γενετικά μονοπάτια καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και το ορθό

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι πιθανόν η πιο μελετημένη, ως προς τη γονιδιακή και γενετική της βάση, μορφή καρκίνου. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εξελίσσεται μέσω χαρακτηριστικών κλινικών και ιστολογικών μονοπατιών που ξεκινούν από αλλοιώσεις του φυσιολογικού βλεννογόνου των κρυπτών για να καταλήξουν μέσω δυσπλασιών και αδενωμάτων στην καρκινική εξαλλαγή. Η πορεία αυτή χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων στο γονιδίωμα, πολλές από τις οποίες οδηγούν σε απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Η δημιουργία όμως των μεταλλάξεων αυτών προϋποθέτει μία γενικότερη γενετική αστάθεια.

Η γενετική αστάθεια προκύπτει από τη μειωμένη ικανότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA να αποκαταστήσουν επιτυχώς τις βλάβες που προκαλούνται στο μόριο του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής [62]. Η γενετική αστάθεια αποτελεί μία από τις πρωταρχικές νεοαποκτηθείσες ιδιότητες των προκαρκινικών κυττάρων που προάγει την ογκογένεση. Κατά τη μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου, έχουν παρατηρηθεί δύο βασικοί τύποι γενετικής αστάθειας: η χρωμοσωμική αστάθεια και η αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ενός έως έξι νουκλεοτιδίων).

Το 70% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμική αστάθεια, ενώ το 15% από αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών. Το 15% των περιπτώσεων παρουσιάζεται αρνητικά και για τους δύο τύπους γενετικής αστάθειας [63].

Οι όγκοι οι οποίοι φέρουν υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας είναι ανευπλοειδείς και φέρουν σωματικές μεταλλάξεις, κυρίως στο ογκογονίδιο KRAS, αλλά και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια APC και p53. Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών είναι διπλοειδείς και φέρουν σωματικές μεταλλάξεις σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μικρού μήκους οι οποίες εδράζονται τόσο σε κωδικοποιούσες όσο και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές γονιδίων, ικανών να προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Ο παραπάνω διαχωρισμός δεν αποκλείει την αλληλεπίδραση των μονοπατιών της χρωμοσωμικής και της μικροδορυφορικής μικροδορυφορικά ασταθείς αστάθειας. Οı όγκοι διακρίνονται περαιτέρω σε κληρονομούμενους και σποραδικούς, οι οποίοι φέρουν διακριτές μοριακές ιδιότητες. Ο εντοπισμός των ασθενών που φέρουν γενετική προδιάθεση ως προς την ανάπτυξη καρκίνου

του παχέος εντέρου είναι πολύ σημαντικός, καθώς οι συγκεκριμένοι ασθενείς θα πρέπει να υποβληθούν σε επισταμένη προληπτική ιατρική παρακολούθηση.

Συνοψίζοντας, η χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability: CIN) είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία των σποραδικών περιστατικών ορθοκολικού καρκίνου, ενώ η ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA λόγω μεταλλαγών σε επιδιορθωτικά γονίδια είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία των όγκων του κληρονομικού ορθοκολικού καρκινώματος χωρίς πολυποδίαση και για το 10% έως 15% των σποραδικών ορθοκολικών καρκίνων. Το κοινό στοιχείο αυτών των μονοπατιών είναι η γονιδιακή αστάθεια, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλαγών που προσδίδουν ένα πλεονέκτημα επιβίωσης σε ειδικούς κυτταρικούς κλώνους, οι οποίοι μπορούν να εξαλλαχθούν, τελικώς, σε καρκινογόνους. Αυτές οι μεταλλαγές συμβαίνουν σε γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο [64].

1.5.1. Χρωμοσωμική αστάθεια

Η χρωμοσωμική αστάθεια απορυθμίζει τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μεταβάλλοντας την ισορροπία των χρωμοσωμάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης ογκογονιδίων (θετική δράση όσον αφορά στην αύξηση και στην επιβίωση των κυττάρων), η οποία πραγματοποιείται μέσω του πολλαπλασιασμού των αντίστοιχων αλληλουχιών και της απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω απαλοιφής τους. Οι όγκοι οι οποίοι φέρουν υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας ακολουθούν το «κλασικό» μονοπάτι της σταδιακής μετάβασης από αδένωμα σε καρκίνωμα. Τέλος, θεωρούνται σταθεροί σε σύγκριση με τα επίπεδα αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών [65]. Όσον αφορά στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η απενεργοποίηση του γονιδίου APC αποτελεί το πρωταρχικό βήμα της ογκογενετικής διαδικασίας. Ως εκ τούτου, ένας μεγάλος αριθμός μελετών προσπαθεί να αποσαφηνίσει τον ρόλο του γονιδίου ΑΡC στην εκδήλωση της χρωμοσωμικής αστάθειας, η οποία χαρακτηρίζει την πλειονότητα των όγκων του παχέος εντέρου. Έχουν προταθεί δύο βασικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το ΑΡC θα μπορούσε να προάγει τη χρωμοσωμική αστάθεια. Σύμφωνα με τον πρώτο, το γονίδιο APC προκαλεί μείωση της παρατηρούμενης απόστασης των κινητοχώρων και, ως εκ τούτου, λανθασμένη πρόσδεση των μικροσωληνίσκων και διαχωρισμό τιον χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Η παραπάνω ενέργεια ενδέχεται να διαμεσολαβείται από την απορρύθμιση της μειωτικής κινεσίνης MCAK, η δράση της οποίας ρυθμίζεται έμμεσα από το APC, το οποίο παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωσή της από την κινάση Aurora-B που

την απενεργοποιεί. Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο APC επάγουν τη συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt και, κατ' επέκταση, τη συσσώρευση της πρωτεΐνης β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα, η οποία δεν αποικοδομείται λόγω μη λειτουργικότητας της πρωτεΐνης APC. Με αυτόν τον τρόπο, προάγεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt, μέσω του οποίου προκαλείται η μεταγραφή διάφορων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου [66].

1.5.2. Αστάθεια μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Το μονοπάτι της αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών επάγεται από σωματικές μεταλλάξεις (κυρίως αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης) σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μικρού μήκους, οι οποίες εντοπίζονται τόσο σε κωδικοποιούσες περιοχές γονιδίων ικανών να προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου όσο και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές (ιντρόνια) ή ρυθμιστικές περιοχές (υποκινητές) διάφορων γονιδίων που επηρεάζουν τη βιολογική συμπεριφορά των συγκεκριμένων όγκων [67]. Οι όγκοι οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών είναι διπλοειδείς και ενδέχεται να φέρουν κάποιες καρυοτυπικές ανωμαλίες [68]. Οι ορθοκολικοί όγκοι που αναπτύσσονται μέσα από το μονοπάτι της αστάθειας μικροδορυφορικών αλληλουχιών έχουν ως αφετηρία τους κληρονομικές ή σωματικές μεταλλαγές σε ένα από τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, δηλαδή τα MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1, και PMS2 [69].

Η ομάδα των μικροδορυφορικά ασταθών όγκων περιλαμβάνει τις περιπτώσεις καρκίνου παχέος εντέρου του κληρονομούμενου συνδρόμου του Lynch, οι οποίες και αντιπροσωπεύουν το 3%, αλλά και τις σποραδικές περιπτώσεις οι οποίες αντιστοιχούν στο 13% (15% του συνόλου των κρουσμάτων καρκίνου του παχέος εντέρου). Παρόλο που τόσο οι σποραδικοί όσο και οι κληρονομούμενοι όγκοι παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία και εντοπίζονται κυρίως στο εγγύς κόλον, ορισμένα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά εκδηλώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό στους σποραδικούς από ό,τι στους κληρονομούμενους όγκους, ή και αντίστροφα. Συγκεκριμένα, ο αυξημένος βαθμός βλεννώδους έκκρισης, ο χαμηλός βαθμός διαφοροποίησης και η ετερογένεια των προκαρκινικών παραμορφώσεων με προεξάρχουσα την παρουσία μη τυπικής «οδοντωτής» (serrated) διαμόρφωσης χαρακτηρίζουν κυρίως τους σποραδικούς όγκους, ενώ ο αυξημένος αριθμός διηθητικών κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, η αποδιαφοροποίηση του όγκου και η παρουσία αδενωμάτων χαρακτηρίζουν τους όγκους του συνδρόμου του Ευρουφιάτων καριών ο του συνδρόμου του του και η παρουσία

μικροδορυφορικά ασταθείς όγκοι διαθέτουν ευνοϊκότερη πρόγνωση, όσον αφορά στην εξέλιξη της ασθένειας, και χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης [70].

1.6. Σταδιοποίηση των ορθοκολικών όγκων

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου καθορίζεται τόσο από τα παθολογοανατομικά όσα και από τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου. Υπάρχουν περισσότερα από ένα συστήματα σταδιοποίησης του ορθοκολικού καρκίνου: κατά Dukes, κατά Astler-Coller, και το σύστημα TNM/AJCC. Κοινό κριτήριο για τα τρία αυτά συστήματα σταδιοποίησης είναι ο βαθμός εξάπλωσης του καρκίνου στις στοιβάδες του εντερικού τοιχώματος, τα παρακείμενα όργανα και τα απομακρυσμένα όργανα [71]. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια προοδευτική μετάβαση από τη σταδιοποίηση κατά Dukes στη σταδιοποίηση κατά TNM/AJCC, καθώς η τελευταία θεωρείται ότι οδηγεί σε ακριβέστερη περιγραφή του πρωτοπαθή όγκου και της εξάπλωσής του.

Η ταξινόμηση κατά Dukes βασίζεται στην τοπική έκταση της νόσου και στην παρουσία διηθημένων λεμφαδένων και φαίνεται ότι σχετίζεται αρκετά καλά με την πρόγνωση της νόσου. Η ταξινόμηση αυτή προτάθηκε αρχικά από τον Dukes για τον καρκίνο του ορθού αποδείχθηκε, όμως, ότι είναι εξίσου ικανοποιητική και για τον καρκίνο του κόλου. Το σύστημα Dukes κατατάσσει τον καρκίνο αυτό σε στάδια από A έως και C [72]. Η ως άνω σταδιοποίηση περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Α: Ο όγκος περιορίζεται στο τοίχωμα του εντέρου και δεν επεκτείνεται σε εξωεντερικούς ιστούς και λεμφαδένες.
- Β: Ο όγκος επεκτείνεται στους περικολικούς ιστούς χωρίς διήθηση των λεμφαδένων.
- C: Υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Η τροποποίησή κατά Astler-Coller στην κατά Dukes ταξινόμηση, προσθέτει το στάδιο D και διαιρεί τα στάδια σε υποστάδια, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια [73]:

- Α1: Ο όγκος εντοπίζεται στον βλεννογόνο του εντέρου.
- Α2: Ο όγκος εντοπίζεται στον υποβλεννογόνιο.
- Α3: Ο όγκος εντοπίζεται στον υποβλεννογόνιο μυική στιβάδα.
- B1: Ο όγκος ξεπερνά τον υποβλεννογόνιο μυική στιβάδα.
- B2: Ο όγκος διηθεί τον ορογόνο.

- C1: Υπάρχουν διηθημένοι επιχώριοι λεμφαδένες.
- C2: Διηθούνται όλοι οι λεμφαδένες μέχρι την έκφυση της κάτω μεσεντέριας αρτηρίας από την αορτή.
- D: Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις.
 - ο D1: Ανεγχείρητος όγκος ή παραμονή μέρους του όγκου μετά την εγχείρηση.
 - ο D2: Απομακρυσμένες μεταστάσεις (π.χ. ήπαρ, πνεύμονες).

Η σταδιοποίηση είναι εφικτή μόνο μετεγχειρητικά και προκύπτει από τα παθολογοανατομικά ευρήματα [74].

Το συνηθέστερο σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου είναι η ταξινόμηση TNM (Tumors, Nodes, Metastases) των κακοηθών όγκων, που έχει καθιερωθεί από τη Διεθνή Ένωση Κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer: UICC). Με το σύστημα αυτό, εκτιμώνται τρεις παράμετροι. Αυτές είναι: ο πρωτοπαθής όγκος, η παρουσία θετικών επιχώριων λεμφαδένων και η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλους ιστούς και/ή όργανα [75]. Το σύστημα σταδιοποίησης TNM των κακοηθών όγκων έχει υιοθετηθεί και προσαρμοστεί από την Αμερικανική Επιτροπή κατά του Καρκίνου (American Joint Committee on Cancer: AJCC). Το στάδιο ενός ορθοκολικού κακοήθη όγκου περιγράφεται με χρήση των λατινικών αριθμών Ι έως ΙV, έτσι ώστε ένας υψηλός αριθμός σταδίου να φανερώνει έναν περισσότερο προχωρημένο όγκο.

Το σύστημα TNM για τη σταδιοποίηση των ορθοκολικών όγκων περιλαμβάνει τα εξής:

- Τ: Πρωτοπαθής όγκος.
 - ο TX: Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί.
 - ΤΟ: Δεν υπάρχει ένδειξη για πρωτοπαθή όγκο.
 - ο Tis: Καρκίνωμα in situ.
 - T1: Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνο.
 - Τ2: Ο όγκος διηθεί (κυρίως) το μυϊκό χιτώνα.
 - Τ3: Ο όγκος διηθεί υπορογόνια ή τους παρακολικούς ή παραορθικούς ιστούς που δεν καλύπτονται με περιτόναιο.
 - Τ4: Ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο και/ή διηθεί άμεσα άλλα όργανα.
- Ν: Επιχώριοι λεμφαδένες.
 - ο NX: Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθούν.

- ο Ν: Απουσία μεταστάσεων σε επιχώριους λεμφαδένες.
- Ν1: Μεταστάσεις σε έναν έως τρεις παρακολικούς ή παραορθικούς λεμφαδένες.
- N2: Μεταστάσεις σε τέσσερις ή περισσότερους παρακολικούς ή παραορθικούς λεμφαδένες.
- Μ: Απομακρυσμένες μεταστάσεις.
 - ο MX: Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί.
 - ο ΜΟ: Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων.
 - ο Μ1: Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να επεκταθεί με τους παρακάτω τρόπους:

- Κατά συνέχεια ιστών: Η ανάπτυξη του καρκίνου αρχίζει πάντοτε από τον βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Στη συνέχεια, διηθείται ο υποβλεννογόνιος, ο μυικός χιτώνας και ο ορογόνος με το περικολικό λίπος. Διαδοχικά, μπορεί να προσβληθούν γειτονικά όργανα και το κοιλιακό τοίχωμα. Πρακτικά, ωστόσο, σημασία έχει και η επέκταση του καρκίνου κατά τον επιμήκη άξονα και μάλιστα η μικροσκοπική διήθηση του τοιχώματος του κόλου.
- Με τη λεμφική οδό: Αποτελεί τη συνηθέστερη οδό μετανάστευσης του καρκίνου του παχέος εντέρου. Όταν ο καρκίνος έχει διηθήσει μόνο το εντερικό τοίχωμα, το ποσοστό διήθησης των επιχώριων λεμφαδένων ανέρχεται σε 30-50%. Όταν όμως ξεπεράσει το τοίχωμα του εντέρου, τότε η διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων φθάνει στο 60-80%. Ύστερα από τους επικολικούς λεμφαδένες διηθούνται οι παρακολικοί, οι ενδιάμεσοι και τέλος οι τελικοί ή προαορτικοί. Η διήθηση των λεμφαδένων δεν έχει σχέση με το μέγεθος του όγκου. Επίσης, είναι δυνατό να βρεθούν διηθημένοι λεμφαδένες σε κάποια απόσταση από τον πρωτοπαθή όγκο, ενώ ενδιάμεσα δεν υπάρχουν προσβεβλημένοι λεμφαδένες.
- Με την αιματική οδό: Μικροέμβολα καρκινικών κυττάρων μεθίστανται με τις φλέβες του μεσοκόλου και ακολούθως με την πυλαία φλέβα στο ήπαρ σε ποσοστό 10-20%.
 Επίσης, δια των σπονδυλικών και των οσφυικών φλεβών δύναται να προκληθούν μεταστάσεις στον πνεύμονα και τα οστά. Για τον περιορισμό της αιματογενούς διασποράς θα πρέπει κατά τη διάρκεια της εγχείρησης να εφαρμόζεται η τεχνική των απαλών χειρισμών.

- Με ενδοπεριτοναϊκή διασπορά. Στην περίπτωση επέκτασης του καρκίνου στον ορογόνο χιτώνα του εντέρου είναι δυνατό καρκινικά κύτταρα να αποπέσουν στην περιτοναϊκή κοιλότητα, να εμφυτευθούν στην ορθοκυστική ή την ορθομητρική πτυχή του περιτοναίου, να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν τον «ύφαλο του Blummer» ή σε προχωρημένα στάδια την «παγωμένη πύελο». Η ως άνω διασπορά είναι ψηλαφητή στη δακτυλική εξέταση.
- Με ενδοαυλική διασπορά. Δια του αυλού του εντέρου είναι δυνατόν να γίνουν εμφυτεύσεις καρκινικών κυττάρων σε κεντρικότερα ή περιφερικότερα τμήματα του παχέος εντέρου. Αυτό είναι αποτέλεσμα κακών χειρισμών επί του όγκου προεγχειρητικά ή και διεγχειρητικά.
- Επέκταση του νεοπλάσματος κατά μήκος του περινευρίου των νεύρων του μεσόκολου.
 Η κατάσταση αυτή συνοδεύεται από υψηλό ποσοστό τοπικής υποτροπής της νόσου και έχει κακή πρόγνωση.

1.7. Πρόγνωση των ορθοκολικών όγκων

Η πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σχετίζεται άμεσα με το βαθμό διήθησης του τοιχώματος του παχέος εντέρου, τον βαθμό αποδιαφοροποίησης του ιστού, την κατάσταση των λεμφαδένων, και την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων [76]. Αυτές οι παράμετροι είναι τα κύρια χαρακτηριστικά όλων των συστημάτων σταδιοποίησης αυτής της νόσου. Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου και η πρώιμη ανίχνευση υποτροπής διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αποτελεσματική αντιμετώπισή του και επιτυγχάνονται με ενδοσκοπική εξέταση του παχέος εντέρου και του ορθοσιγμοειδούς [77, 78]. Λεμφαδένες διηθημένοι από τον καρκίνο και αυξημένα επίπεδα καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (carcinoembryonic antigen, CEA) στον ορό του αίματος, πριν τη λήψη οποιασδήποτε αγωγής, αποτελούν δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες [79].

Οι σπουδαιότεροι παράγοντες πρόγνωσης είναι η εξάπλωση του όγκου (προσδιορίζεται σύμφωνα με το σύστημα TNM) και η πιθανή παρουσία υπολειμματικού όγκου (R). Η τελευταία ταξινομείται ως εξής:

- R0: Απουσία υπολειμματικού όγκου
- R1: Μικροσκοπικά ανιχνεύσιμος υπολειμματικός όγκος
- R2: Μακροσκοπικός υπολειμματικός όγκος

- Μακροσκοπικός υπολειμματικός όγκος, που δεν επιβεβαιώνεται ιστολογικά.
- Μακροσκοπικός υπολειμματικός όγκος, που επιβεβαιώνεται και ιστολογικά.

Στην περίπτωση προχωρημένων και υψηλής κακοήθειας καρκινωμάτων, με μη πλήρη εξαίρεση του όγκου και παρουσία μεταστάσεων, η πρόγνωση των ορθοκολικών καρκινωμάτων παραμένει πάντα κακή. Τα ενδοτοιχωματικά λεμφικά αγγεία διατάσσονται κυρίως ως κυκλοτερή δίκτυα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με κλάδους που φέρονται ακτινοειδώς. Από αυτή την τοπογραφία των αγγείων γίνεται κατανοητό γιατί τα ορθοκολικά καρκινώματα επεκτείνονται κυρίως εγκάρσια σε σχέση με τον άξονα του εντέρου και έχουν την τάση να καταλαμβάνουν ζωνοειδώς το τοίχωμα. Η έκταση των λεμφογενών και αιματογενών μεταστάσεων συσχετίζεται με το βάθος διήθησης του καρκινώματος. Σε καρκινώματα pT1 (διήθηση του υποβλεννογόνου), ο κίνδυνος λεμφογενών μεταστάσεων ανέρχεται σε 12%. Σε καρκινώματα pT3, ο κίνδυνος μεταστάσεων υπολογίζεται γύρω στο 60%. Όσο περισσότεροι λεμφαδένες είναι διηθημένοι από τον όγκο, τόσο χειρότερη είναι η πρόγνωση και τόσο μεγαλύτερος είναι, επίσης, ο κίνδυνος μιας αιματογενούς μετάστασης στο ήπαρ, το οποίο είναι το προτιμώμενο όργανο-στόχος για αιματογενείς μεταστάσεις ορθοκολικών καρκινωμάτων (τύπου πυλαίας φλέβας).

1.8. Καρκινικοί δείκτες

Ο προσδιορισμός νεοπλασματικών δεικτών εντοπίζεται ιστορικά το 1848 με δύο σημαντικές ανακαλύψεις. Αυτές είναι η ανακάλυψη της μυελωματικής πρωτεΐνης από τον Bence-Jones και η ανακάλυψη της ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροφίνης από τους Ascheim και Zondek το 1928. Στο χρονικό διάστημα που παρεμβάλλεται των δύο αυτών ανακαλύψεων, κακοήθη νεοπλάσματα συνδέθηκαν κατά καιρούς με ποικίλλες βιοχημικές και ενδοκρινολογικές διαταραχές. Από το 1928 και ύστερα, πολλά πεπτίδια και πολλές πρωτεΐνες συσχετίσθηκαν με πολλά κακοήθη νεοπλάσματα [80].

Στην προσπάθεια να δοθεί ένας συνολικός ορισμός της έννοιας του καρκινικού δείκτη θα μπορούσαμε να πούμε ότι κάθε βιομόριο που παράγεται, είτε απ' ευθείας από τα κακοήθη κύτταρα, είτε από τα καλοήθη, ως απάντηση στην παρουσία κακοήθους εξεργασίας αποτελεί δείκτη καρκίνου. Οι καρκινικοί δείκτες ανιχνεύονται, κατά κύριο λόγο, σε σωματικά βιολογικά υγρά. Τις περισσότερες φορές, εμφανίζουν περιορισμένη ευαισθησία στην ταυτοποίηση κακοήθων νεοπλασμάτων, καθώς, συνήθως, εντοπίζονται σε

υγρά του σώματος και σε φυσιολογικές καταστάσεις ή ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα και σε μη κακοήθεις καταστάσεις [81, 82].

Οι κύριες κατηγορίες καρκινικών δεικτών είναι οι εξής [83]:

- Δείκτες κυτταρικού ρυθμού ανακυκλώσεως, όπως τα ένζυμα και ισοένζυμα LDH, PLAP, CK-BB,GT II, το σιαλικό οξύ, η φιμπρονεκτίνη και οι πολυαμίνες. Οι δείκτες αυτοί χρησιμεύουν στην εκτίμηση της μάζας του όγκου και στην παρακολούθηση ασθενών με εκτεταμένη νόσο.
- Δείκτες διαφοροποίησης, όπως τα ACP, PSA, HCG, NSE, SCC, 5-HIIA, οι κατεχολαμίνες, η καλσιτονίνη, ο sr IL-2. Σημαντική είναι η συμβολή των δεικτών αυτών στην αναγνώριση της εστίας του πρωτοπαθούς όγκου σε ασθενείς με εκτεταμένη μεταστατική νόσο. Σε μερικές περιπτώσεις αποτελούν προγνωστικούς δείκτες. Στον προληπτικό έλεγχο χρησιμοποιούνται σπάνια.
- Ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα, όπως τα CEA, AFP, CA 19-9, CA 125, CA 50, CA 15-3, TPA. Αυτοί οι δείκτες δεν διαθέτουν επαρκή ειδικότητα για χρήση σε προληπτικό έλεγχο του γενικού πληθυσμού, όμως τα πολύ υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεών τους είναι υπαινικτικά ύπαρξης κακοήθους όγκου.
- Δείκτες τραυματισμού οργάνου και απαντήσεως ξενιστή, όπως τα ένζυμα ALP, LDH, γGT και πρωτεΐνες οξείας φάσεως (β2-μικροσφαιρίνη, CRP, φερριτίνη, απτοσφαιρίνη, α2-μακροσφαιρίνη). Οι δείκτες αυτοί αυξάνονται ιδιαίτερα σε προχωρημένου βαθμού κακοήθεια και είναι ενδεικτικοί παρουσίας κακοήθειας όταν άλλα αίτια αυξήσεώς τους αποκλείονται.

1.8.1. Καρκινικοί δείκτες στην κλινική πράξη

Στην κλινική πράξη, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση των επιπέδων ενός καρκινικού δείκτη στον ορό, πολλές φορές προηγείται της τεκμηρίωσης της κλινικής υποτροπής, όπως αυτή γίνεται με τις κλασικές μεθόδους απεικόνισης κατά ένα χρονικό διάστημα της τάξης των τριών έως και οχτώ μηνών. Για τις περισσότερες περιπτώσεις που αφορούν κακοήθη συμπαγή νεοπλάσματα, ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί ότι η πρώιμη διάγνωση της υποτροπής βελτιώνει την πρόγνωση συγκεκριμένης ομάδας ασθενών [84].

Έχει, επίσης, καταστεί σαφές, ότι δεν είναι δυνατό να εντοπισθούν τύποι καρκίνου με βιολογική συμπεριφορά, που θα μπορούσε, ενδεχομένως, να ακολουθεί κάποιο κοινό μοτίβο. Συνεπώς, οι διαφορετικοί τύποι καρκίνου δεν εκφράζουν, τουλάχιστον κατά

κανόνα, απαραίτητα τον ίδιο δείκτη καρκίνου. Παράλληλα, κάθε ασθενής παρουσιάζει ένα εξατομικευμένο βασικό επίπεδο τιμών για τους διαφόρους καρκινικούς δείκτες [85].

Τέλος, η κατάλληλη επιλογή ενός καρκινικού δείκτη στην κλινική πράξη, πρέπει να γίνεται εξειδικευμένα βάσει συγκεκριμένων ιδιοτήτων, οι οποίες σχετίζονται με την ταυτοποίηση νεοπλασματικής κακοήθειας. Ένα όφελος, από ένα σύνολο που ιδεατά αποκομίζονται από τη χρήση καρκινικών δεικτών, είναι ο καθορισμός του κινδύνου αναπτύξεως κακοήθους νόσου. Επιπλέον, μια άλλη κατεύθυνση είναι η προσέγγιση της δυνατότητας για μαζικούς πληθυσμιακούς ελέγχους πρόληψης. Σημαντική είναι, επίσης, η συμβολή στην διαφορική διάγνωση νοσημάτων, η δυνατότητα πρόβλεψης της ανταπόκρισης του ασθενή στη θεραπεία καθώς και η ανίχνευση πρώιμης υποτροπής της νόσου. Από τους πιο σημαντικούς στόχους που τίθενται, επιπρόσθετα, είναι η δυνατότητα ακριβούς και συνεχούς παρακολούθησης, μέσω καρκινικών δεικτών, της πορείας της νόσου [84].

1.8.2. Καρκινικοί δείκτες και καρκίνος του παχέος εντέρου

Όσον αφορά τον καρκίνο το παχέος εντέρου, οι κυριότεροι καρκινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη κλινική πρακτική είναι το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο CEA (carcinoembryonic antigen), το υδατανθρακικό αντιγόνο CA 19-9 (carbohydrate antigen 19-9), το καρκινικό αντιγόνο CA 72-4 (cancer antigen 72-4) [86-88] και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου των ιστών PLAT (tissue plasminogen activator) [89]. Επίσης, έχουν περιγραφεί και άλλοι βιοδείκτες του καρκίνου του παχέος εντέρου με μικρότερη, όμως, προγνωστική αξία. Επίσης, δεν υπάρχουν ακόμα καλά καθιερωμένοι στην κλινική πράξη μοριακοί δείκτες ιστού, παρά τις πολυάριθμες σχετικές μελέτες.

1.8.2.1. Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)

Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο ανήκει στα αντιγόνα διαφοροποίησης τα οποία εκφράζονται κατά την κυτταρική ανάπτυξη. Αρχικά, εντοπίσθηκε σε αδενοκαρκινώματα του πεπτικού και αποδείχθηκε ότι αποτελεί συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας (με πρόσδεση γλυκοσυλοφωσφατιδυλοινοσιτόλης GPI), η οποία αλληλεπιδρά με τον μικροσκελετό του κυττάρου και μπορεί να ελευθερωθεί στον διάμεσο χώρο και στην συστηματική κυκλοφορία των ασθενών με νεοπλασίες, όπου ανιχνεύεται ανοσοχημικά. Το CEA αντιπροσωπεύει μεγάλη οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης με εξωκυττάριες δομές όμοιες των ανοσοσφαιρινών στην

υπεροικογένεια των οποίων ανήκει. Το CEA φαίνεται ότι έχει ρόλο διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης. Σχηματίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα και το αρχέγονο πάγκρεας ως αντιγόνο επιφανείας και εκκρίνεται στα σωματικά υγρά [90]. Επειδή κατά την καρκινική διήθηση και τις μεταστάσεις επιφέρονται μεταβολές στην κυτταρική προσκόλληση, θεωρείται ότι το CEA μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στη διαδικασία αυτή.

Η περιοχή τιμών 5-10 ng/ml θεωρείται οριακή, δεδομένου ότι καλύπτει φάσμα καλοήθων και κακοήθων παθήσεων, ενώ τιμές ≥ 20 ng/ml αποτελούν σαφή ένδειξη κακοήθους εξεργασίας. Αύξηση των συγκεντρώσεων του CEA παρατηρείται στους καπνιστές, και σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση του ήπατος, χρονία ενεργό ηπατίτιδα, αποφρακτικό ίκτερο μη κακοήθους αιτιολογίας, εκτεταμένη πολυποδίαση του εντέρου ή με φλεγμονώδεις νόσους του πεπτικού (ελκώδης κολίτιδα, νόσος του Crohn, εκκολπωματίτιδα, πεπτικό έλκος, χρόνια παγκρεατίτιδα) ή των πνευμόνων. Σημειώνεται ότι το ήπαρ είναι ο κύριος ιστός μεταβολισμού του CEA, επομένως καλοήθη ηπατικά νοσήματα τα οποία επηρεάζουν την ηπατική λειτουργία - και την κάθαρση του CEA - είναι δυνατόν να προκαλέσουν αύξησή του στον ορό [91]. Σε ασθενείς με ορθοκολικά καρκινώματα ο προσδιορισμός του CEA ορού συνιστάται με σκοπό τον καλύτερο προγραμματισμό της εγχείρησης και τη συμπλήρωση της ιστολογικής σταδιεκτίμησης [92]. Έως τώρα δεν υπάρχει απόδειξη ότι οφελούνται ασθενείς, οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε μετεγχειρητική συμπληρωματική χημειοθεραπεία με μόνο κριτήριο τις υψηλές προεγχειρητικές τιμές CEA ορού. Μη επάνοδος στα φυσιολογικά επίπεδα CEA ορού, μετά τη θεραπευτική εγχείρηση ορθοκολικού καρκινώματος πρέπει να θέτει σε αμφισβήτηση την ριζικότητα της παρέμβασης. Έχει επανειλημμένα αποδειχθεί σχέση τιμών CEA ορού και σταδίου νόσου. Ασθενείς με νόσο σταδίου Α κατά Dukes, έχουν αυξημένες τιμές του δείκτη σε ποσοστό <28%. Αντιστοίχως, ασθενείς με στάδιο Β και ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις</p> έχουν αυξημένο CEA ορού σε ποσοστά 45% και ≥65%. Αυξημένες τιμές για δεδομένο στάδιο νόσου συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση. Σε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε εξαίρεση μονήρους ηπατικής εστίας το CEA ορού θα πρέπει να προσδιορίζεται ανά δύο ή τρεις μήνες για τα πρώτα δύο χρόνια [93].

1.8.2.2. Το υδατανθρακικό αντιγόνο 19-9 (CA 19-9)

Το CA 19-9 είναι το αντιγόνο το οποίο προέρχεται από ανοσοποίηση ποντικιών BALB/c με την ανθρώπινη κυτταρική σειρά (SW1116) καρκινώματος του εντέρου και αντιδρά με το μονοκλωνικό αντίσωμα 1116 NS 19-9. Ο αντιγονικός καθοριστής του μορίου του CA 19-9 είναι μία σιαλυ-λιωμένη λακτο-Ν-φουκοπεντανόζη ΙΙ και συγκεκριμένα η 2,3-σιαλυλιωμένη μορφή της δομής Lewis a (Le^a) του συστήματος ανθρώπινων ομάδων αίματος κατά Lewis. Τα άτομα με φαινότυπο Le^{a.b.} συνιστούν περίπου το 5% του συνολικού πληθυσμού και δεν μπορούν να εκφράσουν το CA 19-9 και συνεπώς στη συγκεκριμένη μειοψηφία δεν έχει νόημα η χρήση του δείκτη. Το CA 19-9 υπερεκφράζεται στα αδενοκαρκινώματα του εντέρου και του παγκρέατος. Ανιχνεύεται σε εμβρυϊκούς ιστούς (σιελογόνους και δακρυϊκούς αδένες, αναπνευστική οδός, πάγκρεας, ήπαρ, στόμαχος, έντερο) και στους ενήλικες σε χαμηλές συγκεντρώσεις από τα επιθηλιακά κύτταρα του παγκρέατος, των σιελογόνων αδένων, του στομάχου, του ήπατος, του βλεννογόνου της ουροδόχου κύστεως και του παγκρεατικό, το γαστρικό, το αμνιακό, τα ούρα, ο σίελος, το γάλα, και η τραχηλική βλέννη [90]. Ο δείκτης CA 19-9 εμφανίζει τη μεγαλύτερη διαγνωστική ευαισθησία, ειδικότητα και προβλεπτική αξία στα καρκινώματα του παγκρέατος και των χοληφόρων πόρων.

Αυξημένες τιμές του δείκτη έχουν περιγραφεί στο 20-30% των ασθενών με καρκινώματα εντέρου αρχικού σταδίου, στο 75% επί μεταστατικής νόσου, και στο 40- 60% των ασθενών με προχωρημένο γαστρικό καρκίνωμα. Μη κακοήθεις καταστάσεις, όπως παγκρεατίτιδα, αποφρακτικός ίκτερος, κίρρωση του ήπατος, χρόνια ενεργός ηπατίτιδα, πρωτοπαθής χολική κίρρωση και κυστική ίνωση, μπορεί να συνοδεύονται από μικρή έως μέτρια αύξηση των επιπέδων του, τα οποία σπανιότατα ξεπερνούν τιμές 100 – 120 U/ml².

1.8.2.3. Το καρκινικό αντιγόνο 72-4 (CA 72-4)

Το αντιγόνο CA 72-4 ορίζεται ως το ειδικό αντιγόνο έναντι δύο Mab μονοκλωνικών αντισωμάτων: του CC 49, το οποίο είναι μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγονικού καθοριστή Tumour-Assosiated-Glycoprotein 72 (TAG 72) και του B 72.3, το οποίο είναι αντίστοιχο αντίσωμα. Το B 72.3 προέρχεται από ανοσοποίηση με μεταστατικά κύτταρα μαστού εμπλουτισμένα σε μεμβράνες, ενώ το CC 49 από ανοσοποίηση με κεκαθαρμένο TAG 72, ληφθέν από ξενομόσχευμα ανθρώπινου καρκινώματος του εντέρου. Αυξημένα επίπεδα του δείκτη CA 72-4 στον ορό έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με ποικίλα επιθηλιακά καρκινώματα, όπως στομάχου, ωοθηκών, μαστού, παγκρέατος και ορθού. Ο συνδυασμός του CA 72-4 και του CEA παρέχει σημαντική διαγνωστική πληροφορία και μεγαλύτερη ακρίβεια [94].

1.9. Θεραπευτική αγωγή του καρκίνου του παχέος εντέρου

Η βασική θεραπεία του εντοπισμένου καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η χειρουργική επέμβαση. Σε αρκετές περιπτώσεις αυτή συνδυάζεται με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Η θεραπεία που θα προταθεί θα εξαρτηθεί από το στάδιο του καρκίνου, δηλαδή το μέγεθος, την θέση και την επέκταση του όγκου. Ο ακριβής προσδιορισμός του σταδίου είναι συχνά εφικτός μόνο μετά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου και την ιστολογική εξέταση αυτού. Η αντιμετώπιση των ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο του ορθού έχει αλλάξει ριζικά την τελευταία δεκαετία, τόσο με την εισαγωγή της προεγχειρητικής ακτινοβολίας της περιοχής, όσο και με την εδραίωση της ολικής εκτομής του μεσοορθού ως χειρουργικής αντιμετώπισης [95].

Όταν τεθεί η διάγνωση του καρκίνου του ορθού από βιοψία ο ασθενής συνήθως παραπέμπεται σε εξειδικευμένη διατμηματική ομάδα ιατρών που ασχολείται με τον ορθοκολικό καρκίνο. Η ομάδα αυτή αποτελείται από Χειρουργό Παχέος Εντέρου, Κλινικό Ογκολόγο, Ακτινοθεραπευτή, Ακτινολόγο και Παθολογοανατόμο και έχει αποστολή της την διαχείριση του ασθενούς από την προεγχειρητική του αξιολόγηση, την διαγνωστική μεθοδολογία προσέγγισης, τη σταδιοποίηση και την επιλογή της αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής. Όσο πιο ακριβής είναι η προεγχειρητική αξιολόγηση του κινδύνου από την δακτυλική εξέταση του ορθού, την ενδοσκόπιση και τις απεικονιστικές εξετάσεις, τόσο πιο σωστά μπορεί η εξειδικευμένη ιατρική ομάδα να επιλέξει την πλέον αποτελεσματική θεραπευτική μέθοδο για τον κάθε ασθενή, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις πιθανότητες για θεραπεία με επιθετική αγωγή καθώς και την αυξημένη νοσηρότητα ή θνησιμότητα από αυτή.

1.9.1. Χειρουργική επέμβαση

Η μεγαλύτερη ανησυχία μετά την εγχείρηση για καρκίνο του ορθού είναι το υψηλό ποσοστό τοπικής υποτροπής, το οποίο κυμαίνεται από <10% έως 50%, με μέσο ποσοστό υποτροπής 29%. Η τοπική υποτροπή οφείλεται σε ατελή αφαίρεση του πρωτογενούς καρκίνου και έχει αποδειχθεί η συσχέτισή της με τη μικρότερη απόσταση μεταξύ του πρωτοπαθούς καρκίνου και της μεσοορθικής περιτονίας, που συχνά αναφέρεται ως περιμετρικό όριο εκτομής. Όσο μικρότερη είναι αυτή η απόσταση, τόσο υψηλότερο είναι το ποσοστό της τοπικής υποτροπής [96, 97]. Αν και η τοπική υποτροπή έχει μικρό αντίκτυπο στο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών έχει σημαντική επίδραση στην ποιότητα ζωής τους. Η

εισαγωγή της ολικής εκτομής του μεσοορθού (TME), δηλαδή της αφαίρεσης του ορθού και του μεσοορθικού λίπους κατά μήκος της μεσοορθικής περιτονίας, ως θεραπευτική χειρουργική προσέγγιση για τον πρωτοπαθή καρκίνο του ορθού, έχει μειώσει σημαντικά την πιθανότητα για τοπική υποτροπή σε λιγότερο από 10% σε ορισμένα κέντρα, ακόμη και χωρίς επαγωγική θεραπεία [98]. Επιπρόσθετα, σχετικά πρόσφατες τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη προεγχειρητικής ακτινοθεραπείας στα θεραπευτικά σχήματα αντιμετώπισης του καρκίνου του ορθού ελαττώνει τα ποσοστά τοπικής υποτροπής και αυξάνει την σχετιζόμενη με τον καρκίνο επιβίωση [99].

Ως εκ τούτου, τρεις υποομάδες ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν και να ταξινομηθούν ανάλογα με τον κίνδυνο που διατρέχουν για τοπική υποτροπή: α) οι ασθενείς χαμηλού κινδύνου, δηλαδή ασθενείς με πρώιμο ή επιφανειακό καρκίνο του ορθού που αντιμετωπίζεται αποκλειστικά με χειρουργική επέμβαση χωρίς καμία προηγούμενη θεραπεία, β) οι ασθενείς μέσης επικυνδυνότητας, δηλαδή ασθενείς με εγχειρήσιμο νεόπλασμα με ευρύ περιμετρικό όριο εκτομής, οι οποίοι θα ωφεληθούν από βραχύ σχήμα ακτινοθεραπείας και χειρουργική αντιμετώπιση και γ) οι ασθενείς υψηλού κινδύνου, δηλαδή ασθενείς καρκίνο καρκίνο και στενό ή επηρεασμένο περιμετρικό όριο εκτομής, που θα ωφεληθούν από ένα μακρύ σχήμα χημειοακτινοθεραπείας πριν από τη χειρουργική επέμβαση [100].

1.9.1.1. Ακτινοβολία

Ο κύριος ρόλος του ακτινολόγου είναι ο εντοπισμός των παραπάνω ομάδων ασθενών που μπορούν να προσδιοριστούν και να ταξινομηθούν ανάλογα με τον κίνδυνο που διατρέχουν για τοπική υποτροπή της απεικόνισης πριν από τη θεραπεία, έτσι ώστε να μπορεί να σχεδιαστεί αποτελεσματικά η περαιτέρω διαχείριση του ασθενούς, ανάλογα με τον κίνδυνο τοπικής υποτροπής. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εντοπισμό ασθενών στον απεικονιστικό έλεγχο για τους οποίους αναγνωρίζονται παράγοντες κινδύνου με κακή πρόγνωση. Ο ακτινολόγος οφείλει να προσδιορίσει αν ο καρκίνος είναι χειρουργήσιμος, ή πρωτογενώς ανεγχείρητος. Ο ακτινοθεραπευτής-ογκολόγος πρέπει να έχει πολύ καλή γνώση της ανατομίας της περιοχής, της φυσικής πορείας της νόσου αλλά και των ανατομικών απεικονιστικών μεθόδων όπως η αξονική τομογραφία ή η μαγνητική και η ποζιτρονιακή τομογραφία (PET-CT). Η πολύπλευρη προσέγγιση του καρκίνου του ορθού με τα φάρμακα νέας τεχνολογίας και τις βιολογικά στοχευμένες θεραπείες συνεπάγεται και αθροιστικές παρενέργειες. Ως εκ τούτου, προκύπτει η αναγκαιότητα του ακριβέστερου προσδιορισμού του στόχου με τη μέγιστη δυνατή προστασία των υγιών ιστών για μειωμένη τοξικότητα και υψηλές θεραπευτικές συνολικές δόσεις [101].

1.9.1.2. Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία συνίσταται στην χρήση φαρμάκων τα οποία καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα. Συνήθως, τα φάρμακα χορηγούνται ενδοφλέβια ή από το στόμα. Από τη στιγμή που θα περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος, διανέμονται σε όλο το σώμα. Η χημειοθεραπεία, συνεπώς, είναι μία συστηματική θεραπεία.

Η εφαρμογή της αντινεοπλασματικής χημειοθεραπείας συνδέεται στενά με τη γνώση της φαρμακοκινητικής, αλλά και της κυτταροκινητικής των όγκων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αποτελεί τη βάση του μηγανισμού της αύξησης των όγκων και η γνώση των παραμέτρων που τον διέπουν διευκολύνει την κατανόηση της αντινεοπλασματικής θεραπείας [102]. Τα κυτταροτοξικά φάρμακα, ανάλογα με τη δράση τους ή όχι σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου, διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: φάρμακα που δρουν σε μια συγκεκριμένη φάση, ειδικά της φάσης (phase specific drugs), και φάρμακα που δρουν σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου, μη ειδικά της φάσης (phase nonspecific drugs) [103]. Τα περισσότερα κυτταροτοξικά της πρώτης ομάδας δρουν μέσω καταστροφής του DNA. Η τοξικότητά τους είναι μεγαλύτερη κατά τη διάρκεια της φάσης S της σύνθεσης του DNA. Άλλα φάρμακα, όπως οι ταξάνες, δεσμεύονται στη μιτωτική άτρακτο κατά τη φάση Μ του κυτταρικού κύκλου. Παραδείγματα φαρμάκων τα οποία είναι δραστικά σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι τα εξής: γλυκοκορτικοειδή και στεροειδείς ορμόνες στη φάση G0, L-ασπαραγινάση στη φάση G1, αντιμεταβολίτες στη φάση S, μπλεομυκίνη και αλκαλοειδή στη φάση G2, αλκαλοειδή στη φάση M. Στη δεύτερη ομάδα, όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως, ανήκουν αλκυλιωτικά, νιτροζουρίες, αντιβιοτικά (πλην της μπλεομυκίνης), προκαρβαζίνη, δακαρβαζίνη και σισπλατίνη [104]. Η ευαισθησία ενός όγκου είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Άρα, η ευαισθησία είναι μεγάλη κατά την εκθετική αύξηση του όγκου. Όμως, οι περισσότεροι όγκοι κατά τη στιγμή της διάγνωσης βρίσκονται στην αρχή ενός «πλατώ», γι' αυτό και η κυτταροκινητική ευαισθησία τους είναι σχετικά χαμηλή. Όλα τα κυτταροστατικά προκαλούν παρενέργειες ανάλογα με τον τύπο του φαρμάκου, πρώιμες ή όψιμες. Σε γενικές γραμμές, τα αντικαρκινικά σκευάσματα καταστρέφουν κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται ταχύτατα. Για το λόγο αυτό, από τη χημειοθεραπεία επηρεάζονται εκτός των καρκινικών κυττάρων και κύτταρα

του αίματος και κάποια άλλα. Οι πιο συχνές παρενέργειες είναι η αναιμία, η αδυναμία, οι εύκολοι μωλωπισμοί του δέρματος και η χαμηλή αντίσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης, τα κύτταρα των θυλάκων των τριχών και του βλεννογόνου του εντέρου – που πολλαπλασιάζονται ταχύτατα – επηρρεάζονται εύκολα από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Γι' αυτό η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει απώλεια των μαλλιών, έλκη στη στοματική κοιλότητα, ναυτία, εμέτους και διάρροιες. Οι παρενέργειες απαιτούν κατάλληλη νοσηλευτική αντιμετώπιση. Η χημειοθεραπεία είναι μια επιλογή θεραπευτικού χειρισμού του καρκίνου που στοχεύει, κυρίως, στην κατά το δυνατό μείωση της πιθανότητας να εμφανιστούν μεταστάσεις, καθώς και στη συρρίκνωση τόσο του όγκου όσο και του ρυθμού ανάπτυξής του.

Συνήθως, η χημειοθεραπεία είναι συμπληρωματική θεραπεία. Μπορεί να εφαρμόζεται μετεγχειρητικά ή προεγχειρητικά. Μπορεί, επίσης, να εφαρμόζεται ως παρηγορητική θεραπεία. Η έννοια της παρηγορητικής θεραπείας συνίσταται στο εξής: εάν η περίπτωση ασθενούς με ορθοκολικό καρκίνο χαρακτηριστεί ανεγχείρητη λόγω της τοπικής διασποράς, των πολλαπλών μεταστάσεων ή της γενικευμένης νόσου, τότε θα πρέπει ο κλινικός ιατρός να προβεί σε ανακουφιστική επέμβαση για να αντιμετωπίσει διάφορα προβλήματα, όπως η εντερική απόφραξη, η διάτρηση, η τοπική ή η γενικευμένη σήψη, η αιμορραγία και ο πόνος. Σ'αυτές τις περιπτώσεις, η παρηγορική θεραπεία βελτιώνει ή ελέγχει αυτά τα προβλήματα. Όσον αφορά τον ορθοκολικό καρκίνο, η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία εφαρμόζεται μόνο στην περίπτωση που ο κακοήθης όγκος έχει διηθήσει τους λεμφαδένες [104].

Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, η συμπληρωματική χημειοθεραπευτική αγωγή μετεγχειρητικά περιλαμβάνει τη χορήγηση συνδυασμού των αντικαρκινικών παραγόντων 5-φθοροουρακίλη ή καπεσιταμπίνη (Xeloda), λευκοβορίνη (Φολινικό οξύ) και οξαλιπλατίνη (Eloxatin) [10]. Στην περίπτωση κατά την οποία υπάρχει μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου, τα πλέον συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα περιλαμβάνουν έναν συνδυασμό χορήγησης 5-φθοροουρακίλης και λευκοβορίνης, σε συνδυασμό με οξαλιπλατίνη (θεραπευτικό σχήμα FOLFOX) ή ιρινοτεκάνη (θεραπευτικό σχήμα FOLFIRI), μαζί με το μονοκλωνικό αντίσωμα Bevacizumab (Avastin). Αναλυτικότερα, χορηγούνται οι αντινεοπλαστικοί παράγοντες 5-φθοροουρακίλη ή καπεσιταμπίνη (Xeloda), ιρινοτεκάνη (Camptosar), Tegafur-ουρακίλη (UFT), λευκοβορίνη (Φολινικό $o\xi \dot{\upsilon}$), $o\xi \alpha \lambda i \pi \lambda \alpha \tau i \nu \eta$ (Eloxatin), bevacizumab (Avastin), cetuximab (Erbitux), panitumumab (Vectibix) [105]. Νέα δεδομένα για τη χορήγηση bevacizumab στην αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, ανακοινώθηκαν στο

συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας για τον Καρκίνο Παχέος Εντέρου (ASCOGI) το 2010.

Η φθοροουρακίλη (5-φθοροουρακίλη, εμπορικά ονόματα: Adrucil, Carac, Efudix, Efudex, και Fluoroplex) είναι ένα ανάλογο πυριμιδίνης, το οποίο μπλοκάρει τη σύνθεση της θυμιδίνης μέσω της παρεμπόδισης της θυμιδιλικής συνθάσης [106]. Η φθοροουρακίλη συνήθως χορηγείται σε συνδυασμό με λευκοβορίνη, η οποία μεταβολίζεται σε μεθυλενοτετραϋδροφολικό, μια ουσία που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της κατεργασίας των κυττάρων με φθοροουρακίλη [107].

Η οξαλιπλατίνη (εμπορική ονομασία: Eloxatin) είναι ένας αντινεοπλαστικός παράγοντας που έχει ως βάση το λευκόχρυσο. Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με φθοροουρακίλη και λευκοβορίνη (φολινικό οξύ) κατά του προχωρημένου ορθοκολικού καρκίνου. Σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, η οξαλιπλατίνη επάγει την έκφραση του *PUMA* τόσο εξαρτώμενα από την p53 όσο και ανεξάρτητα από αυτή. Σε κύτταρα HCT 116, η επίδραση με οξαλιπλατίνη προκάλεσε την υπερέκφραση της p53 και των p53εξαρτώμενων BAX και BCLX_L, καθώς και την συσσώρευση της πρωτείνης p21 (CDKN1A) [108]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί έναν αναστολέα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs), παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη φάση S της αντιγραφής του DNA και στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Η p21 (CDKN1A) κόβεται πρωτεολυτικά από την κασπάση 3, οδηγώντας έτσι σε μια θεαματική αύξηση της CDK2, γεγονός καθοριστικό για την εκτέλεση της απόπτωσης.

Η γεμσιταβίνη (εμπορική ονομασία Gemzar) είναι ένα ανάλογο πυριμιδίνης, το οποίο μπλοκάρει την ενζυμική ενεργότητα της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων και ως εκ τούτου την παραγωγή των δεοξυριβονουκλεοτιδίων που απαιτούνται για τη σύνθεση DNA και τον κυτταρικό διπλασιασμό. Ως αποτέλεσμα, επάγεται η απόπτωση [109]. Η γεμσιταβίνη δρα συνεργιστικά όταν συνδυάζεται με διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Για παράδειγμα, η συγχορήγηση ευγενόλης και γεμσιταβίνης επάγει αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση έναντι καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, καταστέλλοντας σημαντικά την έκφραση του γονιδίου BCL2 [110].

Η δοσεταξέλη (εμπορικό όνομα: Taxotere) είναι ένα ημισυνθετικό ανάλογο της πακλιταξέλης, και χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του προχωρημένου καρκίνου της γαστροοισοφαγικής συμβολής, του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου, του ανδρογόνο-ανεξάρτητου μεταστατικού καρκίνου του προστάτη, ενώ επίσης είναι υπό έρευνα για την θεραπευτική αντιμετώπιση και άλλων κακοηθειών [111]. Η

αντινεοπλασματική δράση του ασκείται μέσω της αναστολής του αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και την φωσφορυλίωση της BCL2, προωθώντας έτσι έναν καταρράκτη ενδοκυττάριων γεγονότων που τελικά οδηγεί σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο [112-114].

Η σισπλατίνη (εμπορική ονομασία: Platin) ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας των αντικαρκινικών φαρμάκων που είναι βασισμένα στο λευκόχρυσο, μια κατηγορία φαρμάκων που περιλαμβάνει επίσης την καρβοπλατίνη και την οξαλιπλατίνη, όπως προαναφέρθηκε. Αυτή η ουσία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένων των σαρκωμάτων, του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου των ωοθηκών, των λεμφωμάτων και των όγκων βλαστικών κυττάρων [115].

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες σισπλατίνη, δοσεταξέλη και γεμσιταβίνη δε χρησιμοποιούνται στη συστημική θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Αποτέλεσαν μέρος της μελέτης στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ως μία προτεινόμενη νέα θεραπευτική προσέγγιση για τη συγκεκριμένη νόσο.

1.10. Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες

Ο όρος "καλλικρεΐνη" (ετυμολογικά προερχόμενος από την ελληνική λέξη για το πάγκρεας), αποδόθηκε, από τους Kraut, Frey και Werle, το 1930 [116, 117]. Αυτοί εντόπισαν, για πρώτη φορά, σε μεγάλη συγκέντρωση στο πάγκρεας, μία ουσία η οποία είχε απομονωθεί σε δείγμα ούρων και είχε περιγραφεί ως υποτασιογόνος. Ο Werle και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν την καλλικρεΐνη ως ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, και την ονόμασαν καλλικρεΐνη 1 (KLK1), επτά χρόνια μετά. Ο ορισμός του ονόματος βασίστηκε στο γνώρισμα των καλλικρεΐνών να μπορούν να απελευθερώνουν κινίνες (αγγειοδραστικά πεπτίδια) από το κινινογόνο. Η ανθρώπινη KLK1 επιδρά σε ένα ηπατικό κινινογόνο, με στόχο την απελευθέρωση λυσυλβραδυκινίνης (ή αλλιώς καλλιδίνης). Η λυσυλβραδικινίνη συμμετέχει στον έλεγχο της πίεσης του αίματος, της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας, της φλεγμονώδους απόκρισης, αλλά και σε άλλες φυσιολογικές διαδικασίες. Η KLK1, επιπρόσθετα, έχει τη δυνατότητα πέψης και διαφορετικού τύπου υποστρωμάτων.

Η οικογένεια γονιδίων των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών είναι η μεγαλύτερη συνεχόμενη γονιδιακά οικογένεια πρωτεασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, πρόκειται για σερινοπρωτεάσες, πρωτεάσες, δηλαδή, που δρουν μέσω ενός μοναδικού ενεργοποιημένου κατάλοιπου σερίνης στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, αλληλεπιδρώντας μη αντιστρεπτά με διισοπροπυλφθοροφωσφορικό (DFP) προς τον

σχηματισμό ενός φωσφορικού εστέρα. Καλλικρεΐνες έχουν ανιχνευτεί σε πολλούς ιστούς και έχουν, επίσης, απομονωθεί από βιολογικά υγρά [118].

Έως τα μέσα της δεκαετίας του '90 πιστευόταν πως η οικογένεια των καλλικρεϊνών αποτελείται από τρία, μόλις, μέλη και τα αντίστοιχά τους γονίδια. Αυτά τα τρία ένζυμα που αναγνωρίσθηκαν πρώτα είναι τα εξής: η καλλικρεΐνη 1 (KLK1), η καλλικρεΐνη 2 (KLK2) και η καλλικρεΐνη 3 (KLK3 ή PSA, prostate-specific antigen) [119]. Από τα τρία αυτά μέλη με τον κλασικό ορισμό συμφωνεί μόνο η καλλικρεΐνη 1. Αργότερα, το 1995, κλωνοποιήθηκαν δύο νέα μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων καλλικρεϊνών. Αυτές οι νέες καλλικρεΐνες 6 και 10 ονομάστηκαν πρωτεάση Μ [120] και NES1 [121], αντίστοιχα. Η καλλικρεϊνη KLK6 ή πρωτεάση Μ και η καλλικρεΐνη KLK10 ή NES1, λοιπόν, προστέθηκαν και αυτές στην οικογένεια.

Οι καλλικρεΐνες εκφράζονται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και εμπλέκονται σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών, όπως η φυσική απολέπιση του δέρματος, η υγροποίηση του σπέρματος, η νευρική πλαστικότητα και η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Ο γενετικός τόπος της οικογένειας κωδικοποιεί και τα 15 μέλη της, εκ των οποίων τα 13 έχουν αναφερθεί ως πιθανοί βιοδείκτες για πολλές περιπτώσεις καρκινωμάτων, αλλά και άλλων μη-νεοπλασματικών ασθενειών. Πολλές είναι οι αιτίες που δικαιολογούν την αναγκαιότητα της μελέτης των πρωτεασών ως καρκινικούς βιοδείκτες. Αρχικά, μία πλειάδα χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των καρκινικών κυττάρων, όπως ο ανώμαλος κυτταρικός πολλαπλασιασμός ή η εισβολή σε γειτονικούς ιστούς και η μετάσταση μέσω αποδόμησης των εξωκυττάριων συστατικών, θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαδικασίες πρωτεόλυσης [122]. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα των καλλικρεϊνών θεωρείται ότι εμπλέκεται σε πλειάδα ενζυμικών καταρρακτών. Όλα αυτά θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Σημειώνεται, ότι στο κείμενο με το όνομα KLK θα αναφέρεται το πρωτεϊνικό παράγωγο, ενώ με πλάγια γράμματα θα αναφέρεται το όνομα του αντίστοιχου γονιδίου.

1.10.1. Φυσιολογικές λειτουργίες των καλλικρεϊνών

Οι καλλικρεΐνες εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, οι οποίες κυμαίνονται από το επίπεδο της κυτταρικής ομοιόστασης έως αυτό του ανασχηματισμού του ιστού. Η KLK1 πιστεύεται ότι διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο σε ένα μεγάλο αριθμό διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένου της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης, της ομαλής σύσπασης των μυών, του χημειοτακτισμού των ουδετερόφιλων και της επαγωγής του πόνου, μέσω σηματοδοτικού μονοπατιού κινίνης, ενώ μπορεί να λειτουργήσει ανεξάρτητα

από το σηματοδοτικό μονοπάτι κινίνης, για παράδειγμα, μέσω αλληλεπίδρασης με αυξητικούς παράγοντες. Οι KLK2, KLK3, KLK5 και KLK11 εμπλέκονται σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες στο σπερματικό πλάσμα. Αυτά τα ένζυμα είναι κρίσιμα για την υγροποίηση του σπέρματος, μέσω μιας επεξεργασίας με τη μεσολάβηση των σεμενογελινών Ι και ΙΙ [123]. Επιπλέον, η KLK5 έχει εντοπισθεί ως μέρος του πρωτεολυτικού καταρράκτη της διαδικασίας απολέπισης του δέρματος, με τη μεσολάβηση των καθελικιδινών [124, 125]. Με βάση το πρότυπο έκφρασης, την αναγνώριση του υποστρώματος και τη λειτουργία ορθόλογων πρωτεϊνών, έχουν προταθεί πιθανές λειτουργίες για τις υπόλοιπες καλλικρεΐνες. Για παράδειγμα, η KLK4 πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην επεξεργασία αδαμαντινογένεσης [126]. Οι KLK6, KLK10 και KLK13 εμπλέκονται στην ενεργοποίηση πολλών προορμονών στις νήσους Langerhans του παγκρέατος, ενώ οι KLK6 και KLK8 παίζουν ρόλο στις διαδικασίες μυελίνωσης και συναπτογένεσης στο κεντρικό νευρικό σύστημα [127].

1.10.2. Πρωτεϊνική δομή των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών

Κάθε πρωτεΐνη της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών, εκφράζεται ως μία μονή αλυσίδα με δραστικότητα πρωτεάσης σερίνης, η οποία περιλαμβάνει ένα σήμα οδηγό το οποίο αποκόπτεται από το Ν-τελικό άκρο της πρωτεΐνης πριν την έκκριση. Η παραγωγή των καλλικρεϊνών, λοιπόν, γίνεται υπό την ανενεργή μορφή προ-προενζύμου. Οι προ-KLKs πιστεύεται ότι ενεργοποιούνται ύστερα από διάσπασή τους μετά από ένα αμινοξύ αργινίνης ή λυσίνης, με την εξαίρεση της προ-KLK4. Οι ώριμες, πια, καλλικρεΐνες περιέχουν μία συντηρημένη καταλυτική τριάδα, η οποία αποτελείται από ένα κατάλοιπο ιστιδίνης, ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος και μία σερίνη (H-D-S). Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών πιστεύεται πως επιτυγχάνεται, εν μέρει, μέσω πέντε ή έξι δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης [128].

Η πρωτεϊνική δομή πολλών καλλικρεϊνών έχει διασαφηνιστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ [129-131]. Από τα πρώτα, ήδη, εξαχθέντα αποτελέσματα έγινε σαφές ότι οι καλλικρεΐνες μοιράζονται κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά, τα βασικότερα εκ των οποίων είναι δύο αλληλεπιδρόντα β-βαρέλια και α-έλικες. Αυτά τα δομικά στοιχεία συνδέονται δια μέσου του ενεργού κέντρου και των δισουλφιδικών δεσμών. Δομική μοντελοποίηση σύγκρισης δείχνει ότι ο πρωτεϊνικός πυρήνας όλων των γνωστών δομικά καλλικρεϊνών είναι κοινός, ενώ οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις λαμβάνουν χώρα στα εκτεθειμένα πρωτεϊνικά τμήματα. Έχει δειχθεί, ότι η KLK1 περιλαμβάνει έναν

επιπρόσθετο βρόγχο, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργική ειδικότητα της πρωτεΐνης. Ο βρόγχος αυτός έχει εντοπισθεί ως δομικό στοιχείο και στις άλλες δύο καλλικρεΐνες που αναγνωρίσθηκαν αρχικά, στην KLK2 και στην KLK3, ενώ εντοπίζεται παραλλαγμένος στις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας. Για παράδειγμα, στην KLK10 ο βρόγχος αυτός εμφανίζεται μεγαλύτερος, προεξέχων της αύλακας πρόσδεσης του υποστρώματος. Επιπλέον, επιπρόσθετοι επιφανειακοί βρόγχοι γύρω από τα μοτίβα πρόσδεσης στο υπόστρωμα θα μπορούσαν να ελέγχουν την ενζυμική δραστικότητα και να καθορίζουν τη λειτουργική ειδικότητα. Γενικά, ο βαθμός ομοιότητας σε πρωτεΐνικό επίπεδο ανάμεσα στις κλασικές καλλικρεΐνες KLK1, KLK2 και KLK3 είναι περίπου 80%, ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από το ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στις κλασικές τις νεότερες καλλικρεΐνες (30-50%). Επιπλέον, οι νέες καλλικρεΐνες εκτός από την 13 έχουν έξι δισουλφιδικούς δεσμούς, σε αντίθεση με τους πέντε δεσμούς των κλασικών καλλικρεϊνών. Τέλος, οι δυο από τις τρεις κλασικές καλλικρεΐνες (KLK2, KLK3) δεν έχουν ορθόλογες πρωτεΐνες στα τρωκτικά, ενώ οι νέες καλλικρεΐνες έχουν.

1.10.3. Ενζυμική ρύθμιση της δράσης των καλλικρεϊνών

Όπως αναφέρθηκε, οι καλλικρεΐνες παράγονται ως προ- προένζυμα. Η σηματοδοτική αλληλουχία στο N- τελικό άκρο εμποδίζει την ενεργοποίηση του ενζύμου πριν την έκκριση του, όταν και αυτή αποκόπτεται. Η N- τελική αμινοξική αλληλουχία φαίνεται να εμπλέκεται και στη δομική σταθερότητα του προενζύμου εντός του κυττάρου. Στη συνέχεια, όλα τα καλλικρεϊνικά προένζυμα, εκτός από την KLK4, ενεργοποιούνται μετά από πέψη του καρβοξυτελικού άκρου μίας συγκεκριμένης αργινίνης ή λυσίνης, κάτι που υποδεικνύει ότι στην ενεργοποίηση παίζουν ρόλο ένζυμα με δραστικότητα τρυψίνης [132, 133]. Για μερικά καλλικρεϊνικά πρωτεϊνικά μόρια έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να αυτοενεργοποιούνται, δεδομένου ότι είναι ένζυμα ανάλογα τρυψίνης (και όχι, για παράδειγμα, χυμοθρυψίνης, όπως η KLK3 ή η KLK9) [134-136].

Μία γενική οδός ελέγχου των καλλικρεϊνών είναι η εσωτερική πέψη των πρωτεϊνικών μορίων και η επακόλουθη αποικοδόμησή τους. Έχουν αναφερθεί πλειάδα περιπτώσεων όπου καλλικρεΐνες αυτοαποικοδομούνται. Μία άλλη γενική οδός αναστολής των καλλικρεϊνών μπορεί να είναι η πρόσδεση σε σερπίνες, ένζυμα τα οποία ονομάστηκαν έτσι λόγω της ιδιότητας που έχουν να δρουν ως αναστολείς πρωτεασών σερίνης (serpins: SERine Protease, Inhibitors). Σε πληθώρα μελετών που έχουν διεξαχθεί έχει παρατηρηθεί

σχηματισμός συμπλόκων καλλικρεϊνικών πρωτεϊνικών μορίων με τέτοιου είδους αναστολείς [137-139].

Οι πρωτεΐνες με δράση πρωτεάσης φαίνεται πως ενεργοποιούνται συχνά, αν όχι κατά κανόνα, ως μέρος πρωτεολυτικών καταρρακτών [140], οι οποίοι, ως γνωστόν, ρυθμίζονται μέσω πλειάδας βρόγχων ανάδρασης και πληθώρας αναστολέων. Οι ρυθμιστικές αυτές λειτουργίες εντός ενός πρωτεολυτικού καταρράκτη είναι μείζονος σημασίας, δεδομένου του μη αναστρέψιμου χαρακτήρα της ενεργοποίησής του. Κατά αυτήν την έννοια, και οι καλλικρεΐνες, ως πρωτεάσες, φάινεται να υπόκεινται σε τέτοιου είδους ρύθμιση [124, 141, 142].

1.10.4. Εξειδίκευση υποστρώματος των καλλικρεϊνών

Η εξειδίκευση υποστρώματος της συντριπτικής πλειοψηφίας των καλλικρεϊνικών ενζύμων έχει καθορισθεί πειραματικά με χρήση πληθώρας τεχνικών [143, 144]. Ως υποομάδα της μεγάλης οικογένειας των σερινοπρωτεασών, οι καλλικρεΐνες υδρολύουν τα υποστρώματα που αποτελούν στόχους τους, μέσω μίας «επίθεσης», η οποία κατευθύνεται από τα ενεργά κατάλοιπα σερίνης: η υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού-στόχου ξεκινά από το άτομο οξυγόνου της υδροζυλικής ομάδας του καταλοίπου σερίνης, το οποίο επιτίθεται στο καρβονυλικό άτομο αλθρακα του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού. Ταυτόχρονα, η σερίνη μεταφέρει ένα πρωτόνιο στο κατάλοιπο ιστιδίνης της καταλυτικής τριάδας, και μετά στο άτομο του αζώτου του επιδεκτικού πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος στη συνέχεια πέπτεται και απελευθερώνεται. Το υπόλοιπο τμήμα του υποστρώματος είναι πλέον ομοιοπολικά συνδεδεμένο στη σερίνη μέσω εστερικού δεσμού. Στη συνέχεια, το κατάλοιπο της ιστιδίνης απομακρύνει ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού και το υδροζυλικό ιόν επιτίθεται στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα της ακυλομάδας, η οποία ήταν συνδεδεμένη στη σερίνη, η ιστιδίνη γίνεται δότης ενός πρωτονίου στο άτομο οξυγόνου της σερίνης και τελικά απελευθερώνει το οξικό συστατικό του υποστρώματος.

Όπως συμβαίνει και σε άλλες σερινοπρωτεΐνες, η προτίμηση του υποστρώματος σχετίζεται και μπορεί, ενδεχομένως, να προβλεφθεί βάσει της πλευρικής αμινοξικής αλυσίδας που περιβάλλει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τύποι υποστρωμάτων, που έχουν καταγραφεί, είναι αγγειοενεργά πεπτίδια, αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες κ.α. Η πλειονότητα των καλλικρεϊνικών ενζύμων, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζουν ειδικότητα υποστρώματος ανάλογη τρυψίνης, ενώ οι KLK3, KLK7 και KLK9 παρουσιάζουν ειδικότητα των καλλογη χυμοθρυψίνης. Δοκιμές in vitro υποδεικνύουν ότι τα

πρωτεϊνικά μόρια KLK10, KLK11 και KLK14 εμφανίζουν διφορούμενη ειδικότητα [145, 146].

1.10.5. Συμμετοχή των καλλικρεϊνών σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες

Λόγω του γεγονότος, ότι οι πρωτεάσες, συνήθως, συντίθεται ως ανενεργά προένζυμα, χρειάζεται περιορισμένη ειδική πρωτεόλυση για να ενεργοποιηθούν. Οι καλλικρείνες, ως πρωτεάσες, ενεργοποιούνται, τουλάχιστον εν μέρει ως μέρος πρωτεολυτικών καταρρακτών, με πολλά επι μέρους σηματοδοτικά μονοπάτια. Προς αυτήν την κατεύθυνση δείχνει και το γεγονός της ταυτόχρονης έκφρασης πολλαπλών καλλικρεϊνών σε συγκεκριμένους ιστούς, η ταυτόχρονη επαγωγή ή καταστολή γονιδίων κατά τα διαδοχικά καρκινικά στάδια καθώς και το εύρημα πως ορισμένες καλλικρεϊνικές πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν άλλες που βρίσκονται υπό τη μορφή προενζύμου.

Η σηματοδότηση μέσω πρωτεϊνών με δράση κινίνης έχει μελετηθεί πολύ στο παρελθόν [147]. Πιο συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι οι καλλικρεΐνες 1, 2 και 12 απελευθερώνουν κινίνες, όπως η βραδυκινίνη και η καλλιδίνη, από το κινινογόνο. Οι κινίνες, με τη σειρά τους, δρουν ως μεσάζοντες μεταφέροντας σήματα έχοντας πολλούς στόχους. Όλοι οι μηχανισμοί καλλικρεΐνης-κινίνης ενορχηστρώνουν ένα ευρύ φάσμα διαδικασίών, οι οποίες έχουν εκτενώς προαναφερθεί. Επιπλέον, πρωτείνες που μπορούν να ενεργοποιηθούν από καλλικρείνες στο πλαίσιο ενός πρωτεολυτικού καταρράκτη είναι οι τύποι υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (protease-activated receptors: PARs), συνδέονται με G- πρωτεΐνες και ενεργοποιούνται μέσω αποκοπής του αμινοτελικού τους άκρου [148].

1.10.6. Η γονιδιακή οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών

Οι διαφορετικές αμινοξικές αλληλουχίες που μεταφράζονται από τα διαφορετικά γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια των καλλικρεϊνών, εμφανίζουν χαρακτηριστική ομοιότητα, η οποία αντιστοιχεί και σε ομοιότητα στη δομή των γονιδίων [149]. Όλα τα γονίδια της οικογένειας εντοπίζονται στη χρωμοσωματική περιοχή 19q13.4 [150].

Μέσω του Προγράμματος Προσδιορισμού του Ανθρωπίνου Γονιδιώματος (Human Genome Project, HGP) και με εργαλείο όλες τις πρωτοποριακές μεθόδους ανάλυσης αλληλουχιών γενετικού υλικού της βιοπληροφορικής, κατέστη δυνατός ο εντοπισμός του γενετικού τόπου όπου φαίνεται να βρίσκονται τα γονίδια της οικογένειας των ανθρώπινων

καλλικρεϊνών. Ο γενετικός τόπος που χαρτογραφήθηκε εντοπίστηκε, όπως αναφέρθηκε, στη χρωμοσωματική περιοχή 19q13.4 και περιέχει 15 γονίδια διευθετημένα στη σειρά σε μία περιοχή περίπου 300 kb, χωρίς παρεμβολή άλλων γονιδίων. Το μήκος των γονιδίων είναι σχετικά μικρό, ποικίλοντας από 4 έως 10 kb [151]. Τα γονίδια που γειτνιάζουν της περιοχής που χαρτογραφούνται τα γονίδια της οικογένειας των καλλικρεϊνων δεν παρουσιάζουν καμία δομική ή λειτουργική σχέση με τις ανθρώπινες καλλικρεΐνες. Το 2003 ταυτοποιήθηκε ένα ψευδογονίδιο, το οποίο φαίνεται να παρεμβάλλεται στις καλλικρεϊνικές γονιδιακές αλληλουχίες [152].

Οι τρεις κλασικές καλλικρεΐνες KLK1, KLK3, και KLK2 εντοπίζονται μαζί εντός μίας περιοχής 60 kb, όπως έχει περιγραφεί από τον Riegman [153], τον Richards [154] και τους συνεργάτες τους. Ένα γονίδιο, το KLK15, εντοπίστηκε αργότερα κατά τη χαρτογράφηση ανάμεσα στα γονίδια KLK1 και KLK2 [155]. Τα υπόλοιπα γονίδια των καλλικρεϊνών βρίσκονται τοποθετημένα στη σειρά μετά το πέρας αυτής της περιοχής.

Τα γονίδια της οικογένειας των ανθρώπινων καλλικρεϊνών εμφανίζουν 40-80% ομολογία στην πολυνουκλεοτιδική και αμινοξική τους αλληλουχία και μοιράζονται ορισμένες κοινές ιδιότητες, οι οποίες τα χαρακτηρίζουν. Αυτές έχουν ως εξής [156]:

- Όλα τα γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με δράση θρυψίνης ή χυμοθρυψίνης.
- Όλα τα γονίδια αποτελούνται από πέντε κωδικά εξώνια.
- Τα εξώνια είναι παρόμοια σε μέγεθος με τα εσώνια.
- Όλα τα γονίδια κωδικοποιούν για ένζυμα με συντηρημένη καταλυτική περιοχή.
 Πρόκειται, συγκεκριμένα, για μία καταλυτική τριάδα ιστιδίνης-ασπαραγινικού οξέος-σερίνης (His-Asp-Ser). Η His βρίσκεται πάντα στο τέλος του δεύτερου εξωνίου, το Asp στη μέση του τρίτου και η Ser στην αρχή του πέμπτου.
- Πολλά από τα γονίδια ρυθμίζονται από τη δράση στεροειδών ορμονών.

1.10.6.1.Το γονίδιο KLK1

Έχει ήδη αναφερθεί, ότι το γονίδιο *KLK1*, το οποίο κωδικοποιεί για την παγκρεατική/νεφρική καλλικρεΐνη (KLK1), ήταν ένα από τα πρώτα καλλικρεϊνικά γονίδια που ανακαλύφθηκαν, μαζί με τα γονίδια *KLK2* και *KLK3*, κατά τη δεκαετία του 1980. Η ανθρώπινη ιστική καλλικρεΐνη KLK1 και η πρωτεολυτική της λειτουργία ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1930. Η πρωτεάση σερίνης KLK1 διαφέρει ουσιωδώς από την καλλικρεϊνική σερινοπρωτεάση πλάσματος (KLKB1), η οποία αποτελεί μέρος του συστήματος ενεργοποίησης του πλάσματος με επαφή, έχει χαρτογραφηθεί στις χρωμοσωμικές περιοχές 4q34-q35 και η δομή της σχετίζεται με τον παράγοντα πήξης XI [157, 158]. Η KLK1 εκφράζεται σε αφθονία στο πάγκρεας, στα νεφρά, στους σιελογόνους αδένες [159] και καταλύει την απελευθέρωση της λυσυλβραδυκινίνης από μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους κινινογόνο [160]. Ο φυσιολογικός ρόλος της KLK1 περιλαμβάνει μια ποικιλία από λειτουργίες που κυμαίνονται από τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της μυοσύσπασης έως την επεξεργασία των αυξητικών παραγόντων.

Τα επίπεδα έκφρασής του γονιδίου *KLK1* φαίνεται να ρυθμίζονται αρνητικά στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου [161], ωστόσο, έως σήμερα, καμία μελέτη δεν παρέχει σοβαρές ενδείξεις συσχέτισης μεταξύ της KLK1 και της ανάπτυξης όγκων ή της διάγνωσης και πρόγνωσης οποιουδήποτε τύπου κακοήθειας.

1.10.6.2.Το γονίδιο KLK2

Η καλλικρεΐνη 2 είναι μία πεπτιδάση, η οποία αποτελεί προϊόν του ανθρώπινου γονιδίου *KLK2*. Πρόκειται για μια πρωτεάση, η οποία είναι κατά το 80% αλληλουχικά ομόλογη με το ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA, δηλαδή την KLK3 [162]. Η KLK2 συμβάλλει στην κανονική φυσιολογία του προστάτη από την υδρόλυση των πρωτεϊνών σεμινογελίνη Ι και ΙΙ και φιμπρονεκτίνη της σπερματοδόχου κύστης. Αυτό οδηγεί στην φυσιολογικά ενισχυμένη κινητικότητα του σπέρματος. Εντούτοις, η KLK2 διαδραματίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις του αδένα, καθώς μπορεί να ενεργοποιήσει τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης u-PA, μία πρωτεάση, που σχετίζεται ισχυρά με τον μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Επιπρόσθετα, η KLK2 είναι σε θέση να αποδομεί την πλειοψηφία των πρωτεϊνών που προσδένονται στον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα IGF (IGFBPs), μεταβάλλοντας, έτσι, τη διαθεσιμότητα των IGFs και ως εκ τούτου, μπορεί να συμμετέχει έμμεσα στην ανάπτυξη του όγκου και την εξέλιξή του [163].

Η KLK2 είναι ο δεύτερος πιο καθιερωμένος καλλικρεϊνικός βιοδείκτης του καρκίνου του προστάτη. Τα αυξημένα επίπεδα KLK2 και το χαμηλό ποσοστό του λόγου ελεύθερου PSA προς ολικό PSA (fPSA/tPSA) σχετίζονται με ταχέως αναπτυσσόμενες κακοήθειες του προστάτη και μπορούν, επίσης, να προβλέψουν βιοχημική υποτροπή μετά την τοπική θεραπεία, η οποία αποτελεί αδιαμφισβήτητη ένδειξη υποτροπής του καρκίνου

του προστάτη [164, 165]. Ο όρος βιοχημική υποτροπή ορίζεται ως αύξηση των επιπέδων PSA στο αίμα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη μετά από χειρουργική επέμβαση ή θεραπεία με ακτινοβολία, γεγονός που υποδηλώνει κακή πρόγνωση. Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση απέδειξε ότι η χρήση του λόγου KLK2 προς ελεύθερο PSA (KLK2/fPSA) θα μπορούσε να αυξήσει την ειδικότητα στη διάκριση περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη από τις περιπτώσεις καλοήθους υπερτροφίας του προστάτη σε άτομα που ανήκουν σε «γκρίζα ζώνη» PSA (4-10 ng /ml) [166]. Συνεπώς, η εκτίμηση των επιπέδων KLK2 σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη μπορεί να αποδειχθεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελλοντική κλινική πρακτική, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των κλινικών ερευνών και για την επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης. Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο, ενώ η καλλικρεΐνη 3 (KLK3/PSA), παραμένει η μόνη εγκεκριμένη καλλικρεΐνη για χρήση στην κλινική πρακτική, ως βιοδείκτης του καρκίνου του προστάτη.

1.10.6.3. Το γονίδιο KLK3

Το γονίδιο KLK3 κωδικοποιεί για το ευρέως αναγνωρίσιμο ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA, που είναι ο πλέον αποδεκτός και ευρέως χρησιμοποιούμενος βιοδείκτης του καρκίνου του προστάτη. Οι μετρήσεις ελέυθερου και συνολικού PSA στον ορό, όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιούνται τόσο στη βιοψία και στη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη, όσο και στην παρακολούθηση και πρόγνωση των πιθανών υποτροπών της νόσου [167, 168]. Το PSA, όπως και η KLK2, σχετίζεται με την υγροποίηση του σπέρματος στον φυσιολογικό προστάτη, πρωτεολύοντας τη σεμινογελίνη Ι και ΙΙ, τη φιμπρονεκτίνη και τη λαμινίνη. Ωστόσο, η λειτουργία του PSA μπορεί, επιπρόσθετα, να προκαλέσει ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στον προστάτη και να προωθήσει τη μετάσταση, μέσω της ενεργοποίησης ή/και της διάσπασης ενός ευρέους φάσματος υποστρωμάτων. Αυτά τα υποστρώματα μπορεί να είναι, ενδεικτικά: το σχετιζόμενο με την παραθορμόνη πεπτίδιο (PTH-rP)- ένας αυξητικός παράγοντας που αυξάνει το ρυθμό της ανάπτυξης του όγκου του προστάτη in vivo και μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στον οστεοβλαστικό φαινότυπο των οστικών μεταστάσεων του καρκίνου του προστάτη, οι IGFBP3 και IGFBP4- με αποτέλεσμα μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις του IGF και, κατά συνέπεια, την πρόκληση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του προστάτη ή ο λανθάνων TGF-β- ένας παράγοντας που όταν απελευθερωθεί προωθεί τη μετάβαση από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα [169].

Ανεξάρτητα από τη δραστικότητα πρωτεάσης σερίνης, η KLK3/PSA είναι σε θέση να διεγείρει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, πιθανόν με τη δέσμευση σε έναν υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων. Καθώς οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο DNA, η KLK3 θα μπορούσε να κατηγορηθεί για έμμεση συμβολή στην καρκινογένεση του προστάτη [170]. Το *KLK3* είναι ένα γονίδιο που υπόκειται σε χαρακτηριστική ρύθμιση από στεροειδείς ορμόνες και εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στον αδένα του προστάτη.

Το γονίδιο KLK3 εκφράζεται, επίσης, σε πλειάδα ιστών στις γυναίκες, ιδιαίτερα σε εκείνους που ρυθμίζονται από στεροειδείς ορμόνες. Μία από τις πρώτες αναφορές, σχετικά με τις καλλικρεΐνες, σε περιπτώσεις καρκίνου πλην του καρκίνου του προστάτη, σχετιζόταν με τη μέτρηση των επιπέδων KLK3 σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού. Το συγκεκριμένο εύρημα αποκάλυψε ότι το PSA θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας ανεξάρτητος, εύχρηστος προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του μαστού. Γυναίκες με θετικούς σε PSA όγκους στο μαστό χαίρουν μεγαλύτερης πιθανότητας για μακρά ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και συνολικότερο χρόνο επιβίωσης (OS) από ό, τι εκείνες των οποίων οι κακοήθεις ιστοί ήταν αρνητικοί σε PSA [171]. Το γονίδιο KLK3 εκφράζεται, επίσης, στις ωοθήκες, αν και το πρότυπο έκφρασής του σε κακοήθειες των ωσθηκών, δεν δείχνει σημαντική συσχέτιση ούτε με οποιοδήποτε κλινικοπαθολογικό χαρακτηριστικό, ούτε με τον χρόνο επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών [172].

1.10.6.4. Το γονίδιο KLK4

Το γονίδιο KLK4 (αλλιώς γνωστό ως KLK-L1), που κωδικοποιεί για μία επιπλέον ανδρογονο-ρυθμιζόμενη πρωτεάση, ταυτοποιήθηκε το 1999. Η έκφραση του περιορίζεται στον αυλό και το βασικό επιθήλιο του προστάτη, όπου διασπά το προ-PSA και προκαλεί υγροποίηση του σπέρματος [173]. Πολλές αναφορές δείχνουν ότι το KLK4 υπερεκφράζεται σημαντικά στον καρκίνο του προστάτη, σε σύγκριση με την έκφρασή του στο καλόηθες επιθήλιό του [174, 175]. Πιστεύεται, ότι η πρωτεάση KLK4 δεν εμπλέκεται άμεσα μόνο στη διάδοση και στην ανάπτυξη των όγκων των καρκινικών κυττάρων του προστάτη [176], αλλά και στη μεταστατική ανάπτυξη στους συνεχόμενους του αδένα του προστάτη οστικούς ιστούς [177]. Η KLK4 μπορεί να προωθεί την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση με την ενεργοποίηση του πεπτιδίου που σχετίζεται με την παροθορμόνη (PTH-rP) και του αυξητικού παράγοντα C του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGFC), αντίστοιχα. Επιπλέον, η KLK4 μπορεί να ενεργοποιήσει με επιτυχία τα μέλη της οικογένειας των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών, τα οποία έχουν αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων του προστάτη και, ενδεχομένως, ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οστεοεπαγωγική δραστηριότητα του μεταστατικού προστάτη [178].

Ένας άλλος ογκογόνος μηχανισμός δράσης για την KLK4 είναι η πρωτεολυτική διάσπαση του KLK4-ενεργοποιημένου υποδοχέα-1 και η επακόλουθη πρόκληση της αποδέσμευσης του IL-6, η οποία τελικά οδηγεί στην έναρξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ όγκων-στρώματος και στην τοπική διήθηση [179].

Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA του *KLK4* συσχετίζονται με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου του προστάτη [180] και του παχέος εντέρου [181]. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη με ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η οποία πραγματοποιήθηκε το 2009, ανέφερε ότι τα επίπεδα του *KLK4* mRNA συσχετίσθηκαν με προχωρημένο βαθμό και πιο επιθετική συμπεριφορά του όγκου, καθώς και με μειωμένη χρώση των υποδοχέων της προγεστερόνης και κακή πρόγνωση [182]. Το ίδιο μοτίβο έκφρασης του mRNA είχε επίσης παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών [183].

1.10.6.5. Το γονίδιο KLK5

Το γονίδιο *KLK5* και η αντίστοιχη πρωτεΐνη KLK5, εναλλακτικά ονομαζόμενη KLK-L2, εκφράζεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα, τόσο όσο αφορά το mRNA όσο και την πρωτεΐνη, στο δέρμα, στον μαστό, στις ωοθήκες, στους όρχεις και στους σιελογόνους αδένες. Η KLK5 προτείνεται πως, μαζί με άλλες πρωτεάσες, έχει την ικανότητα να αποδομεί μεσοκυττάριες δομές, όπως τα δεσμοσωμάτια, να μειώνει την κυτταρική συνοχή και να διευκολύνει την απολέπιση κατά τα τελικά στάδια του επιδερμικού κύκλου, όπως και την κερατινοποίηση. Επιπροσθέτως, η KLK5 είναι σε θέση να διασπά μόρια του εξωκυττάριου στρώματος (κολλαγόνο I-IV, φιμπρονεκτίνη και λαμινίνη) και μόρια κυτταρικής συνοχής (ινωδογόνο και βιτρονεκτίνη). Κατά συνέπεια, το ένζυμο αυτό μπορεί να συμβάλει στην εισβολή του καρκίνου, τη μετάσταση και την αγγειογένεση [184].

Το 2002, μελέτη με ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού, έπειτα από ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA του *KLK5*, έδειξε μέσω μονοπαραγοντικής και πολυπαραγοντικής ανάλυσης ότι η αυξημένη έκφραση του *KLK5* συσχετίζεται με μικρό διάστημα ελευθέρας νόσου (DFS) και ολικής επιβίωσης (OS) [185]. Το 2009, μια ανεξάρτητη μελέτη επιβεβαίωσε ότι η έκφραση του *KLK5* κυμαίνεται σε υψηλότερα του φυσιολογικού επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, αρνητικές για τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Εντούτοις, η ίδια μελέτη ανέφερε ότι το γονίδιο υποεκφράζεται σε

μεταστατικούς όγκους του μαστού. Επιπλέον, δεν αναφέρθηκε συσχέτιση μεταξύ του καθεστώτος έκφρασης της KLK5 και της κλινικής έκβασης των ασθενών [186]. Υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK5* βρέθηκε, αντιθέτως, να συσχετίζονται σημαντικά με πιο προχωρημένες μορφές επιθηλιακών κακοηθειών στις ωοθήκες [187].

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα mRNA μετάγραφα του KLK5 που εκφράζονται σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα των ωοθηκών είναι διαφορετικά σε σύγκριση με τα καρκινικά. Μάλιστα, ένα εναλλακτικό μετάγραφο, με μια σύντομη 5'-αμετάφραστη περιοχή, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, επιθετικού φαινότυπου [188]. Εκτός από τα παραπάνω δεδομένα, η μέτρηση με ανοσοφθορισμό των επιπέδων KLK5 στους καρκινικούς ωοθηκικούς ιστούς, έδειξε πως αυτά ενισχύουν την άποψη ότι το γονίδιο KLK5 είναι δείκτης κακής πρόγνωσης [189]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της KLK5 στον ορό και μικρής ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία, μεγαλύτερου κινδύνου για κακή κλινική εξέλιξη και μεγαλύτερης μεταστατικής ικανότητας [190, 191].

Αντίθετα, ανεξάρτητες μελέτες πάνω στον καρκίνο του προστάτη, απέδειξαν ότι υψηλότερα επίπεδα mRNA του *KLK5* ανιχνεύονται συχνότερα σε ασθενείς με όγκους λιγότερο προχωρημένου σταδίου [192, 193]. Τελικά, ευνοϊκή πρόγνωση δίνει το ιστικό μοτίβο έκφρασης της KLK5 στην περίπτωση του καρκίνου των όρχεων [194], ενώ δυσμενή πρόγνωση δίνει στον καρκίνο του παχέος εντέρου [195].

1.10.6.6.Το γονίδιο KLK6

Η καλλικρεϊνική πεπτιδάση KLK6 ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια προσπαθειών ανίχνευσης και ταυτοποίησης σερινοπρωτεασών με ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών [196]. Η σημαντική συσχέτιση της υψηλής συγκέντρωσης της KLK6 με ωοθηκικούς όγκους επιθετικού φαινότυπου και κακή κλινική έκβαση έχει επιβεβαιωθεί σε μια σειρά από πειραματικές εργασίες με χρήση δειγμάτων ορού και ιστού [197-200].

Επιπρόσθετα, η KLK6 διαθέτει προγνωστική σημασία, τόσο για τον καρκίνο του παχέος εντέρου [201], όσο και για τον γαστρικό καρκίνο [202]. Σε αυτές τις περιπτώσεις καρκίνου, τα υψηλά επίπεδα mRNA έχουν συσχετιστεί με την διήθηση του όγκου, τη μετάσταση και, γενικότερα, τα προχωρημένα καρκινικά στάδια. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν συσχετίσει την KLK6 με την εξαρτώμενη από το ογκογονίδιο *KRAS* μετανάστευση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου [203]. Τα μοτίβα

έκφρασης της KLK6 θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυσμενείς προγνωστικούς βιοδείκτες και στις περιπτώσεις του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [204], του ορώδους θηλώδους καρκίνου της μήτρας [205], του πορογενούς αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος [206] και του νεφροκυτταρικού καρκινώματος [207].

Οι ακριβείς λειτουργικοί ρόλοι της KLK6, οι οποίοι θα μπορούσαν να εξηγήσουν την εκτενή συμμετοχή της σε πολλούς τύπους καρκίνου, δεν έχουν ακόμη καθοριστεί με σαφήνεια. Αρχικά, λόγω της καταστολής ή αποσιώπισης της έκφρασης του γονιδίου της σε μεταστατικούς όγκους μαστού και ωοθηκών διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η πρωτεΐνη φυσιολογικά έχει ογκοκατασταλτική λειτουργία [120]. Μελέτες που ακολούθησαν, υπέδειξαν σημαντικούς φυσιολογικούς ρόλους της πρωτεΐνης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), και συσχέτισαν την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου με νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η νόσος Parkinson [208] και η νόσος Alzheimer [209]. Επίσης, πολύ ενδιαφέρουσες είναι ερευνητικές δουλειές που ενέπλεξαν την KLK6 με την πρωτεόλυση της μυελίνης, και συνεπώς, με νόσους, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας [129].

Σήμερα γνωρίζουμε, ότι η καλλικρεΐνη 6 είναι ένα ένζυμο τύπου θρυψίνης που μπορεί να διασπά με υδρόλυση λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο I-IV, καθώς και άλλα βασικά συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος και της βασικής μεμβράνης, in vitro. Επίσης, πιστεύεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της αποκόλλησης των Ε-καδερινών, ενθαρρύνοντας, έτσι, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τη μετανάστευση και τη μετάσταση [210]. Εντούτοις, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η KLK6 συμμετέχει στην αναστολή της καρκινικής διήθησης από το επιθήλιο στο μεσέγχυμα και συγκρατεί τη διαδικασία εξέλιξης των όγκων [211].

1.10.6.7.Το γονίδιο KLK7

Το γονίδιο *KLK7*, είναι ένα από τα λίγα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών με σαφώς καθορισμένη φυσιολογική λειτουργία. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το χυμοτρυπτικό ένζυμο της ανθρώπινης κεράτινης στιβάδας HSCCE (Human Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme) [212],το οποίο παράγεται από τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας. Εκεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, μαζί με άλλα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνικών γονιδίων, στην απολέπιση της κεράτινης στοιβάδας και στην διαδικασία κυτταρικής απόπτωσης στην επιφάνεια του δέρματος [213]. Εκτός από το δέρμα η καλλικρεΐνη 7 εντοπίζεται στο ΚΝΣ, στα νεφρά, στον μαστικό αδένα, στον θύμο αδένα και στους σιελογόνους αδένες.

Υψηλά επίπεδα του mRNA του *KLK7* έχουν, σε αρκετές περιπτώσεις, συνδεθεί με μικρότερη χρονική περίοδο επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού [214, 215]. Επιπλέον, η υπερέκφραση του *KLK7* σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών έχει συσχετισθεί σημαντικά με όγκους προχωρημένου σταδίου [216].

Επιπλέον, η προγνωστική αξία της KLK7 και των επιπέδων mRNA του γονιδίου της θα μπορούσε να αποτελέσει αξιολογητικό παράγοντα και άλλου τύπου παθολογικών καταστάσεων. Έχει αναφερθεί, για παράδειγμα, ότι το μοτίβο έκφρασης του mRNA του *KLK7* συνδέεται με μικρότερη περίοδο επιβίωσης σε ασθενείς με ενδοκρανιακό όγκο [217]. Επιπλέον, στον καρκίνο του παγκρέατος παρατηρείται ενισχυμένη δραστηριότητα πρωτεάσης της KLK7 [218], το γονίδιο *KLK7* εκφράζεται συχνότερα σε υψηλά επίπεδα σε πλακώδη κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου [219] και, τέλος, το 2009 υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου συνδέθηκαν με περισσότερο επιθετικούς όγκους στον καρκίνο του παχέος εντέρου [220].

1.10.6.8. Το γονίδιο KLK8

Η καλλικρεϊνική πεπτιδάση 8, ή αλλιώς νευροψίνη, για πρώτη φορά χαρακτηρίσθηκε ως εγκεφαλική πρωτεάση σερίνης σε ποντίκια [221]. Το 1998, το ανθρώπινο ομόλογό της κλωνοποιήθηκε και βρέθηκε να εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον ανθρώπινο εγκέφαλο και το δέρμα [222]. Η ανάλυση της έκφρασης του mRNA του KLK8 σε ωοθηκικά καρκινώματα δείχνει ότι οι κλασικές ισομορφές του mRNA σχετίζονται με διαφορετικά στάδια του όγκου και ότι, επίσης, υψηλά επίπεδα έκφρασης συνδέονται με χαμηλότερη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου [223]. Η αξιολόγηση της KLK8 ως ευνοϊκού προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο των ωοθηκών έχει επιβεβαιωθεί με εκτίμηση των επιπέδων πρωτεΐνης σε ιστικά δείγματα των όγκων αυτών, όπως και σε δείγματα ορού, με εφαρμογή μεθόδων, όπως η in situ ανάλυση της πρωτεΐνης, η ανοσοϊστοχημεία και η ELISA [224]. Τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου, επίσης, συνδέονται με την ευνοϊκή κλινική έκβαση σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ο φαινομενικά ευνοϊκός χαρακτήρας του προγνωστικού χαρακτήρα της KLK8 στις προαναφερθείσες κακοήθειες μπορεί να εξηγηθεί, εν μέρει, από το γεγονός ότι η υπερέκφραση του γονιδίου αυτού σε καρκινικά κύτταρα μειώνει την ικανότητα εισβολής των κυττάρων αυτών, καθώς εμποδίζει τη δέσμευση της φιμπρονεκτίνης στην ιντεγκρίνη [225].

1.10.6.9. Το γονίδιο KLK9

Η καλλικρεϊνική πεπτιδάση 9, ανήκει στα προσφάτως κλωνοποιημένα μέλη της οικογένειας [226]. Η KLK9 εκφράζεται κυρίως στο δέρμα, στους μαστούς, στο πάγκρεας και στο κεντρικό νευρικό σύστημα [227]. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA του *KLK9*, το 2003, αποκάλυψε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης σχετίζονται με όγκους πρώτων σταδίων στον μαστό, καθώς και με μεγάλη περίοδο επιβίωσης των ασθενών, θέτοντας, έτσι, τις βάσεις για την αναγνώριση της KLK9 ως ενός ακόμα πολύτιμου προγνωστικού παράγοντα για τον καρκίνο του μαστού [228]. Ίδια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν για την περίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών [229].

1.10.6.10. Το γονίδιο *KLK10*

Το γονίδιο *KLK10*, κλωνοποιήθηκε, αρχικά, το 1996 ως ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο είχε υποστεί απώλεια έκφρασης σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού [121]. Οι μηχανισμοί που υπόκεινται στην ογκοκατασταλτική λειτουργία της *KLK10* και των φυσιολογικών του υποστρωμάτων δεν έχουν ακόμη, πλήρως, περιγραφεί.

Η ανάλυση της έκφρασης του mRNA της *KLK10*, με υβριδισμό in situ σε ιστούς μαστού έδειξε ότι, ενώ όλα τα φυσιολογικά δείγματα και ένας αριθμός υπερπλασικών δειγμάτων βρέθηκαν θετικά στην έκφραση της KLK10, στην πλειοψηφία των καρκινωμάτων παρατηρούταν πλήρης έλλειψη έκφρασης του γονιδίου *KLK10* [230, 231]. Αυτή η απώλεια έκφρασης πιστεύεται ότι οφείλεται σε μεθυλίωση στο τρίτο εξώνιο του γονιδίου. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι αυτό το φαινόμενο μπορεί να παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, σε πολύ πρώιμα στάδια. Αυτές οι παρατηρήσεις πρότειναν ότι η κατάσταση μεθυλίωσης της *KLK10* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα πολύτιμο μοριακό εργαλείο στη μελέτη της καρκινικής σταδιοποίησης.

Η αποσιώπηση του γονιδίου *KLK10*, λόγω της μεθυλίωσης του τρίτου εξωνίου του, φαίνεται πως απενεργοποιεί τις ογκοκατασταλτικές του ιδιότητες και μπορεί να συμβάλει στην εμφάνιση μειωμένου προσδόκιμου ζωής [232, 233]. Έτσι, προτάθηκε πως η αρνητική ρύθμιση αυτού του γονιδίου είναι χαρακτηριστική του καρκινικού φαινοτύπου της κυτταρικής σειράς του μαστού ή του ιστού από μεταστατικό όγκο μαστού.

Αντίθετα, η KLK10 δε θεωρείται καλός προγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο των ωοθηκών, λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων KLK10 σε εκχυλίσματα ιστών των

ωοθηκών που σχετίζονται με προχωρημένα στάδια της νόσου [234]. Μια άλλη ανεξάρτητη μελέτη έδειξε, επίσης, τη συσχέτιση των υψηλών πρωτεϊνικών επιπέδων της KLK10 στον ορό ασθενών με πιο επιθετικά στάδια καρκίνου των ωοθηκών και με μικρότερη προσδοκόμενη περίοδο επιβίωσης. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις KLK10 στον ορό προεγχειρητικά, σχετίζονται συχνά με αντίσταση του οργανισμού των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών στη χημειοθεραπεία [235]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η KLK10, όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλους βιοδείκτες ορού, μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη στην πρόβλεψη της βραχυπρόθεσμης επιβίωσης. Επιπλέον, η ανάλυση της έκφρασης της *KLK10*, καταλήγει να είναι μια αναδυόμενη ευκαιρία για την ανακάλυψη ενός ακόμα προγνωστικού δείκτη και για άλλες κακοήθεις καταστάσεις, όπως ο καρκίνος του προστάτη - όπου μία μεταλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο 50 φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη [236] ή ο καρκίνος των όρχεων [237].

Η δυσμενής προγνωστική ικανότητα της KLK10 μπορεί, επίσης, να αφορά τις περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου και του γαστρικού καρκίνου, όπου τα αυξημένα επίπεδα mRNA συνδέονται με την εισβολή του όγκου και τα προχωρημένα κλινικά στάδια αυτών των ασθενειών [238]. Υπάρχει σήμερα η άποψη, ότι η KLK10 θα μπορούσε να αποτελέσει ως ένας νέος προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, κάτι που, ωστόσο, χρήζει περαιτέρω έρευνας. Η KLK10 θα μπορούσε να αποτελεί στόχο μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών που προδιαθέτουν για καρκίνο, λόγω των ευρημάτων που συσχετίζουν τα υψηλά επίπεδα mRNA αυτής με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να αγκαλιάζουν την γραμμική συσχέτιση μεταξύ την καλλικρείνης 10 και της καρκινικής εμφάνισης και μετάστασης.

1.10.6.11. Το γονίδιο *KLK11*

Το γονίδιο *KLK11*, έχει αναφερθεί να εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, του στομάχου, του προστάτη και των ωοθηκών [239]. Είναι ενδιαφέρον, ότι η KLK11 διαθέτει έναν διφορούμενο ρόλο στην πρόγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου σχετίζονται σημαντικά με μια επιθετική κλινική συμπεριφορά του καρκίνου των ωοθηκών και κακή πρόγνωση [240], ενώ αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης KLK11 παρατηρούνται πιο συχνά σε πρώιμο στάδιο και σε ασθενείς με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία [241]. Αυτή η ασάφεια μπορεί να δικαιολογηθεί, σε κάποιο βαθμό, έχοντας κατά νου ότι τα διάφορα (δομικά και λειτουργικά) mRNA του γονιδίου και / ή οι διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης του ποσοτικοποιούνται με τη χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών και ερευνητικών τεχνικών.

Στοιχεία υπάρχουν και για τον ρόλο του *KLK11* στον καρκίνο του προστάτη, όπου τα χαμηλότερα επίπεδα του mRNA του γονιδίου σχετίζονται με όγκους προχωρημένου σταδίου και λιγότερο διαφοροποιημένες κακοήθειες, αποκαλύπτοντας τον ευνοϊκό προγνωστικό ρόλο του γονιδίου στον καρκίνο του προστάτη [242]. Αντίθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης KLK11 σε καρκίνωμα του ορθού, βρέθηκαν να συνδέονται ισχυρά με επιθετικούς όγκους και με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης για τους ασθενείς.

1.10.6.12. Το γονίδιο *KLK12*

Το γονίδιο KLK12 εκφράζεται σε μια ποικιλία ιστών, συμπεριλαμβανομένου των σιελογόνων αδένων, του στομάχου, της μήτρας, των πνευμόνων, του θύμου αδένα, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του εγκεφάλου, του μαστού, του θυρεοειδούς και της τραχείας [243]. Τα επίπεδα πρωτεΐνης KLK12 εμφανίζονται μειωμένα σε ασθενείς που πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, σε σύγκριση με τη φυσιολογικά ιστικά δείγματα [244]. Εντούτοις, η προγνωστική ικανότητα του εν λόγω μέλους της οικογένειας των καλλικρεϊνών δεν έχει ακόμη διερευνηθεί σε οποιουδήποτε τύπου κακοήθεια.

1.10.6.13. Το γονίδιο *KLK13*

Το γονίδιο KLK13 (εναλλακτικά KLK-L4), είναι ένα προσφάτως αναγνωρισμένο μέλος της οικογένειας γονιδίων των ανθρώπινων καλλικρεϊνών [245]. Η υπερέκφραση του mRNA του γονιδίου σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του μαστού σχετίζεται με στατιστικά σημαντική αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης. Το ευνοϊκό αποτέλεσμα που προμηνύει η έκφραση του θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από ερευνητικά δεδομένα, τα οποία υποδεικνύουν ότι η καλλικρεΐνη 13 θα μπορούσε να διασπά ειδικά το ανθρώπινο πλασμινογόνο προς θραύσματα που προσομοιάζουν τη δράση της αγγειοστατίνης και έτσι να προωθεί αντιαγγειογενετική δράση [246].

Όσον αφορά τον καρκίνο των ωοθηκών, οι ασθενείς που είναι θετικές στην KLK13 είναι πιο πιθανό να βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της νόσου και υψηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης. Τα δεδομένα αυτά εισάγουν την προγνωστική χρησιμότητα της ιστικής KLK13 ως ανεξάρτητο δείκτη ευνοϊκής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Η πρόταση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι KLK13 βρίσκεται να κατέχει μια

σημαντική προγνωστική αξία για τη θετική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (μεγαλύτερη από οποιαδήποτε άλλη κλινική μεταβλητή που χρησιμοποιείται σε πολυπαραγοντική ανάλυση) [247]. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK13* έχουν περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν υποτροπή της νόσου. Επιπρόσθετα στα προαναφερθέντα στοιχεία, έχει αποδειχθεί ότι η KLK13 μπορεί να διασπάσει στοιχεία του εξωκυττάριου στρώματος, δηλαδή το κολλαγόνο Ι-ΙΙΙ, τη φιμπρονεκτίνη και τη λαμινίνη, και θα μπορούσε να διαδραματίσει ένα ρόλο στη μετάσταση των όγκων των ωοθηκών [248].

Η δυσμενής προγνωστική ικανότητα του *KLK13* είναι σαφής στον καρκίνο του πνεύμονα. Επιπλέον, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης του *KLK13* σε πρωτεϊνικό επίπεδο χαρακτηρίζονται από βραχύτερο προσδόκιμο επιβίωσης [249].

1.10.6.14. Το γονίδιο *KLK14*

Η μέχρι πρότινως γνωστή ως KLK-L6, KLK14 είναι ένα από τα νεότερα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών και εκφράζεται κυρίως στο αδενικό επιθήλιο του μαστού και του προστάτη και στην επιδερμίδα του δέρματος, όπου, μαζί με άλλες καλλικρεΐνες, πιστεύεται ότι διαδραματίζει καίριο ρόλο στην απολέπιση του δέρματος [250]. Πιστεύεται ότι η KLK14 υλοποιεί τις φυσιολογικές της λειτουργίες μέσω της διάσπασης συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος και την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της πρωτεασοελεγχόμενου υποδοχέα-2 [251].

Η KLK14 έχει αναγνωριστεί ως ανεξάρτητος δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού λόγω του γεγονότος ότι οι ασθενείς με όγκους του μαστού θετικούς σε mRNA του γονιδίου είναι πιο πιθανό να βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου και παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου [252]. Επιπλέον, το KLK14 υπερεκφράζεται και στον καρκίνο του προστάτη [253]. Μια άλλη κακοήθεια όπου η KLK14 φαίνεται να αποκτά δυσμενή προγνωστική αξία είναι ο καρκίνος του πνεύμονα. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του KLK14, αυτά φαίνεται να σχετίζονται με το μέγεθος του όγκου.

Ο συχνά αναφερόμενος δυσμενής προγνωστικός χαρακτήρας της KLK14, σε πολλές διαφορετικές κακοήθειες του ανθρώπου, θα μπορούσε να τεκμηριωθεί από το γεγονός ότι η KLK14, μέσω της δραστηριότητάς της ως πρωτεάση σερίνης, είναι σε θέση να διασπάσει συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος in vitro, τα οποία μπορούν να προωθήσουν την

εισβολή των κυττάρων του όγκου και των μεταστάσεων in vivo. Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *KLK14* θα μπορούσε να θεωρηθεί ανεξάρτητος δείκτης ευνοϊκής πρόγνωσης στην περίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών, αφού τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του mRNA στην περίπτωση αυτή, έχουν συσχετιστεί με λιγότερο προχωρημένα στάδια της νόσου [254].

1.10.6.15. Το γονίδιο *KLK15*

Το γονίδιο *KLK15* ανακαλύφθηκε και κλωνοποιήθηκε πιο πρόσφατα από όλα τα μέλη της οικογένειας καλλικρεϊνικών γονιδίων [155]. Αυτό εξηγεί γιατί ονομάστηκε καλλικρείνη 15, παρά το γεγονός ότι χαρτογραφείται μεταξύ των γονιδίων *KLK1* και *KLK3*/PSA. Τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου αυτού έχουν αναφερθεί να είναι υψηλά σε καρκινικές περιοχές του αδένα του προστάτη, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μη καρκινικές περιοχές. Επιπλέον, αυτή η υπερέκφραση φαίνεται να σχετίζεται με όγκους όψιμων σταδίων στον προστάτη (pT3/T4), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης είναι δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης της νόσου [255].

Ο πιθανός φυσιολογικός ρόλος που έχει αποδοθεί στο γονίδιο είναι η ενεργοποίηση μέσω διάσπασης του προ-PSA. Έτσι, έχει προταθεί ότι η KLK15 λαμβάνει μέρος σε πρωτεολυτικούς καταράκτες που συμμετέχει το PSA, οι οποίοι ρυθμίζουν την υγροποίηση του σπέρματος στον φυσιολογικό αδένα του προστάτη. Εντούτοις, η υπερέκφραση του *KLK15* σε κακοήθεις όγκους του αδένα θα μπορούσε να σημαίνει υπερενεργοποίηση του PSA, κάτι που με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της φυσιολογικής ιστικής αρχιτεκτονικής του προστάτη, σε χάλαση της δομής του εξωκυττάριου στρώματος, σε εισβολή του όγκου και μετάσταση [256]. Το mRNA του γονιδίου ανιχνεύεται συχνότερα σε υψηλά επίπεδα σε δείγματα καρκίνου των ωοθηκών σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ωοθηκικά δείγματα. Το *KLK15* θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ανεξάρτητο δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης στον καρκίνο των ωοθηκών [257]. Ανίθετα, και ομοίως με το *KLK3*, η έκφραση του γονιδίου *KLK15* φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο βιοδείκτη ευνοϊκής πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού [258].

1.10.7. Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των ανθρώπινων καλλικρεϊνών

Εκτός από τα 15 αναμενόμενα κανονικού μήκους mRNAs, τα γονίδια των καλλικρεϊνών εκφράζουν έναν μεγάλο αριθμό ποικίλων μεταγράφων. Εως σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί περίπου 70 προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος τους [259]. Το εναλλακτικό
μάτισμα συμβαίνει στις κωδικές περιοχές ως αποτέλεσμα παράλειψης ορισμένων εξονίων ή διατήρησης ιντρονίων [260]. Εναλλακτικά, διαφορετικά μετάγραφα μπορούν να προκύψουν από μη σωστή έναρξη της μεταγραφής ή από πολυαδενυλίωση ορισμένων περιοχών [188]. Παρόλο που ορισμένα πρωτεϊνικά θραύσματα έχουν εντοπιστεί πειραματικά [261, 262], *in silico* ανάλυση των ανοιχτών πλαισίων αναγνωσης έχει δείξει ότι πιθανώς να υπάρχουν πολλές πρωτεϊνικές ισομορφές. Ορισμένες ισομορφές έχουν αποδεδειγμένη κλινική χρησιμότητα [131]. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η αλληλουχία που κωδικοποιεί το εκκρινόμενο σήμα είναι συντηρημένη, πράγμα που σημαίνει ότι οι θραυσματοποιημένες πρωτεΐνες, που είναι ανάλογες των κανονικών καλλικρεϊνών, είναι εκκρινόμενες. Η έκφραση των καλλικρεϊνών φαίνεται να ρυθμίζεται ορμονικά ή και μέσω επιγενετικών παραγόντων, όπως η μεθυλίωση ή η τροποποίηση των ιστονών.

Πάρα πολλά δεδομένα δείχνουν ότι σχεδόν όλες ρυθμίζονται από στεροειδείς ορμόνες. Μελέτες πάνω στους εκκινητές πολλών καλλικρεϊνικών γονιδίων έχουν δείξει ότι στοιχεία που αποκρίνονται σε ορμόνες (HREs: hormonal response elements) ενέχονται στην cis-ρύθμίση του μεταγράφου. Δεδομένης της συνύπαρξης πολλών καλλικρεϊνικών εκφραστικών μοτίβων, ένας πιθανός ρυθμιστικός μηχανισμός είναι μέσω μίας όμοιας ελεγκτικής περιοχής. Για παράδειγμα, η έκφραση της κασέτας των KLK10, KLK11, KLK13 και KLK14 ρυθμίζεται από την δισυδροτεστοστερόνη (DHT) [263]. Με δεδομένο ότι κανένα από αυτά τα γονίδια δεν περιέχει χαρακτηρισμένα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες, θα μπορούσε να υπάρχει ένας επιπλέον ρόλος των ορμονών ώς trans-δρώντες μεταγραφικοί ρυθμιστές.

Η λανθασμένη μεταφραστική ρύθμιση των καλλικρεϊνών μπορεί να σχετίζεται άμεσα με αρκετές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων καρκινωμάτων. Επιπλέον, ορισμένες επιγενετικές ανωμαλίες, όπως η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG και οι ανωμαλίες στη χρωματιδική δομή του γενετικού τόπου KLK, έχουν βρεθεί στον καρκίνο του μαστού και στην λεμφοβλαστική λευχαιμία [264].

1.10.7.1. Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων KLK2 και KLK3

Μελέτες που εστιάσθηκαν στον υποκινητή του *KLK3* έχουν δείξει την παρουσία ενός πλαισίου TATA στις θέσεις -28 και -23 ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής καθώς και την παρουσία ενός στοιχείου απόκρισης σε υποδοχείς ανδρογόνων (adrogen receptor responsive elements: ARE), το οποίο βρίσκεται στη θέση -170 [265]. Μεταλλάξεις που εντοπίζονται στη συγκεκριμένη περιοχή συντελούν στην αναστολή της επαγωγής του υποκινητή από συνθετικά ανδρογόνα. Το γονίδιο *KLK3/PSA* περιέχει δύο ακόμη τέτοια στοιχεία, το ένα στον υποκινητή και το άλλο στον ενισχυτή [266]. Εκτός από τα ανδρογόνα, ο υποδοχέας ανδρογόνων ενεργοποιείται και από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία, με τη σειρά της, ενεργοποιείται από στοιχεία όπως ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης τύπου-1 (IGF-1), ο αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ουσίες που προκαλούν αύξηση του cAMP. Ομοίως, ο υποκινητής του *KLK2* έχει ένα δραστικό στοιχείο ARE και ένα πλαίσιο TATA.

Επίσης, η έκφραση του *KLK3* μπορεί να ρυθμιστεί από έναν ειδικό μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ονομάζεται PDEF [267] και εκφράζεται κυρίως στον προστάτη, και λιγότερο στις ωοθήκες, τον μαστό και τους σιελογόνους αδένες. Ο παράγοντας αυτός ενεργοποιεί τον υποδοχέα ανδρογόνων, μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή του AR στο DNA. Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται σε ίδιου τύπου αλληλουχία έχει βρεθεί και στον προστάτη [268].

1.10.7.2. Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου KLK10

Έχει αναφερθεί ότι στεροειδείς ορμόνες επάγουν την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ανθρώπινη καλλικρεΐνη 10 (KLK10, NES1), σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού [269]. Οι ορμόνες αυτές φαίνεται πως δεν επάγουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης, υποδεικνύοντας ότι πιθανά στοιχεία HRE (Hormonally Response Elements), υπεύθυνα για τη ρύθμιση του γονιδίου, υπάρχουν εκτός της περιοχής του υποκινητή.

Το *KLK10* έχει μελετηθεί ως προς τους μηχανισμούς μεταγραφικής ρύθμισης στους οποίους υπόκειται, με αποτέλεσμα να ταυτοποιηθεί, σχετικά πρόσφατα μετά την αναγνώριση του γονιδίου, η ελάχιστη μεταγραφική μονάδα. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό μεταγραφικής ρύθμισης, σχετικά με το γονίδιο της ανθρώπινης καλλικρεΐνης 10, είναι η ύπαρξη, στη θέση -35bp, μίας αλληλουχίας βάσεων, η οποία εκλήφθηκε ως ένα εκφυλισμένο ΤΑΤΑ box (TTAAAA) [270].

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια βιοϋπολογιστικών εργαλείων, μελέτες πρότειναν την ύπαρξη, στη θέση -756 bp έως -749bp, μίας αλληλουχίας AP-1 (TGATTCA). Επιπλέον, κατά τον ίδιο τρόπο, αναλύσεις πρότειναν την ύπαρξη, στη θέση από -594bp έως – 600bp, ενός μοτίβου Sp1 (GGGCGTG) [232]. Εξαιρετικά ενδιαφέροντα είναι τα συμπεράσματα που εξάγονται από πειράματα που διεξήχθηκαν από την ίδια ερευνητική ομάδα, σχετικά με το ρόλο του ενδογενούς υποκινητή του γονιδίου της ανθρώπινης καλλικρεΐνης 10 σε σχέση

με διάφορους ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με την αλληλουχία του υποκινητή με τη μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα, σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν το γονίδιο, παρουσιάστηκε μεταγραφική δραστικότητα όμοια με αυτή των κυτταρικών σειρών που το εκφράζουν. Το συμπέρασμα που εξάχθηκε είναι ότι οι ειδικοί ρυθμιστικοί παράγοντες που σχετίζονται με την έκφραση του γονιδίου KLK10/NES1 μπορεί να εκφράζονται σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, αλλά η δράση τους δε σχετίζεται με άμεσο τρόπο με τον υποκινητή. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι η μεθυλίωση της αλληλουχίας DNA σε μία νησίδα CpG, που βρίσκεται στο εξώνιο 3 του γονιδίου KLK10, οδηγεί στην καταστολή της έκφρασής του. Στη συνέχεια, η επεξεργασία με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα 5- αζα- 2΄-δεοξυθυμιδίνη (5-aza-dC) οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της ανθρώπινης καλλικρεΐνης.

Σε μελέτη ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες DNA (microarrays) κατά την επαγωγή διαφοροποίησης καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου από το ανάλογο της βιταμίνης D, EB1089, παρατηρήθηκε ότι επάγεται η έκφραση του γονιδίου KLK10 [271]. Το 2004, δείχθηκε ότι σε περίπτωση οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ALL), η μεθυλίωση στην περιοχή της νησίδας CpG, που βρίσκεται στο εξώνιο 3 του γονιδίου KLK10, συνδέεται με την καταστολή της έκφρασής του. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι στον υποκινητή του γονιδίου υπήρχαν μεθυλιωμένες αλληλουχίες σε νησίδες CpG, καθώς και μία ιδιαίτερη μορφή μεθυλίωσης σε αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από το περιοριστικό ένζυμο EcoRII (CC(A/T)GG) [272]. Πιο πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η μεθυλίωση του εξωνίου 3 και η συνεπακόλουθη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου KLK10 συμβαίνει και σε καρκινικές σειρές ωοθηκών. Στις περιπτώσεις αυτές, φαίνεται πως η κατεργασία με τον 5-aza-dC επάγει την επανενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στις κυτταρικές σειρές [273].

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα σήμανσης με λουσιφεράση, μια ερευνητική ομάδα το 2007 έδειξε ότι η πλειονότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών είναι ικανές να υποστηρίζουν πλήρη ή μερική μεταγραφή από τον υποκινητή του *KLK10* γονιδίου [274]. Τέλος, σε συνέχεια της παραπάνω ερευνητικής δουλειάς, δείχθηκε με υβριδοποίηση in situ ότι η απώλεια ή η μείωση της έκφρασης mRNA της *KLK10* συνδέεται με το επίπεδο διαφοροποίησης κατά τη διάρκεια της σταδιοποίησης του όγκου, με τέτοιο τρόπο, ώστε να προτείνεται ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου συμβάλλει στην διαδικασία ογκογένεσης.

1.10.8. Φυλογενετική και εξέλιξη της οικογένειας των καλλικρεϊνικών γονιδίων

Φυλογενετικές αναλύσεις στο παρελθόν έχουν καταδείξει την ύπαρξη ενός σημαντικού επιπέδου ομολογίας στον γενετικό τόπο που κωδικοποιεί για τις ιστικές καλλικρεΐνες στα θηλαστικά. Αυτές οι αναλύσεις προτείνουν ένα συντηρημένο φάσμα λειτουργιών των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών [275]. Εξελικτικές μελέτες των καλλικρεΐνικών γονιδίων στο γονιδίωμα του ανθρώπου, του ποντικού και του αρουραίου έχουν αποκαλύψει ότι η φύση της οικογένειας των γονιδίων των ιστικών καλλικρεΐνών είναι πολυφυλετική. Σε αυτήν την κατεύθυνση κινούνται και συμπληρωματικές εργασίες που πραγματεύονται την έκφραση της οικογένειας σε γονιδίωμα σκύλου, αλόγου ή αγελάδας. Ωστόσο, αναμένεται ο αριθμός των εξελικτικών κλάδων στα φυλογενετικά δέντρα να ακολουθήσει μία τάση προς μείωση, λαμβάνοντας υπόψη την τάση του καλλικρεϊνικού γενετικού τόπου να διπλασιάζεται ή να αποσιωπάται ειδοειδικά.

Πληθώρα φυλογενετικών αναλύσεων έγουν εκπονηθεί με επίκεντρο κάθε μία από τις 15 καλλικρεΐνες. Να σημειωθεί ότι οι περισσότερες εξελικτικές μελέτες και τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα βασίζονται σε επιφανειακά αμινοξικά κατάλοιπα που ελέγχουν την αναγνώριση υποστρώματος και προσδέτη. Αποτελέσματα από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες δείχνουν ότι οι καλλικρεΐνες συγκροτούνται εξελεκτικά σε έναν φυλογενετικό κλάδο, έχοντας, συνεπώς, κοινό εξελικτικό πρόγονο, ενώ οι κλασικές καλλικρεΐνες (KLK1-KLK3) αποτελούν μια διακριτή μονοφυλετική ομάδα [276]. Η τάση να διαχωρίζονται οι κλασικές ιστικές ανθρώπινες καλλικρεΐνες από τις νεότερες (KLK4-KLK15) επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες. Όπως προαναφέρθηκε, οι κλασικές καλλικρεΐνες εμφανίζουν βαθμό ομολογίας μεταξύ τους σχεδόν 80%, ενώ μεταξύ όλων ο βαθμός ομολογίας περιορίζεται σε ένα ποσοστό της τάξης του 30-50%. Αναφέρθηκαν, επίσης, κάποια δομικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις δύο ομάδες. Ενδεικτικά, αναφέρεται ξανα ότι, ενώ ο πρωτεϊνικός πυρήνας όλων των γνωστών δομικά καλλικρεϊνών είναι κοινός, οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις που λαμβάνουν χώρα στα εκτεθειμένα πρωτεϊνικά τμήματα είναι εξαιρετικά συντηρημένες. Η KLK1 περιλαμβάνει έναν επιπρόσθετο βρόγχο, ο οποίος κατέχει σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνική λειτουργία, ο οποίος έχει εντοπισθεί και στις άλλες δύο κλασικές καλλικρεΐνες KLK2 και KLK3. Αυτός ο βρόγχος εντοπίζεται παραλλαγμένος στις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας. Επιπλέον, επιπρόσθετοι επιφανειακοί βρόγχοι γύρω από τα μοτίβα πρόσδεσης στο υπόστρωμα θα μπορούσαν να ελέγχουν την ενζυμική δραστικότητα και να καθορίζουν τη λειτουργική ειδικότητα, ενώ οι νέες καλλικρεΐνες εκτός από την 13 έχουν έξι δισουλφιδικούς δεσμούς, σε αντίθεση με τους

πέντε δεσμούς των κλασικών καλλικρεϊνών. Τέλος, οι δυο από τις τρεις κλασικές καλλικρεΐνες (KLK2, KLK3) δεν έχουν ορθόλογες πρωτεΐνες στα τρωκτικά, ενώ οι νέες έχουν.

Κάποια συμπεράσματα που θα μπορούσαν, ενδεχομένως, να εξαχθούν, είναι ότι οι νέες καλλικρεΐνες έχουν αποκλίνει εξελικτικά από τον κοινό πρόγονο 65 με 85 εκατομμύρια χρόνια πριν, όταν και χρονολογείται ο διαχωρισμός των τρωκτικών από τα πρωτεύοντα και επίσης ότι είτε οι κλασσικές καλλικρεΐνες έχουν αποκλίνει από τις «νέες», είτε οι δυο ομάδες είναι μονοφυλετικές με κοινό εξελικτικό πρόγονο. Τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα συγκλίνουν στο γεγονός ότι οι καλλικρεΐνες μπορούν να διαιρεθούν σε πέντε κύριους κλάδους. Συγκεκριμένα, οι καλλικρεΐνες ΚLK1, KLK2 και KLK3 ομαδοποιούνται σε έναν κλάδο, οι KLK9, KLK11, KLK15 στον δεύτερο, οι KLK6, KLK13 και KLK14 στον τρίτο, οι KLK8, KLK10 και KLK12 στον τέταρτο και οι KLK4, KLK5 και KLK7 στον πέμπτο. Μία υπάρχουσα αποδεκτή θεωρία είναι ότι η οικογένεια των καλλικρεϊνικών γονιδίων προέκυψε μέσω διπλασιασμού και ανακατάταξης εξωνίων [277], με άνισο επιχιασμό των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια του μειωτικού ανασυνδυασμού.

1.10.9. Συσχέτιση των καλλικρεϊνών με ανθρώπινες ασθένειες

Για μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, οι οποίες μπορεί να συσχετίζονται με τον καρκίνο, αλλά και με άλλες ασθένειες, υπεύθυνη ειναι η μη ελεγχόμενη πρωτεόλυση. Η τελευταία είναι πιθανό να οφείλεται σε υπερέκφραση ή υπερενεργοποίηση καλλικρεϊνών.

1.10.9.1. Συσχέτιση των καλλικρεϊνών με τον καρκίνο

Αρκετές καλλικρεΐνες ενέχονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης όγκου, κυρίως μέσω τροποποίησης του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα IGF, αλλά και των πρωτεϊνών που προσδένονται σε αυτόν (IGF Binding Proteins: IGFBPs). Εναλλακτικά, οι καλλικρεΐνες μπορεί να ενεργοποιούν αρκετούς ογκοαυξητικούς παράγοντες TGF (TGFs: Tumor Growth Factors), μέσω των μονοπατιών πρωτεασών σερίνης και υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες σερίνης uPA–uPAR και ίσως μέσω μονοπατιών υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες PAR. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι πιθανώς υπάρχει μια συνεργατική επίδραση των καλλικρεϊνών στην ανάπτυξη όγκου. Για παράδειγμα, έκτοπη συνέκφραση των καλλικρεϊνών 4,5,6, και 7 σε ωοθηλακικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία εμφυτεύθηκαν σε άνοσα (nude) ποντίκια, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική ανάπτυξη όγκου [278].

Αντιθέτως, ορισμένες καλλικρεΐνες φαίνεται να λειτουργούν ως κατασταλτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη όγκου. Η KLK3, για παράδειγμα, φέρεται να καταστέλει την ανάπτυξη όγκου μέσω ενεργοποίησης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF (TGF: Transforming Growth Factor) στον καρκίνο του προστάτη [279]. Παρά το μοτίβο της συσχετιστικής έκφρασης και τα δεδομένα από κυτταροκαλλιέργειες, οι ανασταλτικές επιδράσεις αυτών των καλλικρεϊνών παραμένουν αμφιλεγόμενες.

Οι καλλικρεΐνες ενδέχεται να προωθούν την αγγειογένεση, άμεσα ή έμμεσα, μέσω των μονοπατιών καλλικρεΐνης – κινίνης και των μονοπατιών uPA/uPAR. Η ενεργοποίηση του συστήματος καλλικρεΐνης – κινίνης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενεργών πεπτιδίων κινίνης. Η ενεργή κινίνη επάγει την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών cAMP, Akt/PKB και VEGF και μέσω καταστολής των μονοπατιών JNK και TGFâ. Εναλλακτικά, οι καλλικρεΐνες επάγουν την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης του τύπου μονοπατιού uPA/uPAR. Από την άλλη, αρκετές καλλικρεΐνες, για παράδειγμα η 3, η 6 και η 13, έχουν αποδειχθεί να ειναι αντι-αγγειογενετικές. Αυτές φέρονται να αποτρέπουν την αγγειογένεση, κυρίως μέσω κλασματοποίησης του πλασμινογόνου σε συστατικά που ομοιάζουν την αγγειοστατίνη [280].

Τα καρκινικά κύτταρα για να δημιουργήσουν μετάσταση θα πρέπει να διεισδύσουν στους γύρω ιστούς και να έχουν πρόσβαση στο κυκλοφορικό σύστημα. Η μη σωστά ρυθμισμένη έκφραση των καλλικρεϊνών ή/και η ενεργοποίησή τους ενέχεται σε διάφορα σημαντικά βήματα της διείσδυσης του όγκου. Για παράδειγμα, οι καλλικρεΐνες ενέχονται στην αποδόμηση και ανασύσταση του εξωκυττάριου στρώματος, βήμα αναγκαίο για τη διείσδυση του όγκου. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να αλλάξουν μόνιμα από στατικά επιθηλιακά κύτταρα σε μεταναστευτικά μεσεγχυματικά κύτταρα για να μπορέσουν να διεσδύσουν. Σημαντικές ερευνητικές δουλειές στο παρελθόν έδειξαν ότι οι καλλικρεΐνες 3 και 4 ενέχονται στη μετατροπή από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό ιστό, σε προστατικά καρκινικά κύτταρα [176, 281]. Επιπρόσθετα δεδομένα δείχνουν τον ρόλο αρκετών καλλικρεϊνών στη διείσδυση καρκινικών κυττάτων στα οστά, μέσω μιας οστεοβλαστικής διαδικασίας μετάστασης [282, 283]. Για παράδειγμα, άμεση ένεση KLK3 ή καρκινικών προστατικών κυττάρων που παράγουν KLK3 σε οστό ενήλικου ανθρώπου, προκαλεί αυξημένη οστεοβλαστική διαφοροποίηση και μειωμένη οστεοκλαστική σε ποντίκια με απενεργοποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, πρόδρομα οστεοκλαστικά κύτταρα ποντικού στα οποία έγινε επεξεργασία με ΚLK3 εμφανίζουν σημαντική απόπτωση επαγόμενη από αυτήν. Αυτό που προτείνεται, λοιπόν, είναι ότι οι καλλικρεΐνες επάγουν την

επανασύσταση του οστού μέσω της ενεργοποίησης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β2 TGFβ2.

1.10.9.2. Παθοβιολογία των καλλικρεϊνών σε άλλες περιπτώσεις

Υπάρχουν συσσωρευμένα δεδομένα που συνδέουν τη λανθασμένη έκφραση ή/και την προτεωλυτική δράση των καλλικρεϊνών με διάφορες μη νεοπλασματικές παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, η έκφραση ορισμένων καλλικρεϊνών ειναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με το σύνδρομο απολέπισης δέρματος [284]. Επιπλέον, η μη παρεμποδισμένη πρωτεόλυση των καλλικρεϊνών 5 και 7 εκτιμάται ότι ειναι η κύρια αιτία της υπερ-απολέπισης, που παρατηρείται στο σύνδρομο Netherton [285-287]. Επίσης, όπως αναφέρεται παραπάνω, οι καλλικρεΐνες ενέχονται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες στο ΚΝΣ, και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ενέχονται σε μια σειρά νευροαποδομητικών διαταραχών [288]. Επίσης, τα μοτίβα έκφρασης των καλλικρεϊνών 6, 7 και 10 έχει δειχθεί ότι ειναι τροποποιημένα σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως το Alzheimer (AD) [289] και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες. Τέλος, η λανθασμένη σηματοδότηση καλλικρεΐνης-κινίνης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε μια σειρά παθολογικών διαδικασιών όπως τη φλεγμονή, την υπέρταση, και παθήσεις των νεφρών.

1.10.10. Θεραπευτικές εφαρμογές των ανθρώπινων καλλικρεϊνών

Όπως τονίσθηκε και παραπάνω στην ανάλυση της φυσιολογικής και παθολογικής λειτουργίας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών, οι τελευταίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες. Μέχρι σήμερα, στην κλινική πρακτική το γονίδιο *KLK3*/PSA είναι αυτό που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως ένας πολύτιμος διαγνωστικός καρινικός δείκτης για τη διάγνωση και την παρακολούθηση του καρκίνου του προστάτη. Ωστόσο, με την πρόσφατη ανάπτυξη ευαίσθητων ανοσολογικών μεθόδων, έχει δειχθεί ότι και άλλες καλικρεΐνες μπορούν να χρησιμεύσουν ως επιπρόσθετοι ή εναλλακτικοί προγνωστικοί ή διαγνωστικοί δείκτες. Μελετες έχουν δείξει ότι πολλές καλλικρεΐνες μπορούν να αποτελέσουν δείκτες για έναν μεγάλο αριθμό καρκινωμάτων, όπως για πληθώρα μη νεοπλασματικών ασθενειών. Μέχρι στιγμής, 13 μέλη της οικογένειας έχουν μελετηθεί αρκετά, ώστε να έχουν προταθεί για αυτά πιθανοί ρόλοι ως βιοδείκτες [290].

Δεδομένης της ευρύτητας του φάσματος των καλλικρεϊνικών λειτουργιών, αυτή η ενζυμική οικογένεια θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μία ομάδα πολλά υποσχόμενων νέων στόχων για θεραπευτικές προσεγγίσεις. Έως σήμερα, έχουν ανιχνευθεί και ερευνηθεί αρκετές νέες στρατηγικές. Για παράδειγμα, με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά των μη ειδικών ενδογενών σερπινών, έχουν κατασκευασθεί ειδικοί συνθετικοί αναστολείς της KLK2 και KLK14 [291, 292]. Επιπρόσθετα, η υψηλής ανάλυσης σάρωση γενομικών βιβλιοθηκών και πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων που λαμβάνει χώρα έχει ως σκοπό την αναγνώριση νέων στοιχείων που συσχετίζονται με την καλλικρεϊνική έκφραση ή λειτουργία. Τέλος, δεδομένης της ιστικής ειδικότητας ορισμένων καλλικρεϊνών, ιδιαίτερα όσον αφορά την KLK3, πολλές εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν προταθεί σχετικά με το σημείο στόχο. Για παράδειγμα, τα κυτταροτοξικά φάρμακα τα οποία είναι συζευγμένα με πεπτιδικούς φορείς ειδικούς για την καλλικρεΐνη 3 έχουν σχεδιαστεί ως προφάρμακα για στόχευση του όγκου στον καρκίνο του προστάτη. Επιπλέον, αρκετές κυτταρομειωτικές στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν ένα εξωγενές γονίδιο «αυτοκτονίας» μέσω ειδικών στοιχείων μεταγραφικής ρύθμισης που συνδέεται με το KLK3. Τέλος, έχει προταθεί ένας αριθμός προσεγγίσεων ανοσοτροποποιητικής θεραπείας, κυρίως για την τόνωση της ειδικής στην KLK3 απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων, προκειμένου να αυξηθεί η ανοσολογική απόκριση έναντι καρκινικών κυττάρων του προστάτη.

1.11. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Απόπτωση)

Η απόπτωση, ή «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος», συνδέεται με ένα σύνολο βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στα αρχικά στάδια της απόπτωσης, τα κύτταρα γίνονται στρογγυλά, χάνουν την επαφή με τα γειτονικά τους κύτταρα και συρρικνώνονται. Στο κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο διαστέλλεται και οι κρύπτες διογκώνονται, σχηματίζοντας κυστίδια και κενοτόπια. Στον πυρήνα, η χρωματίνη συμπυκνώνεται, σχηματίζει πυκνά και συμπαγή συσσωματώματα, και υφίσταται πέψη μεταξύ των νουκλεοσωμάτων από ενδονουκλεάσες, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό πρότυπο «κλίμακας DNA», που παρατηρούμε κατά την ηλεκτροφόρηση απομονωμένου ολικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης [293]. Ο πυρήνας αποκτά σχήμα ελικοειδές και διαιρείται τμηματικά δημιουργώντας αρκετά θραύσματα, τα οποία εγκολπώνονται μέσα στα νεοσχηματιζόμενα αποπτωτικά σωμάτια. Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη οι κυτταρικές διασυνδέσεις διαλύονται και δημιουργούνται τοπικές περιελίξεις, δίνοντας έτσι μια εικόνα κυτταροπλασματικής μεμβράνης με «φυσαλίδες» (blebbing). Ω_{ζ} συνέπεια όλων αυτών, το κύτταρο χωρίζεται σε αρκετές μεμβρανικές σφαίρες με «πακεταρισμένο» κυτταρικό υλικό,

κι έτσι σχηματίζονται τα αποπτωτικά σωμάτια διαφόρων μεγεθών [294]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, γίνονται ορισμένες τροποποιήσεις στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες επιτρέπουν στα φαγοκύτταρα την αναγνώριση των αποπτωτικών σωματιδίων. Δεδομένου ότι αυτά περιβάλλονται από άθικτη κυτταροπλασματική μεμβράνη, η απόπτωση συνήθως δεν συνοδεύεται από διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου και φλεγμονή. Αυτή η μορφή φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου είναι μορφολογικά αρκετά διαφορετική από τη νέκρωση. Στην τελευταία, το κύτταρο διογκώνεται και αποσυντίθεται άτακτα, οδηγώντας στην καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων και στη ρήξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με συνέπεια και τη διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου. Η νέκρωση μπορεί, επίσης, να αποτελέσει το τελικό αποτέλεσμα σε καταστάσεις εκτεταμένης απόπτωσης, όπου τα φαγοκύτταρα δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν πλήρως. [295].

Ο μηχανισμός της απόπτωσης συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη μορφογένεση, την ομοιόσταση των ιστών, τη γήρανση, την εξάλειψη κυττάρων μολυσμένων από ιούς, και την καταστροφή αυτοαντιδρώντων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος [296]. Ειδικότερα, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος έχει πρωτεύων ρόλο στο σχηματισμό δομών (δάκτυλα, κοιλότητες σωληνωδών οργάνων), την απαλοιφή δομών (ουρά γυρίνου), τη ρύθμιση του συνολικού αριθμού κυττάρων ενός οργανισμού καθώς και την εξάλειψη κυττάρων με βλάβες, που είναι, πιθανώς, επικίνδυνα για την υγεία [297]. Τα αποπτωτικά κύτταρα εγκολπώνονται και αποικοδομούνται από γειτονικά κύτταρα, χωρίς να αφήνουν ίχνη. Για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών, πρέπει να διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ της αύξησης (που προέρχεται από διαφοροποίηση από προγονικά κύτταρα και από κυτταρικό πολλαπλασιασμό) και της μείωσης (που προέρχεται από περαιτέρω διαφοροποίηση και από κυτταρικό θάνατο) του κυτταρικού πληθυσμού [298]. Πιθανές βλάβες στο μηχανισμό της απόπτωσης, μπορεί να επιβραδύνουν ή ακόμα και να ανακόψουν το φυσιολογικό ρυθμό ανανέωσης των κυττάρων του οργανισμού, προκαλώντας συσσώρευση αυτών και σχηματισμό όγκου [299]. Επιπλέον, ελαττωματικοί αποπτωτικοί μηχανισμοί μπορεί να ευθύνονται για την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπεία, ακτινοβολίες, στέρηση τροφικών παραγόντων, υποξία, οξειδωτικό στρες, και άλλα αίτια που, υπό φυσιολογικές συνθήκες, θα οδηγούσαν τα κύτταρα σε θάνατο [300]. Καταλήγοντας, τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης περιλαμβάνουν το σχηματισμό του αποπτωσώματος και την έναρξη πρωτεολυτικών καταρρακτών, τη μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, το «σφιχτό πακετάρισμα» της χρωματίνης, τη συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος, τη

συρρίκνωση του κυττάρου, τον κατακερματισμό του DNA, το σχηματισμό μεμβρανικών «φυσαλίδων», την πρωτεόλυση της poly(ADP-ριβόζη)-πολυμεράσης (PARP), και το σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων, που θα φαγοκυτταρωθούν στη συνέχεια από γειτονικά κύτταρα, γεγονός που εμποδίζει την πυροδότηση φλεγμονώδους αντίδρασης [296, 301].

Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στη ρύθμιση και την εκτέλεση της απόπτωσης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια. Με την κατανόηση των μηχανισμών αυτών, ίσως οδηγηθούμε στην «αποκρυπτογράφηση» της παθοβιολογίας του καρκίνου και την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων, με στόχο την αντιμετώπιση της έμφυτης ιδιότητας των καρκινικών κυττάρων να αντιστέκονται στην απόπτωση, η οποία και ενδεχομένως θα οδηγήσει στη βελτίωση της θεραπείας του καρκίνου [302, 303].

1.11.1. Ρόλος των κασπασών στην απόπτωση

Υπεύθυνες για αυτές τις μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα και περιγράφονται συνολικά με τον όρο «απόπτωση» είναι οι πρωτεάσες, και πιο συγκεκριμένα η ενεργοποίηση μιας οικογένειας ενδοκυτταρικών πρωτεασών κυστεΐνης, που διασπούν τα υποστρώματά τους σε καρβοζυτελικά κατάλοιπα ασπαρτικού. Οι πρωτεάσες αυτές ονομάζονται κασπάσες (Caspases, cysteine aspartyl-specific proteases) [304]. Οι κασπάσες υπάρχουν ως ανενεργά ζυμογόνα σε όλα τα ζωικά κύτταρα και ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση σε εξελικτικά συντηρημένα κατάλοιπα ασπαρτικού (Asp), όταν ληφθούν συγκεκριμένα ερεθίσματα από τα κύτταρα,. Κατά την ενεργοποίησή τους, οι προ-πρωτεΐνες διασπώνται πρωτεολυτικά, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των μεγάλων (~20 kDa) και των μικρών (~10 kDa) υπομονάδων των ενεργών ενζύμων, καθώς αποκόπτεται ένα αμινοτελικό πεπτίδιο από την επεξεργασμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι ενεργές ενζυμικές μορφές των κασπασών είναι ετεροτετραμερείς και αποτελούνται από δύο μεγάλες και δύο μικρές υπομονάδες, με δύο ενεργά κέντρα ανά μόριο [305, 306].

Το γεγονός ότι οι κασπάσες διασπούν τα υποστρώματά τους σε κατάλοιπα ασπαρτικού, αλλά και ότι ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση επίσης σε κατάλοιπα ασπαρτικού, καθιστά εμφανές ότι αυτές οι πρωτεάσες συνεργάζονται σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες στους οποίους ορισμένες ενεργοποιούν τον εαυτό τους, αλλά και άλλες κασπάσες. Στον άνθρωπο η οικογένεια των κασπασών περιλαμβάνει 11 μέλη, τα οποία μπορούν ταξινομούνται και σύμφωνα με την ομολογία τους, σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, αλλά και σύμφωνα με την υποστρωματική τους εξειδίκευση. Λειτουργικά, οι

κασπάσες διακρίνονται σε αρχικές κασπάσες-εκκινητές (upstream "initiator" caspases) και επιτελικές κασπάσες-εκτελεστές (downstream "effector" caspases) [307]. Οι πρόδρομες μορφές των αρχικών κασπασών διαθέτουν μεγάλα αμινοτελικά πεπτίδια, τα οποία αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που πυροδοτούν την ενεργοποίηση των κασπασών. Αντιθέτως, οι πρόδρομες ανενεργές μορφές των εκτελεστικών κασπασών διαθέτουν μόνο μικρά αμινοτελικά πεπτίδια, τα οποία δε διαθέτουν κάποιο λειτουργικό ρόλο. Υπάρχει μια εξάρτηση των επιτελικών κασπασών από τις αρχικές κασπάσες, όσον αφορά την πρωτεολυτική τους επεξεργασία και την ενεργοποίησή τους. Στα υποστρώματα των εκτελεστικών κασπασών συμπεριλαμβάνονται πρωτεϊνικές κινάσες (των οποίων οι ανασταλτικές ρυθμιστικές περιοχές διαχωρίζονται έτσι από τις καταλυτικές περιοχές) και άλλες πρωτεΐνες μεταγωγής σημάτων, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και του εσωτερικού του πυρήνα, πρωτεΐνες τροποποίησης της χρωματίνης (λ.χ. πολυμεράση της πολυ-ADPριβόζης) και επιδιόρθωσης DNA, καθώς και ανασταλτικές υπομονάδες των ενδονουκλεασών (πρωτεΐνες της οικογένειας CIDE) [305-307].

Σε πολλούς ανθρώπινους κακοήθεις όγκους έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις που οδηγούν σε αδρανοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν κασπάσες. Για παράδειγμα, η ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου CASP3 ταυτοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7 [308]. Παρομοίως, σε νευροβλάστωμα και μερικούς άλλους τύπους συμπαγών όγκων έχουν ανευρεθεί παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές στο γονίδιο της κασπάσης 8 (caspase 8, CASP8), καθώς επίσης και γονιδιακή σίγαση (gene silencing) σε συνδυασμό με υπερμεθυλίωση νησίδων CpG [309, 310]. Μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης που διακόπτουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) του γονιδίου της κασπάσης 5 (CASP5), έχουν βρεθεί σε νεοπλασίες του παγέος εντέρου που έχουν μικροδορυφορική αστάθεια. Η μικροδορυφορική αστάθεια, η οποία συνδέεται με μεταλλάξεις σε ομοπολυμερικές επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε όλο το γονιδίωμα, προκαλείται από έλλειψη ενζύμων υπεύθυνων για την επιδιόρθωση του DNA [311]. Από τα προηγούμενα προκύπυει ότι οι σχετιζόμενες με τον καρκίνο μεταλλάξεις στα γονίδια των κασπασών, συμβάλλουν πιθανότατα στην ανθεκτικότητα των κυττάρων στην απόπτωση. Πάραυτα, επειδή η ανθρώπινη οικογένεια των κασπασών αποτελείται από πολλά μέλη, αυτές οι βλάβες δεν αποτρέπουν την απόπτωση, επιτρέποντας τη λειτουργία εναλλακτικών αποπτωτικών μονοπατιών [58].

1.11.2. Μονοπάτια ενεργοποίησης κασπασών

Είναι γνωστά αρκετά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση κασπασών, χωρίς όμως να γνωρίχουμε κάθε λεπτομέρεια για ορισμένα από αυτά. Το πιο απλό μονοπάτι ενεργοποίησης κασπασών απαντάται στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (cytotoxic T cells, CTL) και στα φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells, NK), τα οποία εισάγουν πρωτεάσες που προκαλούν απόπτωση, και ειδικά το κοκκιοένζυμο B (granzyme B), σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα των κυττάρων-στόχων με μηχανισμούς εξαρτώμενους από την περφορίνη [312]. Το κοκκιοένζυμο B είναι μια πρωτεάση σερίνης, η οποία κόβει τα υποστρώματά της σε κατάλοιπα ασπαρτικού (Asp), όπως κάνουν και οι κασπάσες, οι οποίες όμως είναι πρωτεάσες κυστεΐνης. Το κοκκιοένζυμο είναι ικανό να κόβει και να ενεργοποιεί πολλές κασπάσες και μερικά υποστρώματα των κασπασών [313]. Έχουν ταυτοποιηθεί και ιικοί αναστολείς του κοκκιοένζυμου B, οι οποίοι προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αυτόν τον επαγωγό απόπτωσης [314-316].

Ένα άλλο μονοπάτι ενεργοποίησης κασπασών εκπροσωπείται από τους υποδοχείς των μελών της οικογένειας του TNF. Οκτώ από τους περίπου 30 υποδοχείς των μελών της οικογένειας TNF του ανθρώπου διαθέτουν μια δομική περιοχή θανάτου (DD) στην κυτταροπλασματική τους ουρά [317]. Όταν οι υποδοχείς αυτοί δεσμευθούν από κατάλληλους προσδέτες, πραγματοποιείται συνάθροιση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια και στρατολόγηση αρκετών ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, λ.χ. προ-κασπασών, στις κυτταροπλασματικές δομικές περιοχές αυτών των υποδοχέων, σχηματίζοντας ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου (death-inducing signaling complex, DISC), το οποίο πυροδοτεί την ενεργοποίηση κασπασών (κασπάση 8 και ενίοτε κασπάση 10), οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση [318, 319].

Σημαντικό ρόλο στην απόπτωση διαδραματίζουν και τα μιτοχόνδρια, τα οποία απελευθερώνουν κυτόχρωμα C στο κυτταρόπλασμα, το οποίο πυροδοτεί το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου ενεργοποίησης κασπασών, γνωστό ως αποπτώσωμα [320, 321]. Τη βάση του αποπτωσώματος αποτελεί η πρωτεΐνη APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1), η οποία ολιγομερίζεται μετά την πρόσδεση του κυτοχρώματος c, και στη συνέχεια προσδένει ειδικά την προ-κασπάση 9, ενεργοποιώντας την. Ο APAF1 και η προ-κασπάση 9 αλληλεπιδρούν μέσω των επικρατειών στράτευσης κασπασών (CARDs,) που διαθέτουν. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ CARDs είναι πολύ σημαντικές στα αποπτωτικά μονοπάτια.

Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν επίσης σε μονοπάτια κυτταρικού θανάτου επαγόμενα από υποδοχείς μελών της οικογένειας TNF, μέσω μηχανισμών «ενδοκυτταρικής συνομιλίας», στα οποία συμμετέγουν πρωτεΐνες όπως οι BID, BAR και BAP31 [322-325]. Πάραυτα, στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους τόσο το μιτοχονδριακό (ενδογενές) μονοπάτι όσο και το μονοπάτι υποδοχέων θανάτου (εξωγενές) μπορούν να προκαλούν την ενεργοποίηση κασπασών και να οδηγούν σε απόπτωση, ανεξάρτητα το ένα από το άλλο [326]. Εκτός από το κυτόχρωμα ς, από τα μιτοχόνδρια απελευθερώνονται και άλλες σχετικές με την απόπτωση πρωτεΐνες, όπως ενδονουκλεάση G, ένας ενεργοποιητής των πυρηνικών ενδονουκλεασών που φέρει το όνομα AIFM1 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1), $\alpha\lambda\lambda\dot{\alpha}$ και αναστολείς της απόπτωσης (inhibitors of apoptosis, IAPs) μπλοκάροντας τη δράση των κασπασών, π.χ. BIRC2 (cIAP1), BIRC3 (cIAP2), XIAP, και BIRC5 (Survivin) [301]. Η πρωτεΐνη BIRC5 (Survivin) εκφράζεται υψηλά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς και στους περισσότερους στερεούς όγκους, όχι όμως και σε φυσιολογικούς ιστούς ενήλικα. Τέλος, τα μιτοχόνδρια ελέγχουν και εξαρτώμενα και μη εξαρτώμενα από κασπάσες μονοπάτια απόπτωσης. Τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται από ποικίλα ερεθίσματα, όπως στέρηση αυξητικών παραγόντων, οξειδωτικά, υπερφόρτωση Ca2+, παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, και φάρμακα που τροποποιούν τους μικροσωληνίσκους [320, 327].

1.11.3. Οικογένεια BCL2

Τα μέλη της οικογένειας BCL2 εμπλέκονται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Διακρίνονται σε προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη, ανάλογα με το αν προάγουν ή παρεμποδίζουν την απόπτωση, αντίστοιχα [328]. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των μελών της οικογένειας BCL2 είναι ότι περιέχουν μία έως τέσσερις εξελικτικά συντηρημένες περιοχές, οι οποίες έχουν μεγάλη δομική ομοιότητα και αρκετά υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες δομικές περιοχές της πρωτεΐνης BCL2, που είναι η πρώτη πρωτεΐνη που μελετήθηκε δομικά. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται BH1 (BCL2homology region 1), BH2, BH3, και BH4 [329]. Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί 24 μέλη της γονιδιακής οικογένειας BCL2. Ορισμένα γονίδια της οικογένειας BCL2 κωδικοποιούν, μέσω εναλλακτικής συρραφής του RNA, δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες, οι οποίες ασκούν ορισμένες φορές αντίθετη επίδραση στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου γονιδίου αποτελεί το BCLX (BCL2L1), το οποίο μπορεί να κωδικοποιεί την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη BCLX_L και/ή την προαποπτωτική πρωτεΐνη BCLX_s [330]. Μελέτες γονιδιακής απαλοιφής σε ποντίκια έχουν δείξει ότι κάθε μέλος της οικογένειας BCL2 διαδραματίζει *in vivo* μοναδικό ρόλο στον έλεγχο της επιβίωσης των κυττάρων. Οι μελέτες αυτές έρχονται σε συμφωνία με το ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών και/ή το συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον που απαιτείται για τη δράση τους. Τέλος, οι σχετικές αναλογίες των μελών της οικογένειας BCL2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο υπαγορεύουν την ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα των κυττάρων σε διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα, όπως στέρηση τροφικών παραγόντων, υποξία, ακτινοβολία, αντικαρκινικά φάρμακα, οξειδωτικούς παράγοντες, και υπερφόρτωση με Ca²⁺ [328, 331].

1.11.4. Ταξινόμηση των μελών της οικογένειας BCL2

Τα μέλη της οικογένειας BCL2 κατηγοριοποιούνται σε δύο υποομάδες, με βάση την πειραματικά προσδιορισμένη ή προβλεπόμενη τριτοταγή δομή τους [332]. Η μια υποομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες που έγουν δομικές περιογές με δομή α-έλικας [333-336] και αποτελείται τόσο από τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2, δηλαδή από τις πρωτεΐνες BCL2 [337], BCLX_L (ισομορφή 1 της BCL2L1) [330], BCLW (BCL2L2) [338], BCL-B (BCL2L10), BOO (ή DIVA) [339], MCL1 (BCL2L3) [340], και BCL2A1 (BCL2L5 ή BFL1) [341], όσο και από ορισμένα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας, δηλαδή από τις BAX (BCL2L4) [342], BAK1 (BAK ή BCL2L7) [343], BOK (BCL2L9) [344], και BCLX_S (ισομορφή 2 της BCL2L1) [345]. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν μια διαμεμβρανική δομική περιογή στο υδρόφοβο καρβοξυτελικό τους άκρο, γάρη στην οποία μπορούν και σχηματίζουν διαύλους ιόντων σε συνθετικές μεμβράνες in vitro [346-350]. Μελέτες σχετικές με την ενδοκυτταρική τους τοπολογίας έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές, in vivo, ενσωματώνονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [351-353]. Η πρωτεΐνη BCL2 ενσωματώνεται, επίσης, και στην πυρηνική μεμβράνη καθώς και τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου [351]. Επιπλέον, οι περισσότερες πρωτεΐνες της συγκεκριμένης υποομάδας αναγνωρίζονται μέσω των τοπικά ομόλογων αμινοξικών αλληλουχιών τους, και ειδικότερα μέσω των δομικών περιοχών BH1, BH2, BH3 και, ενίοτε, της BH4 [329].

Η άλλη υποομάδα απαρτίζεται από προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 τα οποία φέρουν μόνο τη συντηρημένη δομική περιοχή BH3 (BH3-only proteins), δηλαδή από τις BAD (BCL2L8) [354], BIK (NBK) [355], BID [356], HRK (DP5) [357], BIM (BCL2L11 ή BOD) [358], BMF [359], NOXA (PMAIP1 ή APR) [360], PUMA (BBC3) [361], BNIP1, BNIP2 και BNIP3 [362]. Πρόσφατες αναλύσεις αλληλουχιών υποδεικνύουν ότι τα μέλη της συγκεκριμένης υποομάδας, εκτός από την BID, έχουν προβλεπόμενες δευτεροταγείς ή προσδιορισμένες τριτοταγείς δομές, οι οποίες όμως δεν έχουν καμία σχέση με τη δομή των κύριων πρωτεϊνών της οικογένειας BCL2. Η μόνη ομολογία που έχουν με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας είναι η δομική περιοχή BH3, η οποία πιθανότατα προέκυψε λόγω εξελικτικής σύγκλισης [363]. Κατ'εξαίρεση, η πρωτεΐνη BID, παρότι δανήκει σ'αυτή την υποομάδα, έχει την ίδια στερεοδιαμόρφωση με τις πρωτεΐνες BCL2, BCLX_L, και BAX [333, 335]. Τέλος, υπάρχουν κάποια προσφάτως ανακαλυφθέντα μέλη της οικογένειας BCL2 [364], BCL-RAMBO (BCL2L13) [365], BCLG (BCL2L14) [366], και BFK (BCL2L15) [367]), των οποίων ο ρόλος δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως.

1.11.5. Ρόλος των μελών της οικογένειας BCL2 στην απόπτωση

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2 διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Οι πρωτεΐνες BCL2, BCLX_L, BAK1, και πολλά άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, διαθέτουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μια αλληλουχία υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων, με την οποία αγκυροβολούν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [320]. Άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, λ.χ. οι πρωτεΐνες BID, BIM και BAD, δε διαθέτουν αυτές τις υδρόφοβες αλληλουχίες, αλλά μεταναστεύουν στα μιτοχόνδρια ως απόκριση σε ειδικά ερεθίσματα. Τέλος, υπάρχουν ορισμένα μέλη της οικογένειας BCL2 που διαθέτουν αυτή την υδρόφοβη αλληλουχία, η οποία, όμως, παραμένει θαμμένη στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια ύστερα από ειδικά ερεθίσματα (λ.χ. BAX) [364].

Τα προαποπτωτικά διαμεμβρανικά μέλη BAX και BAK1 είναι τα σημαντικότερα μόρια για την επαγωγή της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και της επακόλουθης απελευθέρωσης μορίων (λ.χ. κυτόχρωμα C και DIABLO) που οδηγούν στην απόπτωση [365]. Κατά την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια, οι πρωτεΐνες BAX και BAK1 επάγουν τον κατακερματισμό των μιτοχονδρίων σε πολυάριθμα μικρά κυστίδια, γεγονός που φανερώνει τη σχέση μεταξύ της διαίρεσης των μιτοχονδρίων και των λειτουργιών των μελών της οικογένειας BCL2 [366]. Τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2, όπως το BCL2 και το BCLX, καταστέλλουν τη λειτουργία των BAX και BAK1 [367]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες που φέρουν μόνο τη BH3 περιοχή, αίρουν την καταστολή αυτή με την πρόσδεσή τους στα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας, και τα παρεμποδίζουν με trans-επικρατή τρόπο [368-370]. Σύμφωνα με ένα άλλο μοντέλο, ορισμένες πρωτεΐνες που φέρουν μόνο τη BH3 περιοχή (ιδίως οι BIM, tBID και PUMA) διαμεσολαβούν στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών BAX και BAK1 [371]. Συγκεκριμένα για τη βραχυμένη πρωτεΐνη tBID (truncated BID), η οποία προκύπτει από πρωτεόλυση της BID από την ενεργοποιημένη κασπάση 8, φαίνεται πως μπορεί να διμερίζεται τόσο με προαποπτωτικές (BAX και BAK1) όσο και με αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (BCL2 και BCLX_L) [356, 372]. Η πρόσδεση της tBID στις BAX και BAK1 προκαλεί τη διαμεμβρανοποίηση και τον ολιγομερισμό τους, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγάλων διαύλων που επιτρέπουν την έξοδο αποπτωγόνων μορίων από το μιτοχόνδριο προς το κυτταρόπλασμα [373, 374].

Υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας BCL2 είναι η συντηρημένη δομική περιοχή BH3. Πρόκειται για μια από μια αμφιπαθική α-έλικα μήκους 16 αμινοξικών καταλοίπων, η οποία όταν εισέρχεται σε μια υδρόφοβη σχισμή στην επιφάνεια των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών τις ρυθμίζει κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να προάγεται η απόπτωση. Κατά συνέπεια, μεταλλάξεις στη δομική επικράτεια BH3 των πρωτεϊνών BAD, BIK, BIM, BCLG_S και HRK, που καθιστούν αδύνατη την πρόσδεση των εν λόγω πρωτεϊνών σε άλλα μέλη της οικογένειας BCL2, καταργούν τον προαποπτωτικό τους χαρακτήρα [375].

1.11.6. Σχέση μεταξύ της οικογένειας BCL2 και του καρκίνου

Οι μεταβολές σε πρωτεϊνικό επίπεδο των μελών της οικογένειας BCL2, και συγκεκριμένα αυξημένα επίπεδα αντιαποπτωτικών μορίων και/ή μειωμένα των προαποπτωτικών, έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο [376].Το ιδρυτικό μέλος της οικογένεια, το αντιαποπτωτικώ γονίδιο BCL2, ενεργοποιείται από χρωμοσωμικές μετατοπίσεις στην πλειοψηφία των λεμφωμάτων non-Hodgkin και υπερεκφράζεται, εμποδίζοντας την επαγόμενη, από τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, απόπτωση [377, 378]. Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει από την ενεργοποίηση του γονιδίου BCL2 και σε πολλούς στερεούς όγκους [379]. Αντίστροφα, στο προαποπτωτικό γονίδιο BAX έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινους όγκους μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss-of-function) [380]. Μελέτες σε knock-out ποντίκια (Bax-/-) έχουν δείξει ότι το γονίδιο έχει ογκοκατασταλτική δράση *in vivo* [381]. Η μεταγραφή του γονιδίου BAX στον άνθρωπο ρυθμίζεται άμεσα από την πρωτεΐνη p53, ενισχύοντας τη σύνδεση αυτής της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης με αποπτωτικά μονοπάτια [382].

Τα μέλη της οικογένειας BCL2 φαινεται να εμπλέκονται στην παθοβιολογία και την εξέλιξη του καρκίνου, αποτελώντας έτσι πιθανούς βιοδείκτες σε αρκετούς τύπους

κακοήθειας [383]. Η έκφραση του BCL2 έχει προγνωστική αξία για τον καρκίνο του πνεύμονα [384-386], του μαστού [387], του προστάτη [388, 389], του παχέος εντέρου [390], και τη λευχαιμία [391-393]. Συγκεκριμένα, ασθενείς που πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC) και φέρουν BCL2-θετικούς όγκους, έχουν στατιστικώς σημαντικά καλύτερη πρόγνωση από εκείνους που φέρουν BCL2αρνητικούς όγκους NSCLC [384]. Επιπλέον, η υπερέκφραση του γονιδίου BCL2 σε NSCLC κύτταρα Η460 έχει αποδειχτεί ότι μπλοκάρει την απόπτωση που επάγεται από την κυτταροκίνη TNFSF10 (TRAIL, APO-2L, ή CD253) [394]. Αλλαγές των σχετικών επιπέδων έκφρασης διαφόρων μελών της οικογένειας BCL2 φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου στον καρκίνο του μαστού [395, 396]. Για παράδειγμα, μειωμένη έκφραση του προαποπτωτικού γονιδίου ΒΑΧ έχει συσγετισθεί με κακή πρόγνωση [397, 398]. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης διάφορων γονιδίων της οικογένειας BCL2 φαίνεται να καθορίζουν την απόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία [302, 303]. Αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών BAX και BCLXs έχει βρεθεί ότι ευαισθητοποιούν καρκινικά κύτταρα μαστού στη χημειοθεραπεία [387]. Επιπρόσθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης BCL2 αποτελεί ευμενή προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού, καθώς οι BCL2-θετικές νεοπλασίες μαστού παρουσιάζουν μια ικανοποιητική ανταπόκριση του στην ορμονοθεραπεία [399, 400]. Μάλιστα, η έκφραση της πρωτεΐνης BCL2 συνδέεται στενά με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων και καταστέλλεται από ανταγωνιστές των οιστρογονικών υποδοχέων όπως το tamoxifen, προάγοντας έτσι την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [387].

Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως η υπερέκφραση του γονιδίου BCL2 σχετίζεται με ανοχή στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία [383]. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα mRNA και/ή πρωτεΐνης που παράγονται από το γονίδιο BCL2 σχετίζονται με υποτροπή της νόσου και βραχεία ολική επιβίωση σε ασθενείς με οξεία μυελοειδή λευχαιμία, καθώς υποδεικνύουν κακή απόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [391, 392, 401]. Σε πολλούς τύπους καρκίνου φαίνεται ότι πιθανή απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης BCL2 οδηγεί σε προστασία των καρκινικών κυττάρων από τη δράση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, όπως γλυκοκορτικοειδών, αλκυλιωτικών παραγόντων και αναστολέων της τοποϊσομεράσης ΙΙ [402-404]. Αναλόγως, στο διάχυτου τύπου non-Hodgkin λέμφωμα μεγάλων Β-λεμφοκυττάρων η έκφραση των πρωτεϊνών BCL2, BCLX και BAX, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, έχει συσχετιστεί με ανοχή στη χημειοθεραπεία και σύντομο χρονικό διάστημα επιβίωσης [405, 406]. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα στοχεύουν στην αύξηση της έκφρασης του γονιδίου BAX,

προκειμένου να εμποδίσουν την εξέλιξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, όλοι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες της ομάδας των ανθρακυκλινών στοχεύουν στην ενίσχυση της έκφρασης της πρωτεΐνης BAX για την καταπολέμηση του καρκίνου [407].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η πιο συχνή κακοήθης πάθηση του πεπτικού συστήματος σε ΗΠΑ και Ευρώπη. Στη χώρα μας, ο καρκίνος του παχέος εντέρου καταλαμβάνει την τέταρτη θέση των αιτιών θανάτου από νεοπλάσματα. Έχουν αναγνωριστεί αρκετοί προγνωστικοί δείκτες και δείκτες πρόβλεψης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αν και πολύ λίγοι από αυτούς χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη.

Το γονίδιο της *KLK10* είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να αξιολογηθεί ο πιθανός ρόλος της KLK10 ως καρκινικός δείκτης. Λόγω των υψηλότερων επιπέδων της στους καρκινικούς ιστούς και στον ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, έχει προταθεί ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο των ωοθηκών, σε συνδυασμό με τον ήδη χρησιμοποιούμενο δείκτη CA125.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη και κλινική αξιολόγηση του γονιδίου *KLK10* σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεῒνης, για πιθανή εφαρμογή του ως νέο προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς και ως δείκτη πρόβλεψης κατάλληκης θεραπευτικής αγωγής ή/και απόκρισης στη θεραπεία.

Πραγματοποιήθηκε συλλογή στατιστικά σημαντικού αριθμού καρκινικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών παχέος εντέρου, και κατασκευάστηκε λεπτομερής βάση δεδομένων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά κάθε ασθενή. Η μελέτη της έκφρασης mRNA του γονιδίου KLK10 έγινε με συμβατική RT-PCR και με μεθοδολογία ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR), και η ανίχνευση της πρωτεῒνης KLK10, έγινε με ανοσοδοκιμασία ELISA. Δεν υπάρχουν και δεν χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα kit για τους παραπάνω προσδιορισμούς αλλά πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας των τεχνικών που αναπτύχθηκαν ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των προσδιορισμών. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε εκτενής βιοστατιστική ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές μεθοδολογίες, ανάλυση ROC, ανάλυση Kaplan Meier, καθώς και ανάλυση μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής παλινδρόμησης. Ακολούθησε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος ΗΤ-29, και επίδραση με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Μετά το τέλος της επίδρασης με κάθε χημειοθεραπευτικό παράγοντα, ακολούθησε καλλιέργεια των εναπομείνοντων κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό, προκειμένου να αξιολογήσουμε εάν τα κύτταρα συνεχίζουν να αποπίπτουν, απουσία φαρμάκου. Κατόπιν, μελετήθηκαν οι μεταβολές στο προφίλ έκφρασης

mRNA του γονιδίου KLK10, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση, όπως τα BCL2, BCLX, MCL1, BAX, BAK1, BIM, BID, PUMA (BBC3), NOXA (PMAIP1), BIRC5 (Survivin) και P21 (CDKN1A).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βιολογικό υλικό

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής συλλέχθηκαν 3 ομάδες μελέτης. Αρχικά, για τη μελέτη με συμβατική RT-PCR συλλέχθηκαν 194 ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου (119 καρκινικά, 63 παρακείμενα φυσιολογικά και 12 αδενώματα) από 131 ασθενείς, και για τη μελέτη με ELISA που ακολούθησε, χρησιμοποιήσαμε 279 ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου (157 καρκινικά και 122 παρακείμενων φυσιολογικών ιστών) από 157 ασθενείς. Τα ιστολογικά αυτά δείγματα συλλέγθηκαν κατά τη γρονική περίοδο 1996 έως 2007, από ασθενείς που υπέστησαν χειρουργική εξαίρεση καρκινώματος παγέος εντέρου στο Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας». Για τη μελέτη με ποσοτική RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, η ομάδα μελέτης αποτελείτο από 208 ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου, 151 καρκινικά και 57 παρακείμενα μη καρκινικά, και προερχόταν από 151 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση στη Δ' Χειρουργική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη χρονική περίοδο 2000 έως 2010, από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιορδάνη Παπαδόπουλο. Λεπτομερής βάση κλινικοπαθολογικών δεδομένων και δεδομένων επιβίωσης ήταν διαθέσιμη και για τις τρεις ομάδες μελέτης. Όλα τα δείγματα καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C, μέχρι την ομογενοποίησή τους.

2.2. Κυτταροκαλλιέργειες

Ως θετικός μάρτυρας για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή, επιλέχθηκαν κυτταρικές σειρές στις οποίες βρέθηκε να εκφράζεται το γονίδιο της *KLK10*. Οι κυτταρικές αυτές σειρές είναι οι DLD1 και HT29, οι οποίες αποτελούνται από προσκολλώμενα επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου και προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα του ορθοσιγμοειδούς.

Στα κύτταρα HT29, πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της επίδρασης καθιερωμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (σισπλατίνη, δοσεταξέλη, φθοροουρακίλη, οξαλιπλατίνη, και γεμσιταβίνη) και μελετήθηκαν οι μεταβολές στο προφίλ έκφρασης mRNA του γονιδίου της *KLK10*, καθώς και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση, σε μια προσπάθεια ανάπτυξης μιας νέας μοριακής μεθόδου πρόβλεψης κατάλληλου συστηματικού θεραπευτικού χειρισμού για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

2.2.1. Καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου

Σε μια προσπάθεια εξήγησης, αφενός, των αποτελεσμάτων της μελέτης και κλινικής αξιολόγησης της έκφρασης του γονιδίου *KLK10* στον καρκίνο του παχέος εντέρου, και ανάπτυξης, αφετέρου, μιας νέας μοριακής μεθόδου πρόβλεψης κατάλληλου συστηματικού θεραπευτικού χειρισμού του ορθοκολικού καρκίνου, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της επίδρασης καθιερωμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (μεθοτρεξάτη, δοξορουβικίνη, φθοροουρακίλη, συνδυασμός φθοροουρακίλης με λευκοβορίνη, οξαλιπλατίνη, και ιρινοτεκάνη) στο προφίλ έκφρασης mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση, σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκε η κυτταρική σειρά HT-29, η οποία και αποτελείται από προσκολλώμενα επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου και προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα του ορθοσιγμοειδούς.

2.2.1.1. Ιδιότητες της καρκινικής κυτταρικής σειράς DLD-1

Η καρκινική κυτταρική σειρά DLD-1 (αριθμός ATCC: CCL-221) προέρχεται από ορθοκολικό καρκίνο σταδίου C κατά Dukes, που απομονώθηκε από τον D.L. Dexter και τους συνεργάτες του κατά τη χρονική περίοδο 1977-1979 (Εικόνα 2.1). Στην κυτταρική σειρά DLD-1 δεν παρατηρείται έκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων *TP53 (p53,), ABL1, ROS1, SRC* και *MYCN*. Αντιθέτως εκφράζονται τα ογκογονίδια *MYC, KRAS, HRAS, NRAS, TP53, MYB, PDGFB* (platelet-derived growth factor beta polypeptide), και *FOS,* καθώς επίσης το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), η πρωτεΐνη SDCCAG3 (serologically defined colon cancer antigen 3), η κερατίνη, ποικίλες ογκοειδικές πυρηνικές πρωτεΐνες (CC-2, CC-3, CC-4, CC-5 και CC-6), καθώς και διάφορα ισοένζυμα: ερυθροκυτταρική εστεράση D (ES-D), ισομορφή B της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD), πεπτιδάση D (peptidase D, PEPD), αφυδρογονάση του φωσφογλυκομουτάση 3 (PGM3).

 Αριθμός ΑΤCC:
 CCL-221

 Ονομασία:
 DLD-1





1 ημέρα μετά την ανακαλλιέργεια (x10)

Πριν την κατάψυξη (x20)

Εικόνα 2.1. Εικόνα φωτονικού μικροσκοπίου από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων DLD-1, σε χαμηλή πυκνότητα (αριστερά) και υψηλή πυκνότητα (δεξιά) [ATCC].

2.2.1.2. Ιδιότητες της καρκινικής κυτταρικής σειράς ΗΤ-29

Η καρκινική κυτταρική σειρά ΗΤ-29 (αριθμός ATCC: HTB-38) προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, και έχει απομονωθεί από λευκή γυναίκα, ηλικίας 44 ετών (Εικόνα 2.2). Τα κύτταρα HT-29 εκφράζουν τη βιταμίνη D, τον αδρενεργικό υποδοχέα άλφα-2A (alpha-2A-adrenergic receptor, ADRA2A), τον υποδοχέα της ουροκινάσης, χωρίς όμως ανιχνεύσιμη ενεργότητα ενεργοποιητή του πλασμινογόνου,τα ογκογονίδια *MYC*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *MYB*, *PDGFB*, και *FOS*, ενώ δεν εκφράζονται τα πρωτο-ογκογονίδια *MYC*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *MYB*, *PDGFB*, και *FOS*, ενώ δεν εκφράζονται τα πρωτο-ογκογονίδια *MYCN*, *ABL1*, *ROS1*, και *SRC*. Ακόμα, παρατηρείται έκφραση ποικίλων ισοένζυμων: αδενυλική κινάση 1 (AK1), ερυθροκυτταρική εστεράση D (ES-D), ισομορφή B της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), γλυοξαλάση 1 (GLO1), μηλικό ένζυμο 2 (ME2), φωσφογλυκομουτάση 1 (PGM1), και φωσφογλυκομουτάση 3 (PGM3). Τέλος, τα κύτταρα HT-29 παράγουν το εκκριτικό συστατικό της ανοσοσφαιρίνης A (IgA), το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), την πρωτεΐνη LTBP1 (latent transforming growth factor beta binding protein 1), διάφορες μουκίνες, και την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (TP53), σε υψηλά επίπεδα. ATCC Number: HTB-38 Designation: HT-29



Low Density

Scale Bar = 100µm

Scale Bar = 100µm

Εικόνα 2.2. Εικόνα φωτονικού μικροσκοπίου από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων ΗΤ-29, μια μέρα μετά από ανακαλλιέργεια (αριστερά) και πριν την κατάψυξή τους για φύλαξη σε υγρό άζωτο (δεξιά) [JCRB].

2.2.2. Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργειών

Η κυτταρική σειρά DLD-1 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute - 1640) (PAA Laboratories GmbH), το οποίο περιείχε 2 mM L-γλουταμίνη, 1,5 g/L διττανθρακικό νάτριο, 4,5 g/L γλυκόζη, 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο, 10 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] (PAA Laboratories GmbH), 10% FBS, 100 U/mL πενικιλίνη και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη. Η κυτταρική σειρά HT-29 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό McCoy's 5A (PAA Laboratories GmbH), το οποίο περιείχε 1,5 mM Lγλουταμίνη, 10% FBS, 100 U/mL πενικιλίνη και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη. Και οι δύο κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 95% σε αέρα και 5% σε CO2. Στις καλλιέργειες ακολουθήθηκαν τα προτεινόμενα πρωτόκολλα της ATCC.

2.2.3. Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα DLD-1, καθώς και τα κύτταρα HT-29, προσκολλώνται στη φιάλη καλλιέργειας και σγηματίζουν μονόστοιβη επιφάνεια. Για τις καλλιέργειες, γρησιμοποιήθηκαν φιάλες επιφάνειας 75 cm², σε όγκο θρεπτικού υλικού 20 ml. Οι συνθήκες ανακαλλιέργειας είχαν ως εξής: μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από την καλλιέργεια, ακολουθούσαν δύο πλύσεις με 10 mL στείρου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline, PBS, PAA Laboratories GmbH) προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα ορού, ο οποίος αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης. Μετά την απόχυση του διαλύματος PBS, προστίθενται 2,0 mL διαλύματος θρυψίνης (0,25% κ.ό. θρυψίνη και 0,53 mM EDTA, διαλυμένα σε PBS που δεν περιέχει Ca^{2+} και Mg²⁺) και ακολουθεί επώαση σε 37°C για 5 min, προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φιάλης. Μετά το τέλος της επώασης, προστίθενται στη φιάλη 8 mL πλήρους θρεπτικού διαλύματος, με σκοπό την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Κατόπιν, τα 10 mL διαλύματος κυττάρων μεταφέρονται σε στείρους φυγοκεντρικούς σωλήνες όπου και ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1000 g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης και την απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα των κυττάρων που έχει απομείνει στους φυγοκεντρικούς σωλήνες επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μοιράζεται σε νέες φιάλες καλλιέργειας. Κατόπιν προστίθεται επιπλέον πλήρες θρεπτικό υλικό, μέχρι να συμπληρωθεί τελικός όγκος 20 mL ανά φιάλη επιφάνειας 75 cm² και οι φιάλες των κυτταροκαλλιεργειών επωάζονται στις προαναφερθείσες συνθήκες.

2.2.4. Συλλογή καρκινικών κυττάρων για ομογενοποίηση

Το πρωτόκολλο συλλογής καρκινικών κυττάρων είναι το ίδιο με το πρωτόκολλο καλλιέργειας προσκολλώμενων καρκινικών κυττάρων με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στο τελευταίο στάδιο. Στο πρωτόκολλο συλλογής, μετά τη φυγοκέντρηση και την απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα των κυττάρων διαλύεται σε 1 mL TRI Reagent[®] (Ambion Inc.). Ακολουθεί παρατεταμένη ανάδευση και μεταφορά του ομογενοποιήματος σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Eppendorf. Μετά από επώαση 5min σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση RNA. Σε περίπτωση που η εκχύλιση γίνει την επόμενη μέρα, το ομογενοποίημα φυλάσσεται σε θερμοκρασία –80°C.

2.2.5. Διατήρηση προσκολλώμενων καρκινικών κυττάρων σε υγρό άζωτο

Κύτταρα που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης ή πλησιάζουν στη συμπλήρωση μονόστιβου ταπητίου (80-85% κάλυψη της επιφάνειας της φιάλης) και τα οποία βρίσκονται στην 3^η ανακαλλιέργεια από την απόψυξή τους, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ανανεώσιμηςτράπεζας της εκάστοτε κυτταρικής σειράς. Η συγκέντρωση εμφύτευσης των κυττάρων είναι0,5x10⁵ κύτταρα/mL, έτσι ώστε να βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης κατά τη συλλογή τους. Πριν τη συμπλήρωση 72 ωρών, όπου η λογαριθμική αύξηση των κυττάρων ολοκληρώνεται, τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια θρυψίνης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο συλλογής κυττάρων που περιγράφηκε προηγουμένως. Μετά την ακόλουθη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα κάθε φυγοκεντρικού σωλήνα διαλύεται εκ νέου σε 1 mL κρυοπροστατευτικού διαλύματος κατάψυξης κυττάρων (90% FBS και 10% στείρου DMSO). Το κυτταρικό διάλυμα κατόπιν μεταφέρεται σε κρυοφυαλίδια, τα οποία καταψύχονται αμέσως σε θερμοκρασία –80°C, όπου παραμένουν για 24 ώρες. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα, φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (–196°C), όπου και είναι δυνατή η αποθήκευσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η απόψυξη των κυττάρων από το υγρό άζωτο είναι πολύ ευαίσθητη διαδικασία και πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά και γρήγορα ώστε να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, 2 mL πλήρους θρεπτικού υλικού προστίθεται τμηματικά στα κρυοφιαλίδια με ήπια ανάδευση. Αφού ξεπαγώσει το μείγμα, το τοποθετούμε σε στείρο φυγοκεντρικό σωλήνα στον οποίο έχουμε ήδη τοποθετήσει 5 mL πλήρους θρεπτικού μέσου προκειμένου να πετύχουμε αραίωση του διαλύματος κατάψυξης των κυττάρων, το οποίο σε θερμοκρασία δωματίου είναι τοξικό για τα κύτταρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1000 g για 5 λεπτά, απόχυση του υπερκείμενου, και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 8 mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Το κυτταροδιάλυμα μεταφέρεται σε φιάλη επιφάνειας 75 cm², όπου προστίθενται 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και 2 mL ορού. Τέλος, οι κυτταροκαλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν σε σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα περιεκτικότητας 95% σε αέρα και 5% σε CO₂).

2.2.6. Διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης και της βιωσιμότητας των κυττάρων

Προκειμένου να μελετήσουμε την ικανότητα ανάπτυξης των κυττάρων σε μια καλλιέργεια, πρέπει να προσδιορίσουμε τον αριθμό των κυττάρων που διαιρούνται. Έτσι, κύτταρα ΗΤ29 εμφυτεύτηκαν εις τριπλούν σε διάφορες συγκεντρώσεις προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση εκείνη κατά την οποία τα κύτταρα εξακολουθούν να διπλασιάζονται μέχρι ένα μέγιστο 96 ωρών καλλιέργειας. Για τα εν λόγω κύτταρα, η βέλτιστη συγκέντρωση εμφύτευσης βρέθηκε να είναι 3x10⁴ κύτταρα/mL -όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στα αποτελέσματα. Κατόπιν επώασης σε 37°C για 24 ώρες προστέθηκε το εκάστοτε φάρμακο σε διάφορες πάλι συγκεντρώσεις, προκειμένου να προσδιοριστεί το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση εκείνη κατά την οποία το 50% των κυττάρων οδηγείται σε θάνατο, κυρίως μέσω επαγωγής της απόπτωσης. Μετά από διάφορα χρονικά διαστήματα (24h, 48h, και 72h) έκθεσης της κυτταρικής σειράς στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, μετρήθηκε ο αριθμός των ζώντων κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων, δημιουργήθηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του κυτταρικού πληθυσμού απουσία φαρμάκων, εκφράζοντας την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων ΗΤ29, καθώς και παρουσία φαρμάκων, εκφράζοντας την κυτταροστατική ή κυτταροτοξική επίδραση του αντίστοιχου χημειθεραπευτικού.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων αναφέρεται στο ποσοστό των υγιών κυττάρων σε μια κυτταρική καλλιέργεια και προσδιορίζεται με τον έλεγχο της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων (χρωματομετρική μέθοδος MTT) και της δομικής ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (χρωστική μπλε του τρυπανίου).

Η αρχή της χρωματομετρικής μεθόδου MTT βασίζεται στην αναγωγή του MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] σε φορμαζάνη, η οποία γίνεται στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, και καταλύεται από την ηλεκτρική αφυδρογονάση (Εικόνα 2.3) [408]. Με βάση το γεγονός ότι η φορμαζάνη απορροφά σε μήκος κύματος 550-570 nm ενώ το MTT απορροφά στα 400 nm., οι διαφορές στα επίπεδα απορρόφησης που προσδιορίζονται, επιτρέπουν την εκτίμηση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων στην κυτταρική καλλιέργεια, και κατ'επέκταση τη συγκέντρωση του φαρμάκου κατά την οποία το 50% των κυττάρων έχει οδηγηθεί σε θάνατο, σε σχέση πάντα με το μάρτυρα. Ο μάρτυρας είναι η κυτταρική σειρά HT29 απουσία φαρμάκου στην αντίστοιχη χρονική στιγμή της κυτταροκαλλιέργειας που μελετάμε. Ο δείκτης βιωσιμότητας υπολογίζεται από το λόγο της απορρόφησης του δείγματος με φάρμακο προς την απορρόφηση του μάρτυρα.



Εικόνα 2.3. Αναγωγή του MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] σε φορμαζάνη, παρουσία της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων, αποκλειστικά.

Ο δεύτερος τρόπος προσδιορισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι ο έλεγχος της δομικής ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των ζωντανών μόνο κυττάρων. Αντιθέτως, τα νεκρά ή τα δευτερογενώς νεκρά κύτταρα, χαρακτηρίζονται από απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Η μέθοδος της χρωστικής μπλε του τρυπανίου (trypan blue) είναι βασισμένη στην απώλεια αυτή, καθώς στην περίπτωση αυτή, η χρωστική εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και προσδένεται σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, προσδίδοντας στο κύτταρο μια μπλε χροιά (Εικόνα 2.4) [409]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer, τα ζωντανά κύτταρα να μην εφανίζουν κάποια χρώση, σε αντίθεση με τα νεκρά που επειδή προσλαμβάνουν τη χρωστική αποκτούν τη χαρακτηριστική μπλε χροιά. Ο δείκτης νεκρών κυττάρων υπολογίζεται από το λόγο του αριθμού των χρωματισμένων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο.



Εικόνα 2.4 . Σε περίπτωση απώλειας της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η χρωστική μπλε του τρυπανίου (trypan blue) εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και προσδένεται σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, προσδίδοντας στο κύτταρο μια μπλε χροιά.

Αφού προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση εμφύτευσης και η κατάλληλη συγκέντρωση κάθε φαρμάκου, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μεγαλύτερη κλίμακα προκειμένου να έχουμε μετά το πέρας των κυτταροκαλλιεργειών μεγάλο αριθμό κυττάρων για τα πειράματα που ακολουθούν.

2.3. Ομογενοποίηση και απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές και ιστούς παχέος εντέρου

2.3.1. Ομογενοποίηση ιστολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου

Η ποσότητα του ιστολογικού δείγματος παχέος εντέρου που ομογενοποιούμε κάθε φορά είναι ~100 mg ιστού/1 mL TRI Reagent[®], σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το TRI Reagent[®] χρησιμοποιείται για την απομόνωση ολικού RNA, DNA και πρωτεϊνών, από ομογενοποιημένους ιστούς και κύτταρα. Πρόκειται για ένα διάλυμα βασισμένο στη μέθοδο Chomczynski [410], σύμφωνα με την οποία όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου, προκαλεί τη λύση των κυττάρων, την αποδιάταξη των ανώτερων πρωτεϊνικών δομών αλλά και την προστασία του RNA από τις RNάσες, οι οποίες προέρχονται τόσο από τα ίδια τα κύτταρα όσο και από το περιβάλλον της εκχύλισης.

Αρχικά το δείγμα συνθλίβεται σε κονιορτοποιητή, τον οποίο έχουμε προηγουμένως καταψύξει σε υγρό άζωτο. Το κονιορτοποιημένο δείγμα κατόπιν μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf, όπου προστίθεται 1 mL TRI Reagent[®] και ομογενοποιείται περαιτέρω με παρατεταμένη ανάδευση. Η ομογενοποίηση των ιστολογικών δειγμάτων προκαλεί ρήξη των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στο διάλυμα ομογενοποίησης. Αφού παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, το ομογενοποίημα φυλάσσεται ακολούθως σε θερμοκρασία –80°C, μέχρις ότου πραγματοποιηθεί η απομόνωση του ολικού RNA.

2.3.2. Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές και ομογενοποιημένους ιστούς παχέος εντέρου

Μετά την προσθήκη 1 mL TRI Reagent[®] στο κονιορτοποιημένο ιστολογικό δείγμα ή στο ίζημα των προερχόμενων από καλλιέργεια κυττάρων, το μίγμα επωάζεται σε 25°C για 5 min. Κατόπιν, προστίθενται σε αυτό 200 μL χλωροφορμίου, και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 15 sec, επώαση σε 25°C για 10 min, και φυγοκέντρηση σε 12000 g για 15 min

σε 4°C. Στο στάδιο αυτό δημιουργούνται τρεις φάσεις: μια κατώτερη, που περιέχει τις πρωτεΐ νες, μια μεσόφαση, που περιέχει το DNA, και μια ανώτερη διαυγής, στην οποία περιέχεται το RNA που θέλουμε να απομονώσουμε. Στη συνέχεια, απομονώνεται η υπερκείμενη, διαυγής υδατική φάση, και σ' αυτή προστίθενται 500 μL ισοπροπανόλης και ακολουθεί ανάδευση για 10 sec, επώαση σε 25°C για 10 min, και φυγοκέντρηση σε 12000 g για 8 min σε 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, γίνεται απόχυση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 mL κρύας αιθανόλης 75% στο ίζημα, ανάδευση για 10 sec και φυγοκέντρηση σε 12000 g για 5 min σε 4°C. Τέλος, γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20-50 μL διαλύματος κιτρικού νατρίου 1 mM και pH=6,4, το οποίο επίσης διατίθεται εμπορικά με την ονομασία «THE RNA Storage Solution» (Ambion Inc.). Το απομονωμένο ολικό RNA φυλάσσεται σε θερμοκρασία –80°C.

2.3.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA

Η συγκέντρωση του ολικού RNA υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά, και βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν τα νουκλεϊκά οξέα να απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα του φωτός, με μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm. Αφού αραιώσουμε 1 μL απομονωμένου ολικού RNA σε 199 μL DEPC-H₂O (diethylpyrocarbonate-H₂O), το αραιωμένο διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 260 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του διαλύματος RNA γίνεται με χρήση του τύπου C_{RNA} (μg/μL) = $A_{260} * 200 * 0.04$, όπου:

A260: η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος RNA στα 260 nm (σε O.D.),

200: ο παράγοντας της αραίωσης, και

0,04: η συγκέντρωση στην οποία αντιστοιχεί 1 O.D. διαλύματος RNA (σε μg/μL RNA).

Την ιδιότητα να απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα του φωτός έχουν όμως και οι πρωτεΐνες, με μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Για να υπολογίσουμε την καθαρότητα του απομονωμένου RNA, προσδιορίζουμε το λόγο των απορροφήσεων στα 260 nm και 280 nm, σύμφωνα με τον τύπο λ=A₂₆₀/A₂₈₀, όπου:

A₂₆₀: η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος RNA στα 260 nm (σε O.D.), και A₂₈₀: η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος RNA στα 280 nm (σε O.D.).

Οι λόγοι των απορροφήσεων που κυμαίνονται μεταξύ 1,8 και 2,2 είναι αποδεκτοί και υποδεικνύουν την καθαρότητα του εκχυλίσματος, ενώ τιμές μικρότερες του 1,8

υποδηλώνουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών, και τιμές μεγαλύτερες του 2,2 αντιστοιχούν στην παρουσία ποσότητας DNA, σε υψηλά επίπεδα.

2.3.4. Έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου ολικού RNA γίνεται με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης1,5% (κ.β.), σε συνθήκες σταθερής τάσης 50V και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η παρασκευή του πηκτώματος έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X, στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg/mL. Κατόπιν, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης Gel XL Ultra (Labnet International Inc.), όπου καλύφτηκε από ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Ο όγκος ολικού RNA έκαστου δείγματος που ηλεκτροφορήθηκε αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση 1 μg, ενώ ο συνολικός του όγκος ήταν 12 μL, από τα οποία τα 6 μL ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 2X RNA Loading Dye (Fermentas International Ltd.), ενώ ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με DEPC-H₂O. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων σε 70°C για 10 min και ηλεκτροφόρηση αυτών. Παράλληλα με τα δείγματα, ηλεκτροφορήθηκε και μείγμα τμημάτων RNA γνωστού μήκους (RiboRulerTM RNA Ladder, Low Range (Fermentas International Ltd.). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε τράπεζα υπεριώδους φωτός, όπου φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Digital Science DC120 Zoom Digital Camera (Kodak).

Όταν το RNA είναι ακέραιο, διακρίνονται μόνο οι ζώνες των 28S, 18S, 8S και 5S ριβοσωμικών RNA (rRNA) μορίων. Αντιθέτως, σε περιπτώσεις αποικοδόμησης, αφενός μειώνεται η ένταση των ζωνών αυτών και αφετέρου παρατηρούνται προϊόντα αποικοδόμησης κατά μήκος της διαδρομής.

2.4. Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (reverse transcription, RT)

2.4.1. Αρχή της μεθόδου

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT), αναφέρεται στη μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Η όλη αντίδραση βασίζεται στη δράση ενός ιικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RTase). Πρόκειται για μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA, δημιουργεί συμπληρωματικά μόρια DNA. Η ειδικότητα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής καθορίζεται από τον εκκινητή. Τρεις διαφορετικές κατηγορίες εκκινητών χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής: τα τυχαία εξαμερή, τα ολιγομερή δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT), και ειδικός εκκινητής για συγκεκριμένο γονίδιο.

Τα τυχαία εξαμερή αποτελούν την κατηγορία εκκινητών με τη μικρότερη ειδικότητα, καθώς υβριδοποιούνται σε όλα τα μόρια RNA που βρίσκονται στο εκχύλισμα. Στην περίπτωση αυτή, η ειδικότητα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που ακολουθεί, εξαρτάται αποκλειστικά από τους εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν κατά την αντίδραση αυτή. Η χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων δεοξυθυμιδίνης κάνει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πιο ειδική, καθώς οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των ευκαρυωτικών μορίων mRNA. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούνται μόρια cDNA μόνο από τα μετάγραφα mRNA, και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης τόσο της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής όσο και της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (PCR) που ακολουθεί. Τέλος, μέγιστη ειδικότητα επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού εκκινητή για κάποιο γονίδιο, ο οποίος σχεδιάζεται έτσι ώστε να υβριδοποιείται μόνο στα μετάγραφα mRNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Η χρήση ειδικών εκκινητών κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε μικρό αριθμό μεταγράφων mRNA.

2.4.2. Συνθήκες αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA από απομονωμένο ολικό RNA

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής έγινε με απομονωμένο ολικό RNA κυττάρων HT29 με χρήση του RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa Bio Inc.) και ενός ολιγομερούς δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) ως εκκινητή. Το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από το ολικό RNA που είχε απομονωθεί από κάθε δείγμα ιστού παχέος εντέρου, καθώς και από τις κυτταρικές σειρές. Η ποσότητα ολικού RNA που χρησηιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα ήταν 2 μg. Το υπόλοιπο μείγμα της αντίδρασης αποτελείτο από 2,5 pmol Oligo dT-Adaptor Primer (C_{τελ}= 0,125 μM), 2 μL από το 10X RT Buffer (C_{τελ}= 10 mM Tris-HCl με pH= 8,3, και 50 mM KCl), 4 μL από 25 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 5 mM), 2 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 1 mM), 10 U αναστολέα RNασών, 1,25 U AMV Reverse Transcriptase XL (αντίστροφη μεταγραφάση AMV), και H₂O ελεύθερο RNασών, σε τελικό όγκο 20 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο περιελάμβανε τρία επιμέρους στάδια: ένα αρχικό σε 30°C για 10 min για τον υβριδισμό του εκκινητή oligo-dT στην ουρά poly-A των ώριμων μορίων mRNA, ακολουθούσε το στάδιο πολυμερισμού σε 60°C για 30 min, και τέλος ένα απαραίτητο στάδιο μη αντιστρεπτής αποδιάταξης της αντίστροφης μεταγραφάσης σε 99°C για 5 min. Όλες οι αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή MultiGene II Personal Thermal Cycler (Labnet International Inc.). Το τελευταίο στάδιο είναι πολύ σημαντικό καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, τα μόρια της αντίστροφης μεταγραφάσης θα έμεναν προσδεδεμένα με το νεοσύστατο cDNA, παρεμποδίζοντας έτσι τη μετέπειτα ενίσχυση αλληλουχιών με PCR.

2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

2.5.1. Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) είναι μία in vitro μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA. Πρόκειται για μια μέθοδο που χρησιμοποιείται τόσο σε κλινικά όσο και σε ερευνητικά εργαστήρια, χάρη στην ευαισθησία και εξειδίκευση που παρουσιάζει, αλλά και στην ταχύτητα και απλότητα της εφαρμογής της.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ενζυμική αναπαραγωγή ενός τμήματος DNA από μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση και τη χρήση ειδικών εκκινητών. Τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης συμπληρώνουν ένα ρυθμιστικό διάλυμα με κατιόντα Mg²⁺ και δεοξυριβονουκλεοτίδια όλων των βάσεων (dNTPs). Οι αλληλουχίες των εκκινητών έχουν μήκος 20-30 δεοξυριβονουκλεοτίδια και είναι συμπληρωματικές με τα άκρα των δύο αλυσίδων της αλληλουχίας-στόχου. Η αντίδραση PCR αποτελείται από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA, ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι θερμικοί κύκλοι, οι οποίοι αποτελούνται από τρία στάδια: αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, υβριδισμός των εκκινητών στην επιθυμητή αλληλουχία, και επιμήκυνση των εκκινητών με τον πολυμερισμό των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Τέλος, η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα τελικό στάδιο πολυμερισμού μεγαλύτερης διάρκειας, προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός σε όλα τα προϊόντα της PCR [411].

Αναλυτικότερα, το αρχικό στάδιο της αποδιάταξης γίνεται σε 94° έως 95°C για 2-10 λεπτά, με σκοπό το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και το διαχωρισμό των αλυσίδων της διπλής έλικας του DNA. Τα στάδια των επαναλαμβανόμενων κύκλων που ακολουθούν έχουν ως εξής: η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA γίνεται σε 94° έως 95°C για 30-60 sec, το στάδιο υβριδισμού των εκκινητών σε 45° έως 65°C, ανάλογα με τη θερμοκρασίας τήξης αυτών, για 30-60 sec, και τέλος η επιμήμυνση των αλληλουχιών των εκκινητών σε 72°C για 30-60 sec, όπου η DNA πολυμεράση προσθέτει στα εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια τις συμπληρωματικές δεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις. Το τελευταίο στάδιο της επιμήκυνσης, γίνεται σε 72°C για 5 έως 10 λεπτά.

2.5.2. Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, τόσο η συμβατική όσο και η ποσοτική σε πραγματικό χρόνο, είναι πολύ ευαίσθητη στην ποιότητα και ποσότητα του cDNA, που αντανακλά την ποιότητα του RNA, καθώς και την απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Για το λόγο αυτό, τα αποτελέσματα πρέπει να κανονικοποιούνται προκειμένου να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία τους που οφείλονται στην κακή ή ελλιπή ποσότητα των δύο αυτών μορίων. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με την παράλληλη μελέτη έκφρασης με το γονίδιο-στόχο ενός άλλου γονιδίου, το οποίο ονομάζεται γονίδιο σταθερής έκφρασης (housekeeping gene), και βασίζεται στην παραδοχή ότι η έκφραση του γονιδίου αυτού δεν αλλάζει απο δείγμα σε δείγμα. Σε πολλές μελέτες, χρησιμοποιείται ένα μόνο γονίδιο αναφοράς, ενώ άλλες προτείνουν τη γρήση της μέσης έκφρασης περισσότερων του ενός γονιδίων σταθερής έκφρασης ως μέτρο σύγκρισης. Σήμερα, εφόσον πλέον έχει εγκαταλειφθεί η ιδέα πως μπορεί να υπάρχουν κάποια γονίδια σταθερής έκφρασης που να αποτελούν «χρυσό κανόνα» και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλες τις μελέτες, έχει προταθεί μία διαφορετική προσέγγιση κατά την οποία υπάρχει το βέλτιστο γονίδιο σταθερής έκφρασης για κάθε ιστό, παθογένεια και πειραματική διαδικασία που ακολουθείται στην εκάστοτε μελέτη.

2.5.3. Σχεδιασμός εκκινητών συμβατικής PCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών της αντίδρασης PCR είναι καθοριστικός για την πορεία της αντίδρασης και πρέπει να ακολουθεί ορισμένους κανόνες. Αρχικά, θα πρέπει να είμαστε σίγουροι πως οι εκκινητές πολλαπλασιάζουν ειδικά μόνο το επιθυμητό τμήμα της αλληλουχίας-στόχου και όχι τμήματα παρόμοιων αλληλουχιών, έτσι ώστε να αποφευχθούν μη ειδικά προϊόντα. Επιπλέον, οι εκκινητές δεν πρέπει να οδηγούν σε σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών, γεγονός που πιθανότατα θα επηρεάσει την απόδοση της αντίδρασης.

Οι γενικοί κανόνες που εφαρμόζονται για το σχεδιασμό ειδικών εκκινητών είναι: α) το μήκος των εκκινητών πρέπει να είναι 20 έως 30 δεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις, προσδίδοντας στους εκκινητές μεγαλύτερη ειδικότητα για μια μοναδική αλληλουχία-στόχο, β) επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες καθώς και περιοχές που περιέχουν διαδοχικές επαναλήψεις μιας βάσης αποφεύγονται ως περιοχές υβριδισμού των εκκινητών, για να αποφευχθεί ολίσθηση του εκκινητή επάνω στην αλυσίδα-εκμαγείο, γ) τα 3΄-άκρα των εκκινητών δε σχεδιάζονται σε περιοχές που αποτελούνται από τρεις ή περισσότερες G ή C, αποφεύγοντας έτσι το λανθασμένο υβριδισμό των εκκινητών σε άλλες περιοχές που είναι πλούσιες σε GC, δ) οι εκκινητές δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές λόγω εσωτερικής συμπληρωματικότητας, αποφεύγοντας με τον τρόπο αυτό το σχηματισμό διμερών των εκκινητών, ε)τα ζεύγη των εκκινητών θα πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης (melting temperature, Tm), ώστε να μη χάνεται ή ελαττώνεται η ειδικότητα της αντίδρασης στο στάδιο του υβριδισμού.

Ο σχεδιασμός όλων των ειδικών ζεύγων εκκινητών συμβατικής PCR που πραγματοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο, έγινε με χρήση των λογισμικών Primer Premier 5 και Primer Output 3.

2.5.4. Συνθήκες συμβατικής PCR

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος cDNA των γονιδίων *GAPDH* και *KLK10*, έγινε σε κύτταρα DLD1. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν στις συνθήκες αυτές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε κάθε ιστολογικό δείγμα παχέος εντέρου, με χρήση ειδικών ζευγών εκκινητών για κάθε γονίδιο. Επιπλέον, περιγράφονται και οι συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA και των σχετιζόμενων με την απόπτωση γονιδίων *BCLX*, *BIM*, *BID*, *BAX*, *MCL1*, *BAK1*, *NOXA*, *PUMA*, και *BIRC5*, σε κύτταρα HT-29, όπως προέκυψαν μετά τη βελτιστοποίησή τους. Όλες οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στη συσκευή MultiGene II Personal Thermal Cycler.

2.5.4.1. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου GAPDH, σε ιστούς παχέος εντέρου και κύτταρα DLD-1

Το ένα από τα δυο γονίδια αναφοράς που επιλέχθηκαν για τα πειράματα της συμβατικής PCR ήταν, το *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει σταθερή έκφραση mRNA, με μέτρια επίπεδα έκφρασης. Ο πρόσθιος εκκινητής για το *GAPDH* (GAPDH Ex2F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο αντίστοιχος ανάστροφος εκκινητής (GAPDH Ex4R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4 (Πίνακας 2.1).

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
GAPDH Ex2F	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'	20	55,0	58,1	157*
GAPDH Ex4R	5'-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'	20	50,0	58,3	379*
Προϊόν PCR		223*			

Πίνακας 2.1. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο GAPDH.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_002046.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 10 min, 28 θερμικούς κύκλους με 94°C για 30 sec, 60°C για 1 min και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 8 min.

2.5.4.2. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου *B2M*, σε ιστούς παχέος εντέρου και κύτταρα DLD-1

Το ένα από τα δυο γονίδια αναφοράς που επιλέχθηκαν για τα πειράματα της συμβατικής PCR ήταν η *B2M* (beta-2-microglobulin). Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει σταθερή έκφραση mRNA, με υψηλά επίπεδα έκφρασης. Έγινε σχεδιασμός ζεύγους ειδικών εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA του μετάγραφου του γονιδίου *B2M* (GenBank Accession Number: NM_004048). Ο πρόσθιος εκκινητής (B2M Ex2 REAL F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο ανάστροφος εκκινητής (B2M Ex4 REAL R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4 (Πίνακας 2.2).
Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm (°C)	Θέση
		(nh)	GC (70)	(C)	whooseoile
B2M Ex2 REAL F	5'-ACTGAATTCACCCCCACTGA-3'	20	50,00	58,6	322*
B2M Ex4 REAL R	5'-AAGCAAGCAAGCAGAATTTGGA-3'	21	40,91	59,6	488^*
Προϊόν PCR		167*			

Πίνακας 2.2. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο B2M.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_004048.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 10 min, 28 θερμικούς κύκλους με 94°C για 30 sec, 60°C για 30 min και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 5 min.

2.5.4.3. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των μεταγράφων του γονιδίου *KLK10*, σε ιστούς παχέος εντέρου και κύτταρα DLD-1

Για την ενίσχυση κοινού τμήματος των τριών εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *KLK10* (GenBank Accession Numbers: NM_002776, NM_145888 και NM_001077500), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (KLK10 Ex3F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 και ο ανάστροφος εκκινητής (KLK10 Ex6R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6 (Πίνακας 2.3).

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση πρόσδεσης
KLK10 Ex3F	5'-TGGCAGGTCTCGCTCTTCAAC-3'	21	57,14	62,6	394*/256** /295***
KLK10 Ex6R	5'-AACACCCCACGAGAGGATGCC-3'	21	61,90	64,5	960*/822** /861 ^{***}
Προϊόν PCR		567 ^{*,**,***}			

Πίνακας 2.3. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο KLK10.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM 002776.

***: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_001077500.

^{**:} Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_145888.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ ($C_{τελ}$ = 2,0 mM), 1 µL and 10 mM dNTPs ($C_{\tau \epsilon \lambda, \kappa \alpha \theta \epsilon \nu \delta \varsigma} = 0,2$ mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αργικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 10 min, 34 θερμικούς κύκλους με 94°C για 30 sec, 63°C για 45 sec και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 8 min.

Για την ενίσχυση τμήματος του εναλλακτικού μετάγραφου 1 του γονιδίου KLK10 (GenBank Accession Number: NM 002776), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (KLK10 ExTV1F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 του εναλλακτικού μετάγραφου 1 και ο ανάστροφος εκκινητής (KLK10 Ex3R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4. Ιδιότητες εκκινητών συμβατικής PCR για το εναλλακτικό μετάγραφο 1 της KLK10).
--	----

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
KLK10 ExTV1F	5'-ACCCAGGAGTGCCAGCCTCA-3'	20	65,00	65,6	182*
KLK10 Ex3R	5'-GTGGAACGAGAGGCCGTTGAAG-3'	22	59,09	63,7	429*
Προϊόν PCR		248*			

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM 002776.

Για την ενίσχυση τμήματος του εναλλακτικού μετάγραφου 2 του γονιδίου KLK10 (GenBank Accession Number: NM_145888), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (KLK10 ExTV2F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 του εναλλακτικού μετάγραφου 2 και ο ανάστροφος εκκινητής (KLK10 Ex3R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5. Ιδιότητες εκκινητών συμβατικής PCR για το εναλλακτικό μετάγραφο 2 της KLK10.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
KLK10 ExTV2F	5'-CCCTCCCTCCTTCCTATCGGC-3'	21	66,67	63,5	43*
KLK10 Ex3R	5'-GTGGAACGAGAGGCCGTTGAAG-3'	22	59,09	63,7	291*
Προϊόν PCR		249*			

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM 145888.

Για την ενίσχυση τμήματος του εναλλακτικού μετάγραφου 3 του γονιδίου *KLK10* (GenBank Accession Number: NM_001077500), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (KLK10 ExTV3F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 του εναλλακτικού μετάγραφου 3 και ο ανάστροφος εκκινητής (KLK10 Ex3R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 2.6).

Оνоµа	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
KLK10 ExTV3F	5'-CTGTCCCTCCTACTCAACCTGC-3'	22	59,09	62,1	26*
KLK10 Ex3R	5'-GTGGAACGAGAGGCCGTTGAAG-3'	22	59,09	63,7	330*
Προϊόν PCR		305*			

Πίνακας 2.6. Ιδιότητες εκκινητών συμβατικής PCR για το εναλλακτικό μετάγραφο 3 της KLK10.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM 001077500.

Σε καθεμία από τις τρεις προαναφερθείσες περιπτώσεις, η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95oC για 7 min, 38 θερμικούς κύκλους με 95oC για 30 sec, 62oC για 30 sec και 72oC για 5 min.

2.5.4.4. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των μεταγράφων BCLX_L και BCLX_S του γονιδίου BCLX, σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση δύο τμημάτων cDNA των δύο διαφορετικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BCLX*, του αντι-αποπτωτικού *BCLX*_L και του προ-αποπτωτικού *BCLX*_S, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους κατά 189 bp (GenBank Accession Numbers: NM_001191 και NM_138578), σχεδιάστηκε ζεύγος ειδικών εκκινητών συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής για το *BCLX* (BCLX Ex2F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο αντίστοιχος ανάστροφος εκκινητής (BCLX 3R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 2.7).

Quana	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
Ονομα		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
BCLX Ex2F	5'-GGCAGGCGACGAGTTTGA-3'	18	61,11	61,7	642*,**
BCLX Ex3R	5'-TGAAGAGTGAGCCCAGCAGA-3'	20	55,00	60,6	868*/1057**
1º Προϊόν PCR		227**			
2º Προϊόν PCR		416*			

Πίνακας 2.7. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο BCLX.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_001191.

**: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_138578.

Η αντίδρασης περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 32 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 62°C για 30 sec και 72°C για 40 sec. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 5 min.

2.5.4.5. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA δύο εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *MCL1*, σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση τμήματος cDNA τριών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *MCL1*, του αντι-αποπτωτικού MCL1_L με GenBank Accession Number: NM_021960 και των προαποπτωτικών MCL1_s και MCL1_{Es} με GenBank Accession Numbers: NM_182763 και NM_001197320 αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (MCL1 Ex1F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 και ο ανάστροφος εκκινητής (MCL1 Ex2R) σε τμήμα του εξωνίου 2 (Πίνακας 2.8).

Όνομα	Αλληλουχία	Мήкоς (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση πρόσδεσης
MCL1 Ex1F	5'-GACACAAAGCCAATGGGCAGGT-3'	22	54,55	60,6	791*,**/332***
MCL1 Ex2R	5'-ACCAGCTCCTACTCCAGCAACA-3'	22	54,55	60,3	992*/1240**/781***
1° Προϊόν PCR		202*			
2° Προϊόν PCR		450***			

Πίνακας 2.8. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο MCL1.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_182763.

**: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_021960.

***: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_001197320.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 35 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 60°C για 35 sec και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 10 min.

2.5.4.6. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BAX*, σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση κοινού τμήματος cDNA τριών διαφορετικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BAX* (GenBank Accession Numbers: NM_138763, NM_138764 και NM_138761), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (BAX Ex2F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2, και ο ανάστροφος εκκινητής (BAX Ex6R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6 (Πίνακας 2.9).

Όνομα	Αλληλουγία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
BAX Ex2F	5'-AGCAGATCATGAAGACAGGGGC-3'	22	54,55	62,4	119*,***,***
BAX Ex6R	5'-CCTCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3'	22	54,55	61,5	503*/611**/650***
1º Προϊόν PCR		385*			
2º Προϊόν PCR		493**			
3º Προϊόν PCR		532***			

Πίνακας 2.9. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο BAX.

*: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_138763.

**: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_138764.

***: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_138761.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 38 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 61°C για 45 sec και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 10 min.

2.5.4.7. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου *BAK1*, σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση τμήματος cDNA του μεταγράφου mRNA του γονιδίου *BAK1* (GenBank Accession Number: NM_001188,), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (BAK Ex3F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 και ο ανάστροφος εκκινητής (BAK Ex4R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4 (Πίνακας 2.10).

Overa		Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
Ονομα	Αλληλουχία	(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
BAK Ex3F	5'-GGTCACCTTACCTCTGCAACCT-3'	22	54,55	58,9	480^*
BAK Ex4R	5'-CATAGGCATTCTCTGCCGTGGG-3'	22	59,09	59,7	625*
Προϊόν PCR		146*			

Πίνακας 2.10. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο BAK1.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_001188.

Η αντίδρασης περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 35 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 62°C για 40 sec και 72°C για 40 sec. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 5 min.

2.5.4.8. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου του γονιδίου BID, σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση του μεγαλύτερου μεταγράφου mRNA του γονιδίου *BID* (GenBank Accession Number: NM_197966), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (BID Ex1F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 και ο ανάστροφος εκκινητής (BID Ex2R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 (Πίνακας 2.11). **Πίνακας 2.11.** Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο *BID*.

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση πρόσδεσης
BID Ex1F	5'-CTGGGCTGGCAAGGGTTCATT-3'	21	57,14	60,5	313*
BID Ex2R	5'-TCCGACTCACTCCTGGTTCACA-3'	22	54,55	59,9	471*
Προϊόν PCR		159*			

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_197966.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 35 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 61°C για 40 sec και 72°C για 40 sec. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 5 min.

2.5.4.9. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA δύο εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *PUMA* (*BBC3*), σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση τμήματος cDNA δύο εναλλακτικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *PUMA* (*BBC3*) (GenBank Accession Numbers: NM_001127242, NM_001127241 και NM_001127240), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (PUMA Ex1F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 και ο ανάστροφος εκκινητής (PUMA Ex4R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4 (Πίνακας 2.12).

Όνομα		Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
	Αλληλουχία	(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
PUMA Ex1F	5'-GTCTGCCCAGGCATGTCCAT-3'	20	60,00	59,3	182*,**,***
PUMA Ex4R	5'-CAGGCACCTAATTGGGCTCCA-3'	21	57,14	59,7	376*/567**/856***
1º Προϊόν PCR		195*			
2º Προϊόν PCR		386**			
3º Προϊόν PCR		675***			

Πίνακας 2.12. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο PUMA (BBC3).

*: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_001127242.

**: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_001127241.

***: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_001127240.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή ($C_{τελ.,καθενός}$ = 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [$C_{τελ}$ = 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ ($C_{τελ}$ = 2,0

mM), 1 μL από 10 mM dNTPs ($C_{τελ.,καθενός}$ = 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL.Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 35 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 61°C για 45 sec και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 10 min.

2.5.4.10. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA τριών εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *BIRC5 (Survivin)*, σε κύτταρα HT-29

Για τη διάκριση όλων των διαφορετικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BIRC5* (*Survivin*) (GenBank Accession Numbers: NM_001012270, NM_001168 και NM_001012271), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (Survivin Ex2F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ο ανάστροφος εκκινητής (Survivin Ex4R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4 (Πίνακας 2.13).

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
Survivin Ex2F	5'-CCCACTGAGAACGAGCCAGAC-3'	21	61,90	59,8	260*,**,***
Survivin Ex4R	5'-GGTGGCACCAGGGAATAAACCC-3'	22	59,09	60,5	502*/620**/689***
1º Προϊόν PCR		243*			
2ο Προϊόν PCR		361**			
3ο Προϊόν PCR		430***			

Πίνακας 2.13. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο BIRC5.

*: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_001012270.

**: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_001168.

***: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Number: NM_001012271.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 35 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 61°C για 45 sec και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 10 min.

2.5.4.11.Συνθήκες PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA του γονιδίου *P21 (CDKN1A)*, σε κύτταρα HT-29

Για την ενίσχυση τμήματος cDNA ενός μεταγράφου mRNA του γονιδίου *P21* (*CDKN1A*) (GenBank Accession Numbers: NM_000389 και NM_001220778), χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές συμβατικής PCR. Ο πρόσθιος εκκινητής (P21 Ex1F) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1 και ο ανάστροφος εκκινητής (P21 Ex2R) υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 (Πίνακας 2.14).

Πίνακας 2.14. Ιδιότητες των εκκινητών συμβατικής PCR για το γονίδιο P21 (CDKN1A).

Όνομα		Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
	Αλληλουχία	(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
P21 Ex1F	5'-TCAGTTCCTTGTGGAGCCGGA-3'	21	57,14	60,7	58*/27**
P21 Ex2R	5'-TGGTGTCTCGGTGACAAAGTCG-3'	22	54,55	59,2	299*/409**
1º Προϊόν PCR		242*			
2º Προϊόν PCR		383**			

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_000389.

**: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_001220778.

Η αντίδραση περιείχε 100 ng cDNA διαλυμένα σε DEPC-H₂O, 50 pmol έκαστου εκκινητή (C_{τελ.,καθενός}= 1 μM), 5 μL 10X PCR Buffer [C_{τελ}= 67 mM Tris-HCl με pH= 8,8, και 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (κ.β.) Tween-20], 2 μL από 50 mM MgCl₂ (C_{τελ}= 2,0 mM), 1 μL από 10 mM dNTPs (C_{τελ.,καθενός}= 0,2 mM), και 1,25 U ανασυνδυασμένης Taq DNA Polymerase (HyTest Ltd.), σε τελικό όγκο 50 μL.Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης σε 95°C για 5 min, 35 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους με 95°C για 30 sec, 60°C για 40 sec και 72°C για 1 min. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με το τελικό στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 5 min.

2.5.5. Ανίχνευση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανίχνευση και ανάλυση των προϊόντων της συμβατικής PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο εμποτίζεται με βρωμιούχο αιθίδιο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα που έχουν τα μόρια του δίκλωνου DNA μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, λόγω του διαφορετικού μεγέθους τους. Η κίνηση των νουκλεϊκών οξέων οφείλεται στο αρνητικό φορτίο που φέρουν λόγω των φωσφορικών ομάδων των νουκλεοτιδικών βάσεων, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους από τον αρνητικά φορτισμένο πόλο (κάθοδο) στο θετικά φορτισμένο πόλο (άνοδο), με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του δεκαδικού λογαρίθμου (log10) του μοριακού τους βάρους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων του δίκλωνου DNA επηρεάζεται επίσης από τη στερεοδιαμόρφωσή τους, τη σύσταση του πηκτώματος αγαρόζης, καθώς επίσης και την ένταση του ρεύματος που διέρχεται μέσα από το πήκτωμα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες συντελούν στη μετακίνηση διαμέσου των πόρων του πηκτώματος των μικρότερων προϊόντων PCR πιο μακριά από το σημείο εκκίνησης, συγκριτικά με τα μεγαλύτερα προϊόντα. Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα προϊόντα της PCR έχουν διαχωριστεί σε διακριτές ζώνες, οι οποίες φθορίζουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία, εξαιτίας της χρωστικής βρωμιούχο αιθίδιο, στην οποία είναι εμποτισμένο το πήκτωμα αγαρόζης. Η φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, EtBr), προσδένεται σε δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορισμό όταν ακολούθως εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Κατά συνέπεια, μεγαλύτερη ένταση φθορισμού, αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση προϊόντος PCR στη συγκεκριμένη ζώνη.

Συγκεκριμένα, για τα όλα τα προϊόντα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR για κάθε γονίδιο και σε κάθε υπό μελέτη δείγμα, η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (κ.β.), που κατασκευάστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X, και περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg/mL. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης Gel XL Ultra όπου και καλύφτηκε από ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Από κάθε προϊόν PCR ηλεκτροφορήθηκαν 15 μL, στα οποία προστέθηκαν 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 6X DNA Loading Dye (Fermentas International Ltd.). Παράλληλα με τα δείγματα, και προκειμένου να επιβεβαιώσουμε το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος, ηλεκτροφορήθηκε και μείγμα τμημάτων DNA γνωστού μήκους, GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Ltd). Ο συγκεκριμένος μάρτυρας αποτελείται από μήκη τμημάτων DNA μεγέθους 100 bp, και κάλυπτε ένα εύρος 100 bp-1kb. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα σε συνθήκες σταθερής τάσης 100V, σε θερμοκρασία δωματίου, για 45 min- 1h, ανάλογα με το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος. Τέλος, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε τράπεζα υπεριώδους φωτός, όπου φωτογραφήθηκε με ψηφιακό σύστημα Digital Science DC120 Zoom Digital Camera.

2.6. Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR)

2.6.1. Αρχή της μεθόδου

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) βασίζεται στη χρήση φθορίζουσων χρωστικών ή σημασμένων ιχνηθετών, οι οποίοι όταν προσδεθούν στο δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης εκπέμπουν φθορισμό, η ένταση του οποίου αντανακλά στην ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος. Η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται ανιχνεύεται με μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων, το σήμα είναι ασθενές και δε μπορεί να διακριθεί από το σήμα του υπόβαθρου του συστήματος, και για το λόγο αυτό ονομάζεται η φάση αυτή «φάση υπόβαθρου» ή «φάση θορύβου» (background phase). Όσο αυξάνεται όμως το προϊόν της αντίδρασης, το πραγματικό σήμα υπερβαίνει το σήμα του υπόβαθρου, και πλέον διακρίνεται και η εκθετική αύξηση του προϊόντος της PCR. Κατά την εκθετική (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase), η απόδοση της αντίδρασης είναι η μέγιστη δυνατή, καθώς υπάρχει περίσσεια αντιδραστηρίων που έχει σαν αποτέλεσμα το διπλασιασμό του προϊόντος της αντίδρασης σε κάθε κύκλο. Ύστερα από έναν αριθμό κύκλων, η εκθετική φάση της αντίδρασης δίνει τη θέση της στη γραμμική (linear phase). Στη φάση αυτή, η συγκέντρωση των συστατικών της αντίδρασης είναι περιορισμένη και συνάμα με την αποικοδόμηση του προϊόντος που λαμβάνει χώρα σε μικρό βαθμό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της απόδοσης της αντίδρασης. Η τελευταία φάση της αντίδρασης που ακολουθεί, όπου η απόδοση της αντίδρασης έχει σχεδόν μηδενιστεί, ονομάζεται φάση κορεσμού ή πλατό (plateau), και οφείλεται στη μείωση της καταλυτικής δραστικότητας της DNA πολυμεράσης. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται κατά τη λογαριθμική φάση της αντίδρασης, η οποία αντανακλά στην αρχική ποσότητα του μορίου στόχου στο μείγμα της αντίδρασης: όσα περισσότερα μόρια υποστρώματος περιέχονται στο αρχικό μείγμα της αντίδρασης, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για την πρώτη ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υπόβαθρου. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υπόβαθρου, είναι γνωστός ως «οριακός κύκλος» (threshold cycle, C_T). Ο κύκλος C_T προσδιορίζεται από την αύξηση του φθορισμού του μείγματος της αντίδρασης πάνω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο, γνωστό ως "threshold". Η επιλογή του επιπέδου μπορεί να γίνει είτε αυτόματα, με τη χρήση ειδικών λογισμικών και αλγόριθμων, είτε από τον ίδιο τον ερευνητή [412].

2.6.2. Σύστημα ανίχνευσης με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green

Η ανίχνευση των προϊόντων PCR σε πραγματικό χρόνο γίνεται με μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης: τα ειδικά, στα οποία χρησιμοποιούνται ειδικοί ιχνηθέτες (sequence-specific probes), οι οποίοι προσδένονται και ανιχνεύουν μόνο το επιθυμητό προϊόν, και στις μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές (non-specific labels), οι οποίες προσδένονται γενικά σε όλα τα δίκλωνα μόρια DNA. Μερικές από τις ασύμμετρες χρωστικές κυανίνης που χρησιμοποιούνται είναι οι SYBR Green I, LC Green, EVA Green, SYTO9, BEBO, και BOXTO. Οι χρωστικές αυτές φθορίζουν όταν προσδεθούν στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA και ο φθορισμός αυτός αυξάνει με τη συσσώρευση των προϊόντων της PCR.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η ασύμμετρη χρωστική SYBR Green I. Σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, κατά τη διάρκεια του σταδίου αποδιάταξης του δίκλωνου DNA, έχουμε και την ταυτόχρονη απελευθέρωση των μορίων της χρωστικής από αυτό. Στο στάδιο όμως που ακολουθεί της επέκτασης των εκκινητών και του σχηματισμού του δίκλωνου προϊόντος, τα μόρια της χρωστικής προσδένονται στο νεοσυντιθέμενο DNA, και έτσι έχουμε και την αναμενόμενη αύξηση του φθορισμού. Το μέγεθος σήματος του φθορισμού που προκύπτει είναι ανάλογο της ποσότητας του προϊόντος της αντίδρασης σε κάθε κύκλο (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5. Σύστημα ανίχνευσης με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green. Η χρωστική αυτή φθορίζει μόνο όταν προσδεθεί σε δίκλωνο DNA, επιτρέποντας τον ποσοτικό προσδιορισμό του, με τη βοήθεια κατάλληλων πρότυπων καμπυλών.

Το σύστημα ανίχνευσης με χρήση της χρωστικής SYBR Green Ι παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα., όπως δυνατότητα ανίχνευσης οποιασδήποτε επιθυμητής ενισχυόμενης αλληλουχίας, αυξημένη ευαισθησία, και χαμηλό κόστος, τα οποία και την καθιστούν ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα ανίχνευσης. Το γεγονός όμως ότι δεν εμφανίζει ειδικότητα για την αλληλουγία-στόγο, αποτελεί ένα αρκετά σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου και είναι και ο λόγος για τον οποίο θα πρέπει ο σχεδιασμός των εκκινητών να γίνεται πολύ προσεκτικά, καθώς από αυτούς εξαρτάται ουσιαστικά όλη η ειδικότητα της αντίδρασης. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι υπάρχει ένα σημείο ελέγχου της ειδικότητας της αντίδρασης, το οποίο είναι η ανάλυση με δημιουργία καμπύλης τήξης (melting curve analysis). Η ανάλυση αυτή, η οποία πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προσδιορίζει τη θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) των προϊόντων και βασίζεται στη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι την πλήρη αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA, όπου και ο φθορισμός μειώνεται απότομα. Επομένως, προϊόντα μικρότερου μεγέθους, όπως είναι τα διμερή των εκκινητών, χαρακτηρίζονται και από χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης, αλλά και γενικότερα μη ειδικά προϊόντα έχουν διαφορετικό T_m από την αλληλουχία-στόχο. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να διακρίνουμε αν το σήμα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης προέρχεται αποκλειστικά από την επιθυμητά ενισχυόμενη αλληλουχία ή αθροιστικά από την ύπαρξη και άλλων μη επιθυμητών προϊόντων [412].

2.6.3. AmpliTaq Gold® DNA polymerase, LD

Πρόκειται για μια ανασυνδυασμένη *Taq* πολυμεράση, η οποία παράγεται στην *Escherichia* coli, και διαθέτει υψηλή καθαρότητα και πολύ υψηλή ενεργότητα πολυμερισμού. Η *AmpliTaq*[®] Gold DNA πολυμεράση είναι μια τροποποιημένη, μορφή θερμής έναρξης (hot-start) της *AmpliTaq*, η οποία ενεργοποιείται όταν εκτεθεί σε θερμοκρασία 95°C, όπου δηλαδή το DNA είναι πλήρως αποδιαταγμένο, και έτσι αποφεύγεται ο σχηματισμός μη ειδικών προϊόντων. Η *AmpliTaq Gold*[®] DNA πολυμεράση, *LD* (Low DNA), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, έχει υποστεί περαιτέρω καθαρισμό από την *AmpliTaq Gold*[®] DNA πολυμεράση, για τη μείωση του βακτηριακού DNA του ξενιστή της (*Escherichia coli*), ελαχιστοποιώντας επιπλέον την πιθανότητα σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων PCR, προερχόμενων από βακτηριακό DNA.

2.6.4. Σχεδιασμός εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο

Οι κανόνες που περιγράφηκαν προηγουμένως για το σχεδιασμό εκκινητών για τη συμβατική PCR, ισχύουν και για το σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών για την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο. Υπάρχουν όμως κάποια επιπλέον σημεία ελέγχου που προκύπτουν από τις ιδιαιτερότητες της τεχνικής: α) το μέγεθος του ενισχυόμενου προϊόντος πρέπει να είναι μικρό, μεταξύ 50 και 150 bp, προκειμένου να ευνοείται η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης και να αποτρέπεται ο σχηματισμός μη ειδικών προϊόντων, β) οι εκκινητές πρέπει να έχουν περιεχόμενο G/C από 30 έως 80%, και οι τελευταίες πέντε βάσεις στο 3' άκρο τους δεν πρέπει να περιέχουν περισσότερες από δύο βάσεις G/C στο 3' άκρο τους, ευνοούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης, εξαιτίας του σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων, γ) η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών T_m πρέπει να είναι ~ 60°C.

Ο σχεδιασμός όλων των ειδικών ζεύγων εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο που πραγματοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο, έγινε με χρήση των λογισμικών Primer Express (Applied Biosystems) και Beacon Designer 7 (PREMIER Biosoft International).

2.6.4.1. Εκκινητές real-time PCR για τον ποσοτική μελέτη έκφρασης της B2M

Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε η *B2M*. Για την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε και στη συμβατική PCR. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και τα περαιτέρω στοιχεία τους αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.5.4.2.

2.6.4.2. Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη συνολικής έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *KLK10*, σε ιστούς παχέος εντέρου

Το ζεύγος των ειδικών εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA κοινού τμήματος των μεταγράφων mRNA του γονιδίου *KLK10* (GenBank Accession Numbers: NM_002776, NM_145888 και NM_001077500), αποτελείτο από τονπρόσθιο εκκινητή (KLK10 Ex5F), ο οποίος υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 5, και από τον ανάστροφο εκκινητή (KLK10 Ex6R), ο οποίος υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6 (Πίνακας 2.15).

103

Όνομα	Αλληλουχία	Мήкоς (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση πρόσδεσης
KLK10 Ex5F	5'-TCTACCCTGGCGTGGTCACC-3'	21	65,00	63,7	830*/692**/731***
KLK10 Ex6R	5'-GCAGAGCCACAGGGGTAAACA-3'	21	57,14	62,6	977*/839**/878***
Προϊόν PCR			148*,**,***		

Πίνακας 2.15. Ιδιότητες των εκκινητών PCR για το γονίδιο KLK10.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_002776.

**: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_145888.

***: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_001077500.

2.6.4.3. Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη έκφρασης του μετάγραφου *BCL2-alpha* του γονιδίου *BCL2*, σε κύτταρα HT-29

Το ζεύγος των ειδικών εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος τμήματος cDNA του μετάγραφου *BCL2-alpha* του γονιδίου *BCL2* (GenBank Accession Number: NM_000633), που κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική ισομορφή της πρωτεΐνης BCL2, αποτελείτο από τον πρόσθιο εκκινητή για το μετάγραφο *BCL2-alpha* (BCL2 Ex2 REAL F) που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2, και από τον ανάστροφο εκκινητή (BCL2 Ex3 REAL R) που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 2.16).

Πίνακας 2.16. Ιδιότητες των εκκινητών PCR για το μετάγραφο BCL2-alpha του γονιδίου BCL2.

Охона	Αλληλουχία	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
Ονομα		(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
BCL2 Ex2 REAL F	5'-TCGCCCTGTGGATGACTGA-3'	20	57,9	61,8	1011*
BCL2 Ex3 REAL R	5'-CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA-3'	22	51,0	60,9	1144*
Προϊόν PCR		134*			

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM_000633.

2.6.4.4. Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη συνολικής έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *BAX*, σε κύτταρα HT-29

Το ζεύγος των ειδικών εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA του μεγαλύτερου μήκους μεταγράφου mRNA του γονιδίου *BAX* (GenBank Accession Number: NM_004324, transcript variant beta), περιελάμβανε τον

πρόσθιο εκκινητή (BAX Ex4F), ο οποίος υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4, και τον ανάστροφο εκκινητή (BAX Ex5R), ο οποίος υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 5 (Πίνακας 2.17).

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση πρόσδεσης
BAX Ex4F	5'-TGTCGCCCTTTTCTACTTTGCC-3'	22	50,00	57,9	399*
BAX Ex5R	5'-GGTGAGGAGGCTTGAGGAGTC-3'	21	61,90	59,3	568*
Προϊόν PCR			170*		

Πίνακας 2.17. Ιδιότητες των εκκινητών real-time PCR για το γονίδιο BAX.

*: Με βάση την καταγραφή με Genbank Accession Number: NM 004324.

2.6.4.5. Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη έκφρασης του γονιδίου BIM, σε κύτταρα HT-29

Το ζεύγος των ειδικών εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA κοινού τμήματος τριών εναλλακτικών μεταγράφων mRNA του γονιδίου *BIM* (GenBank Accession Numbers: NM_138621, NM_138622 και NM_001204108), περιελάμβανε τον πρόσθιο εκκινητή (BIM Ex1F), ο οποίος υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2, και τον ανάστροφο εκκινητή (BIM Ex3R), ο οποίος υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 (Πίνακας 2.18).

Πίνακας 2.18. Ιδιότητες των εκκινητών real-time PCR για το γονίδιο BIM.

Oyoug		Μήκος	Ποσοστό	Tm (°C)	Θέση
Ονομα	That hour to	(bp)	GC (%)		πρόσδεσης
BIM Ex2F	5'-CTTTTGACACAGACAGGAGCCC-3'	21	54,55	58,1	581*
BIM Ex3R	5'-TGGGCGCATATCTGCAGGTT-3'	20	55,00	59,6	720*
Προϊόν PCR		140*			

*: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Numbers: NM_138621, NM_138622, NM_001204108.

2.6.4.6. Εκκινητές real-time PCR για την ποσοτική μελέτη έκφρασης του γονιδίου NOXA (PMAIP1), σε κύτταρα HT-29

Το ζεύγος των ειδικών εκκινητών ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση τμήματος cDNA του μετάγραφου του γονιδίου *NOXA* (*PMAIP1*) (GenBank Accession Number: NM_021127), περιελάμβανε τον πρόσθιο εκκινητή (NOXA Ex1F), που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 1, και τον ανάστροφο εκκινητή (NOXA Ex2R), που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2 (Πίνακας 2.19).

Όνομα	All ml onwig	Μήκος	Ποσοστό	Tm	Θέση
	Αλληλουχία	(bp)	GC (%)	(°C)	πρόσδεσης
NOXA Ex1F	5'-CAGTTGGAGGCTGAGGTTCC-3'	20	60,00	57,9	161*
NOXA Ex2R	5'-CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG-3'	22	54,55	57,2	308*
Προϊόν PCR		148*			

Πίνακας 2.19. Ιδιότητες των εκκινητών real-time PCR για το γονίδιο NOXA (PMAIP1).

*: Με βάση τις καταγραφές με Genbank Accession Numbers: NM_021127.

2.6.5. Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων cDNA και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων B2M, *KLK10, BCL2, BAX, BIM* και *NOXA*, έγινε σε κύτταρα HT-29. Ακολούθησαν ποσοτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, για τα γονίδια B2M και *KLK10*, με χρήση των ζευγών εκκινητών που αναφέρθηκαν στις παραγράφους 2.6.4.1 και 2.6.4.2, καθώς επίσης και ποσοτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, για τα γονίδια *B2M* και και χεινγών εκκινητών που αναφέρθηκαν στις παραγράφους 2.6.4.1 και αάθε χρονική στιγμή, για τα γονίδια *B2M*, *BCL2, BAX, BIM* και *NOXA*, με χρήση των ζευγών εκκινητών στις παραγράφους 2.6.4.1 και για κάθε χρονική στιγμή, για τα γονίδια *B2M*, *BCL2, BAX, BIM* και *NOXA*, με χρήση των ζευγών εκκινητών στις παραγράφους 2.6.4.1 και 2.6.4.3 έως 2.6.4.6. Η αντίδραση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο έλαβε χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (δωρεά Ιδρύματος Μποδοσάκη).

2.6.5.1. Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA των γονιδίων *B2M* και *KLK10*, σε ιστούς παχέος εντέρου

Στις ποσοτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια *B2M* και *KLK10*, χρησιμοποιήθηκε το *Power* SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems). Σε 20ng cDNA, προσθέσαμε *Power* SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) ($C_{τελ}$ =1X), πρόσθιο εκκινητή ($C_{τελ}$ =75nM), ανάστροφο εκκινητή ($C_{τελ}$ =75nM), και DEPC-H₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μL, για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου της *B2M*, ενώ για το γονίδιο της *KLK10* οι συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 100 nM, με τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αντιδραστηρίων να παραμένουν οι ίδιες. Τα στάδια της αντίδρασης περιελάμβαναν ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των μορίων cDNA και ενεργοποίησης της hot-start πολυμεράσης σε 95°C για 10 min, 40 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, που αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του δίκλωνου DNA σε 95°C για 15 sec και ένα στάδιο υβριδισμού και πολυμερισμού των εκκινητών σε 60°C για 1 min. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε το στάδιο για τη δημιουργία καμπύλης τήξης των δίκλωνων μορίων DNA.

2.6.5.2. Συνθήκες ποσοτικής real-time PCR για την ενίσχυση τμήματος cDNA των γονιδίων BCL2, BAX, BIM και NOXA, σε κύτταρα HT29

Στις ποσοτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τα γονίδια *B2M*, *BCL2*, *BAX*, *BIM* και *NOXA*, χρησιμοποιήθηκε το *Power* SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems). Σε 20ng cDNA, προσθέσαμε *Power* SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) ($C_{τελ}=1X$), πρόσθιο εκκινητή ($C_{τελ}=100$ nM), ανάστροφο εκκινητή ($C_{τελ}=100$ nM), και DEPC-H₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μL. Τα στάδια της αντίδρασης περιελάμβαναν ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των μορίων cDNA και ενεργοποίησης της hot-start πολυμεράσης σε 95°C για 10 min, 40 επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, που αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των εκκινητών σε 60°C για 1 min. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε το στάδιο για τη δημιουργία καμπύλης τήξης των δίκλωνων μορίων DNA.

2.6.6. Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της real-time PCR

2.6.6.1. Ανίχνευση και ανάλυση των προϊόντων της real-time PCR

Το σύστημα ανίχνευσης SYBR Green στηρίζεται στη δέσμευση των μορίων της χρωστικής στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, που έχει σαν αποτέλεσμα το φθορισμό του συστήματος, έπειτα από κατάλληλη διέγερση. Εκτός από τη χρωστική SYBR Green I, που χρησιμοποιείται στο σύστημα ως χρωστική ανίχνευσης, χρησιμοποιείται και η χρωστική ROX, η οποία, έχοντας αμετάβλητο σήμα φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια της PCR, λειτουργεί ως χρωστική παθητικής αναφοράς, για την κανονικοποίηση του σήματος της χρωστικής ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, μετά τα πρώτα 30 δευτερόλεπτα κάθε επαναλαμβανόμενου σταδίου υβριδοποίησης των εκκινητών και πολυμερισμού από την πολυμεράση DNA, κατάλληλος λαμπτήρας του οργάνου εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, διεγείροντας τις δύο γρωστικές και προκαλώντας το φθορισμό τους, σε διαφορετικά μήκη κύματος: το φάσμα εκπομπής της SYBR Green Ι εμφανίζει μέγιστο στα ~520 nm, ενώ της ROX στα ~610 nm. Το σήμα φθορισμού ανιχνεύεται στο κατάλληλο για κάθε χρωστική φίλτρο από ειδικό ανιχνευτή. Έτσι, ο φθορισμός της SYBR Green I αυξάνεται καθώς συσσωρεύεται όλο και περισσότερο προϊόν PCR με την πάροδο της αντίδρασης, ενώ ο αντίστοιχος φθορισμός της ROX παραμένει αμετάβλητος καθ' όλη τη διάρκεια της PCR. Η κανονικοποίηση αυτή είναι απαραίτητη για τη διόρθωση της διακύμανσης του φθορισμού, που οφείλεται σε διαφορές της συγκέντρωσης της χρωστικής ανίχνευσης στις διαφορετικές ταυτόχρονες αντιδράσεις. Η κανονικοποιημένη ένταση εκπεμπόμενου φθορισμού (R_N) της SYBR Green I, δίνεται από τον τύπο: $R_N = \frac{R_{SYBR_Green}}{R_{ROX}}$

Από την απεικόνιση της κανονικοποιημένης έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού της SYBR Green I ως προς τους κύκλους της αντίδρασης, προκύπτει η καμπύλη ενίσχυσης της αντίδρασης (Εικόνα 2.6). Όπως φαίνεται και στο σχήμα, κατά τους πρώτους κύκλους της PCR (baseline), το σήμα θορύβου (R₀), δεν επιτρέπει τη μέτρηση του αυξανόμενου σήματος(R_N). Καθώς όμως συσσωρεύεται το επιθυμητό προϊόν PCR, το σήμα φθορισμού αυξάνεται εκθετικά ($\Delta R_N = R_N - R_0$), μέχρι το σημείο εκείνο όπου ο ρυθμός αύξησης αρχίσει να μειώνεται και τελικά μηδενίζεται.



Εικόνα 2.6. Σχηματική αναπαράσταση μιας τυπικής καμπύλης ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού, γίνεται η δημιουργία καμπύλης τήξης, με σκοπό να ελέγξουμε την ειδικότητα της αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται με άνοδο της θερμοκρασίας σε 95°C, με σκοπό την αποδιάταξη όλων των προϊόντων που έχουν σχηματιστεί, και απελευθέρωση της χρωστικής. Με τον τρόπο αυτό, σχηματίζεται η καμπύλη τήξης, η οποία δημιουργείται με συνεχή μέτρηση του φθορισμού παράλληλα με τη σταδιακή ανύψωση της θερμοκρασίας. Στην αρνητική παράγωγο της καμπύλης μπορούμε με ευκολία να διακρίνουμε αν έχουμε και μη ειδικά προϊόντα, καθώς προκύπτουν ξεχωριστές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στη θερμοκρασία έκαστου ποοϊόντος, ανάλογα με το μέγεθός του και την περιεκτικότητά του σε G/C. Περισσότερες από μία κορυφές μαρτυρούν την ύπαρξη μη ειδικών προϊόντων, τα οποία μπορεί να είναι διμερή εκκινητών, αν η κορυφή αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, ή μη ειδικά προϊόντα, αν η κορυφή είναι πλησίον της κορυφής που δημιουργείται από την αποδιάταξη της επιθυμητά ενισχυόμενης αλληλουχίας.

Τέλος, με τη βοήθεια του ειδικού λογισμικού Sequence Detection System, v.1.2.3 (Applied Biosystems), προσδιορίζουμε το C_T για κάθε υπό εξέταση δείγμα, τη μέση τιμή και τα τυπικά σφάλματά τους, καθώς και τη σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου-στόχου ως προς το γονίδιο αναφοράς, αλλά και ως προς το δείγμα-βαθμονομητή. Από την ανάλυση εξαιρούνται τα δείγματα στα οποία, με βάση τις καμπύλες τήξης, παρατηρείται σχηματισμός διμερών εκκινητών και/ή μη ειδικών προϊόντων.

2.6.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της real-time PCR

Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των προϊόντων της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification), προσδιορίζεται η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου με βάση μία καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με τη χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, και επομένως εκφράζεται ως απόλυτη τιμή. Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification) αντιθέτως, προσδιορίζεται η μεταβολή της ποσότητας του γονιδίου-στόχου ενός δείγματος σε σχέση με την ποσότητα του γονιδίου αναφοράς του ίδιου δείγματος, συγκριτικά με τις μεταβολές των ίδιων γονιδίων σε ένα δείγμα βαθμονομητή.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης, και στην ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της *KLK10* σε ιστούς παχέος εντέρου, αλλά και στη μελέτη των αλλαγών έκφρασης της *KLK10* και των σχετιζόμενων με την απόπτωση γονιδίων *BCL2*, *BAX*, *BIM* και *NOXA*, ύστερα από επίδραση με χημειοθεραπευτικό παράγοντα. Και στις δύο μελέτες, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *B2M* και ως βαθμονομητής, κύτταρα HT29 που δεν είχαν υποστεί επεξεργασία με φάρμακο. Υπάρχουν δύο τρόποι υπολογισμού που χρησιμοποιούνται για τη σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων: η δημιουργία σχετικής πρότυπης καμπύλης και η σύγκριση των C_T, γνωστή και ως μέθοδος 2^{-ΔΔC}T. Στη μέθοδο σύγκρισης των C_T προηγείται ένα πείραμα αξιολόγησης, προκειμένου να υπολογιστούν η απόδοση της αντάδρασης ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου και της αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου σχεδον ίδιες, πλησιάζοντας στο 100%, ενώ δεν απαιτείται η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Και οι δύο τρόποι υπολογισμού, οδηγούν σε ισοδύναμα αποτελέσματα.

2.6.6.3. Σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων KLK10, BCL2, BAX, BIM και NOXA ως προς την έκφραση του γονιδίου B2M, με τη μέθοδο σύγκρισης των CT (2^{-ΔΔC}T)

Οι υπολογισμοί έγιναν με χρήση της μεθόδου σύγκρισης των $C_T (2^{-\Delta\Delta C}_T)$. Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο *B2M*, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η καρκινική κυτταρική σειρά HT-29 ως βαθμονομητής, προκειμένου τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης των προς μελέτη γονιδίων που αναλύθηκαν σε διαφορετικά μικροπλακίδια PCR,

110

να είναι συγκρίσιμα [413]. Έτσι, οι κανονικοποιημένες ως προς τον βαθμονομητή ποσότητες των γονιδίων στόχων δίνονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\frac{\left(\frac{mRNA_\alpha v\tau i\gamma\rho\alpha\phi\alpha_KLK10}{mRNA_\alpha v\tau i\gamma\rho\alpha\phi\alpha_B2M}\right)_{\Delta\epsilon i\gamma\mu\alpha_\iota\sigma\tau oi}}{\left(\frac{mRNA_\alpha v\tau i\gamma\rho\alpha\phi\alpha_KLK10}{mRNA_\alpha v\tau i\gamma\rho\alpha\phi\alpha_B2M}\right)_{HT29}} = 2^{-\Delta\Delta CT} (KLK10),$$

$$\dot{\delta}\pi\omega: \Delta\Delta C_{T(KLK10)} = \Delta C_{T(KLK10),\Delta\epsilon i \gamma \mu \alpha \tau \circ \varsigma} - \Delta C_{T(KLK10),HT29} = = (C_{T(KLK10)} - C_{T(B2M)})_{\Delta\epsilon i \gamma \mu \alpha \tau \circ \varsigma} - (C_{T(KLK10)} - C_{T(B2M)})_{HT29}$$

$$\frac{\left(\frac{mRNA \ \alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha \ BCL2}{mRNA \ \alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha \ B2M}\right)_{HT 29 \ \phi \alpha \rho \mu \alpha \kappa \sigma}}{\left(\frac{mRNA \ \alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha \ BCL2}{mRNA \ \alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha \ B2M}\right)_{HT 29}} = 2^{-\Delta\Delta CT} (BCL2),$$

$$= (C_{T(BCL2)} - C_{T(B2M)})_{HT29_{\phi άρμακο}} - (C_{T(BCL2)} - C_{T(B2M)})_{HT29}$$

 $\frac{\left(\frac{mRNA \ \alpha \nu \tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ BAX}{mRNA \ \alpha \nu \tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ B2M}\right)_{HT 29 \ \phi \alpha \rho \mu \alpha \kappa \sigma}}{\left(\frac{mRNA \ \alpha \nu \tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ BAX}{mRNA \ \alpha \nu \tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ B2M}\right)_{HT 29}} = 2^{-\Delta\Delta CT} (BAX),$

$$\dot{o}\pi ou: \Delta\Delta C_{T(BAX)} = \Delta C_{T(BAX),HT29_{\phi \dot{\alpha}\rho\mu\alpha\kappao}} - \Delta C_{T(BAX),HT29} = = (C_{T(BAX)} - C_{T(B2M)})_{HT29_{\phi \dot{\alpha}\rho\mu\alpha\kappao}} - (C_{T(BAX)} - C_{T(B2M)})_{HT29}$$

$$\frac{\left(\frac{mRNA_\alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha_BIM}{mRNA_\alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha_B2M}\right)_{_{HT29_\phi \dot{\alpha} \rho \mu \alpha \kappa o}}}{\left(\frac{mRNA_\alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha_BIM}{mRNA_\alpha v\tau i\gamma \rho \alpha \phi \alpha_B2M}\right)_{_{HT29}}} = 2^{-\Delta\Delta CT}(BIM),$$

$$\begin{split} & \text{όπου: } \Delta\Delta C_{\text{T(BIM)}} = \Delta C_{\text{T(BIM)},\text{HT29}_{\phi \acute{\alpha} \rho \mu \alpha \kappa o}} - \Delta C_{\text{T(BIM)},\text{HT29}} = \\ & = (C_{\text{T(BIM)}} - C_{\text{T(B2M)}})_{\text{HT29}_{\phi \acute{\alpha} \rho \mu \alpha \kappa o}} - (C_{\text{T(BIM)}} - C_{\text{T(B2M)}})_{\text{HT29}} \end{split}$$

$$\frac{\left(\frac{mRNA \ \alpha v\tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ NOXA}{mRNA \ \alpha v\tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ B2M}\right)_{HT29 \ \phi \alpha \rho \mu \alpha \kappa \sigma}}{\left(\frac{mRNA \ \alpha v\tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ NOXA}{mRNA \ \alpha v\tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha \ B2M}\right)_{HT29}} = 2^{-\Delta\Delta CT} (NOXA),$$

$$\dot{\delta}\pi\omega: \Delta\Delta C_{T(NOXA)} = \Delta C_{T(NOXA),HT29_{\phi \dot{\alpha}\rho\mu\alpha\kappa\sigma}} - \Delta C_{T(NOXA),HT29} = = (C_{T(NOXA)} - C_{T(B2M)})_{HT29_{\phi \dot{\alpha}\rho\mu\alpha\kappa\sigma}} - (C_{T(NOXA)} - C_{T(B2M)})_{HT29}$$

Οι κανονικοποιημένες ποσότητες (2^{-ΔΔC}T) των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK10* κάθε ιστολογικού δείγματος πολλαπλασιάζονται με το μέσο όρο των λόγων $\left(\frac{mRNA_\alpha v \tau i γ \rho \alpha \phi \alpha_\gamma o v i \delta i o - \sigma \tau o \chi o \varsigma}{mRNA_\alpha v \tau i γ \rho \alpha \phi \alpha_\gamma o v i \delta i - \alpha v \alpha \phi o \rho \alpha \varsigma}\right)_{HT-29}, o οποίος έχει υπολογιστεί ίσος με$

11,049 για το γονίδιο της *KLK10*. Όσον αφορά το μάρτυρα στα πειράματα με τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, οι υπολογισμοί έχουν ως εξής: 0,122 για τις 24h, 0,078 για τις 36h, 0,117 για τις 48h, και 0,088 για τις 72h για το γονίδιο της *BCL2*, 43,586 για τις 24h, 33,726 για τις 36h, 43,525 για τις 48h, και 28,836 για τις 72h για το γονίδιο της *BAX*, 5,418 για τις 24h, 3,453 για τις 36h, 4,944 για τις 48h, και 4,444 για τις 72h για το γονίδιο της *BIM* και 348,444 για τις 24h, 293,006 για τις 36h, 317,098 για τις 48h, και 225,938 για τις 72h για το γονίδιο της της *NOXA*.

Έτσι, προκύπτουν οι πραγματικοί λόγοι (mRNA αντίγραφα_γονίδιο-στόχος / mRNA αντίγραφα B2M)_{Δείγμα} για κάθε ιστό που μελετάμε ή κύτταρα στα οποία έχουμε επιδράσει με χημειοθεραπευτικό παράγοντα, οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου, και συγκρίσιμοι μεταξύ τους. Τέλος, οι λόγοι αυτοί πολλαπλασιάζονται με τον αριθμό 1.000, και έτσι προκύπτουν οι λόγοι mRNA αντίγραφα γονίδιο-στόχος / 1.000 mRNA αντίγραφα B2M)_{Δείγμα}(c/Kc).

2.7. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου σημείου λήψης απόφασης (cutoff) για την έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10*, καθώς δεν υπάρχουν καθιερωμένα σημεία για την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος X-tile. Ο αλγόριθμος X-tile επιτρέπει τον προσδιορισμό του βέλτιστου σημείου cutoff, διορθώνοντας ως προς τη χρήση της στατιστικά ελάχιστης τιμής *p* (*p*-value) [414]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι για τη στατιστική διόρθωση της ελάχιστης τιμής p (p-value). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Monte Carlo και υπολογίστηκε η τιμή p, με χρήση του λογισμικού X-tile. Τα σημεία cutoff που δίνουν Monte Carlo τιμές p<0,05 είναι ανθεκτικά και δεν περιέχουν σφάλματα τύπου Ι. Στη συνέχεια, έγινε διόρθωση της τιμής p κατά Miller-Sigmund [415]. Με τον τρόπο αυτό, υπολογίστηκε ένα βέλτιστο cutoff 3,51 c/Kc για την KLK10, ίσο με το 50° εκατοστημόριο της έκφρασης mRNA της. Έπειτα από τον υπολογισμό αυτό, η έκφραση mRNA της *KLK10* χαρακτηρίστηκε ως θετική ή αρνητική, ανάλογα με το αν ήταν μεγαλύτερη ή μικρότερη από το αντίστοιχο σημείο.

Η ανάλυση της διαφοράς των επιπέδων έκφρασης της *KLK10* σε 54 ζεύγη πρωτοπαθών καρκινικών και φυσιολογικών ιστολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου έγινε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Wilcoxon signed-rank. Η σχέση μεταξύ της έκφρασης mRNA της *KLK0* με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (ποιοτικές μεταβλητές) έγινε χρησιμοποιώντας το τεστ χ² ή τη στατιστική δοκιμασία Fisher, όπου αυτή κρίθηκε καταλληλότερη. Επιπλέον, προκειμένου να εκτιμηθεί η σχέση μεταξύ των δεικτών πρόγνωσης και του σχετικού κινδύνου εμφάνισης υποτροπής (disease-free survival, DFS) ή θανάτου των ασθενών (overall survival, OS), αναπτύχθηκαν μοντέλα μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου κατά Cox [416]. Τέλος, έγινε ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και κατασκευάστηκαν καμπύλες ελευθέρας νόσου και ολικής επιβίωσης [417], οι διαφορές μεταξύ των οποίων εκτιμήθηκαν με τη στατιστική δοκιμασία log rank (Mantel-Cox).

2.8. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

2.8.1. Αρχή της μεθόδου

Η ELISA είναι πιθανά η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη ανοσολογική δοκιμασία κυρίως εξαιτίας της πολλαπλής χρησιμότητας, ευαισθησίας, ειδικότητας, και ευκολίας αυτοματισμού. Η ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενός αντιγόνου ή αντισώματος σε ένα δείγμα. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως διαγνωστικό εργαλείο, κυρίως εξαιτίας των προτερημάτων που προαναφέρθηκαν.

Στην ELISA, μία άγνωστη ποσότητα ενός αντιγόνου ακινητοποιείται σε μία πλαστική επιφάνεια ενός τρυβλίου και ανιχνεύεται από ένα ειδικό για το συγκεκριμένο αντιγόνο αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο, έτσι ώστε μετά την προσθήκε του υποστρώματος του ενζύμου, να έχουμε ανιχνεύσιμο σήμα. Στην

113

περίπτωση για παράδειγμα της ELISA φθορισμού, όταν ένα τρυβλίο εκτεθεί σε φως κατάλληλου μήκους κύματος, κάθε σύμπλεγμα αντιγόνου/αντισώματος θα φθορίσει και έτσι ανάλογα με το μέγεθος του σήματος θα συμπεράνουμε και την ποσότητα του αντιγόνου [418].

Πιο αναλυτικά, το δείγμα με την άγνωστη ποσότητα αντιγόνου ακινητοποιείται σε ένα σταθερό σημείο (πολυστυρένιο τρυβλίο 96 θέσεων ειδικό για ELISA-96 well ELISA plate) είτε μη ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια) είτε ειδικά (μέσω πρόσδεσης από ένα άλλο ειδικό αντίσωμα για το ίδιο αντιγόνο - "sandwich" ELISA). Μετά την ακινητοποίηση του αντιγόνου προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης, το οποίο και δημιουργεί ένα σύμπλοκο με το αντιγόνο. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με ένα ένζυμο ή μπορεί να ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο και να είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο. Ανάμεσα σε κάθε στάδιο το τρυβλίο πλένεται με ένα ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών ή των αντισωμάτων που δεν έχουν προσδεθεί ειδικά. Μετά και το τελευταίο πλύσιμο, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου προκειμένου να παραχθεί σήμα το οποίο και θα αναλογεί στην ποσότητα του αντιγόνου στο εκάστοτε δείγμα. Το υπόστρωμα μπορεί να είναι χρωμογόνο ή φθορογόνο, από τα οποία το δεύτερο ποαρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Παρόλο που ορισμένα υποστρώματα είναι καρκινογόνα, είναι γενικά πιο ασφαλή από τα ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται σε τεχνικές ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA). Η διαδικασία, επίσης, μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και έτσι να πραγματοποιείται ταυτόχρονα σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

2.8.2. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία τύπου σάντουιτς (Sandwich ELISA)

Η ELISA τύπου σάντουιτς (Sandwich ELISA) είναι μια παραλλαγή της κλασικής μεθόδου ELISA (Εικόνα 2.7), τα βήματα της οποίας περιλαμβάνουν:

- επίστρωση ενός πλακιδίου μικροτιτλοδότησης ELISA 96 θέσεων (96-well plate) με το αντίσωμα πρόσδεσης (capture antibody)
- προσθήκη των δειγμάτων- όπου υπάρχει το αντιγόνο, προσδένεται από το αντίσωμα πρόσδεσης
- πλύση του πλακιδίου ELISA ώστε να απομακρυνθεί το μη προσδεδεμένο αντιγόνο
- προσθήκη πρώτου αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody), το οποίο επίσης
 προσδένεται στο ακινητοποιημένο πλέον αντιγόνο

- προσθήκη δεύτερου αντισώματος ανίχνευσης, το οποίο είναι ειδικό για το πρώτο αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό είναι επίσης συζευγμένο και με το ένζυμο της επιλογής μας
- πλύση του πλακιδίου ELISA ώστε να απομακρυνθεί το μη προσδεδεμένο δεύτερο αντίσωμα ανίχνευσης
- προσθήκη υποστρώματος ενζύμου το οποίο ανάλογα το ένζυμο θα μας δώσει χρώμα,
 φθορισμό ή ηλεκτροχημικό σήμα
- μέτρηση σήματος για τον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσης του υπό εξέταση αντιγόνου



Εικόνα 2.7. Σύστημα ανίχνευσης με ELISA τύπου σάντουιτς (Sandwich ELISA).

2.8.3. Προετοιμασία κυτταρολυμάτων από ιστούς

Από κάθε ιστολογικό δείγμα παχέος εντέρου, ομογενοποιήθηκαν 0,150g σε ειδικό ομογενοποιητή. Συγκεκριμένα, αφού καταψύξαμε τα δείγματα σε υγρό άζωτο, τα τοποθετήσαμε σε ειδικό σωλήνα μικροφυγοκέντρου (eppendorf). Σε κάθε eppendorf προστέθηκε μία σιδερένια μπίλια και κονιορτοποιήσαμε εφαρμόζοντας 10000rpm για 40sec, 2 φορές. Κατόπιν προσθέσαμε 1ml του ρυθμιστικού διαλύματος (3,03g 50mM Tris(pH 8,0), 4,38g 150mM NaCl, 0,93g 5mM EDTA, 1% NP-40, 1mM PMSF, 5mg Aprotinin και 5mg Leupeptin, σε 500 ml απιονισμένου νερού), ακολούθησε έντονη ανάδευση, επώαση στον πάγο για 30min και φυγοκέντρηση για 30min στις 14000rpm στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση, στο οποίο περιέχονταν οι πρωτεῒνες. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας.

2.8.4. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford [419], η οποία βασίζεται στην ιδιότητα τους να αντιδρούν σε όξινο περιβάλλον με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, παρέχοντας προϊόντα κυανού χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας μια σειρά γνωστών σειριακών συγκεντρώσεων αλβουμίνης βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA). Σε 96-well plate βάλαμε 10μl από κάθε πρότυπο και 10μl από κάθε δείγμα εις τριπλούν. Στη συνέχεια προσθέσαμε σε κάθε well 250μl αντιδραστήριο και το αφήσαμε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Μετρήσαμε ακολούθως απορρόφηση στα 590nm με το Wallac 1420 Workstation.

2.8.5. Συνθήκες ELISA τύπου σάντουιτς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της KLK10 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιστών παχέος εντέρου

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκεντρώσεις 0, 0,2, 0,5, 2, 5 και 20 μg/L, η αραίωση των οποίων έγινε με διάλυμα BSA 6%. Αρχικά, επιστρώθηκαν τα μικροπλακίδια τιτλοδότησησης 96 θέσεων με το αντίσωμα πρόσδεσης (capture antibody, μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την KLK10), το οποίο αραιώσαμε σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (coating buffer, 50 mmol/L Tris buffer, pH 7,8), ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 500ng/100μl, και επωάσαμε για 12h. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων (9 g/L NaCl, 0,5 g/L Tween 20, 10 mmol/L Tris buffer, pH 7,40) και κατόπιν προστέθηκαν στα μικροπλακίδια 50μl από κάθε πρότυπο διάλυμα και 50μι από κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα, εις διπλούν. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε τέλος και 50μl ρυθμιστικό διάλυμα της μεθόδου (assay buffer, 60 g/L BSA, 50 mmol/L Tris (pH 7,8), 0,5 g/L sodium azide, 10 g/L bovine IgG, 2,5% normal mouse serum, 10% normal goat serum) και τα μικροπλακίδια τιτλοδότησης τοποθετήθηκαν για επώαση για 2h, υπό ανάδευση. Ακολούθησαν 6 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεως και προσθήκη 100μl/πηγαδάκι του αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody, βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την KLK10), το οποίο ειχαμε προηγουμένως αραιώσει σε assay buffer. Αφού τα δείγματα επωάστηκαν υπό ανάδευση για 1h, ακολούθησαν επιπλέον 6 πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100μ/πηγαδάκι στρεπταβιδίνης (Jackson ImmunoResearch), την οποία είχαμε προηγουμένως αραιώσει σε διάλυμα BSA 6%. Μετά από 15min επώαση υπό ανάδευση, ακολούθησαν 6 πλύσεις με

116

washing buffer και προσθήκη 100µl/πηγαδάκι του υποστρώµατος της στρεπταβιδίνης (DFP, Diflunisal phosphate), το οποίο είχαµε αραιώσει σε ρυθµιστικό διάλυµα υποστρώµατος (substrate buffer, 0,1 mol/L Tris(pH 9,1), 0,1 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂). Μετά από επώαση υπό ανάδευση για 10min, προστέθηκαν 100µl/πηγαδάκι διαλύµατος ανάπτυξης (developing solution, 1 mol/L Tris base, 0,4 mol/L NaOH, 2 mmol/L TbCl₃, 3 mol/L EDTA), και τελευταία επώαση υπό ανάδευση για 2min. Η μέτρηση του εκπεµπόµενου φθορισµού έγινε με το Cyberfluor 615 Immunoanalyzer (MDS Nordion).

Για να προσδιορίσουμε τη γραμμικότητα της μεθόδου, αραιώσαμε σειριακά διάφορα κλινικά δείγματα 2-, 4-, 8-, 16- και 32 φορές σε διάλυμα BSA 6% και στη συνέχεια μετρήσαμε τη συγκέντρωση της KLK10 στα δείγματα αυτά. Επιπλέον, λόγω της ομοιότητας των KLKs, αλλά και για να σιγουρευτούμε για την ειδικότητα της μεθόδου, μετρήσαμε διαλύματα που περιείχαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλλες KLKs. Δεν ανιχνεύσαμε σε κανένα από αυτά τα δείγματα KLK10, που σημαίνει ότι η μέθοδός μας διακρίνει αποτελεσματικά την KLK10 από άλλες ομόλογες πρωτεΐνες και ότι έχει υψηλή ειδικότητα. Ελέγχοντας και την ευαισθησία της μεθόδου, βρήκαμε ότι με αυτό το πρωτόκολλο μπορούμε να μετρήσουμε KLK10 σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0,05-20 μg/L. Το πρωτόκολλο αυτό έχει για πρώτη φορά αναπτυχθεί στο εργαστήριο του Καθηγητή Ε.P.Diamandis στο Mount Sinai Hospital του Toronto [420].

2.9. Απομόνωση πρωτεϊνών, στύπωση Western και ανοσοεντοπισμός της poly(ADPριβόζη)-πολυμεράσης (PARP)

Η στύπωση Western είναι μια αναλυτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα ή ομογενοποίημα ιστού. Το πρώτο βήμα είναι η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, με σκοπό το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, εφόσον η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιηθεί σε αποδιατακτικές συνθήκες, ή με βάση το φορτίο τους, εφόσον η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιηθεί σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Ακολούθως, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης PARP, γίνεται η ανίχνευσή της.

2.9.1. Απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών από την καρκινική κυτταρική σειρά HT-29

Για την απομόνωση ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών συλλέχθηκαν κύτταρα σε 1ml διάλυμα λύσης (3,03g 50mM Tris (pH 8,0), 4,38g 150mM NaCl, 0,93g 5mM EDTA, 1% NP-40, 1mM PMSF, 5mg Aprotinin και 5mg Leupeptin, σε 500 ml απιονισμένου νερού), από μια επιφάνεια καλλιέργειας κυττάρων 75 cm². Ακολούθησε έντονη ανάδευση, επώαση στον πάγο για 30min και φυγοκέντρηση για 30min στις 14000rpm στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση, στο οποίο περιέχονταν οι πρωτεῒνες. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford.

2.9.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται είναι το θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS), το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, ανάλογο του μοριακού τους βάρους, το οποίο και οφείλεται για την κίνηση τους στο πήκτωμα μετά την εφαρμογή σε αυτό ηλεκτρικού πεδίου [421]. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli [422].

Το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελούνταν από 12% πολυακρυλαμίδιο (1:30 ακρυλαμίδιο:δισακρυλαμίδιο) σε διάλυμα 0,375 M Tris-HCl με pH=8,8, 0,1% (κ.β.) SDS, 0,1% (κ.β.) APS και 0,04% (κ.ό.) TEMED. Το πήκτωμα συμπύκνωσης αποτελείτο από 5% πολυακρυλαμίδιο(1:30 ακρυλαμίδιο:δισακρυλαμίδιο) σε διάλυμα 0,125 M Tris-HCl με pH=6,8, 0,1% (κ.β.) SDS, 0,1% (κ.β.) APS και 0,1% (κ.ό.) TEMED. Μετά την παρασκευή του, το πήκτωμα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου και καλύφθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), pH 8,3. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιελάμβανε την προσθήκη του ανάλογου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης, ώστε κάθε δείγμα να αποκτήσει τελική συγκέντρωση 10 mM Tris-HCl, 10% (κ.ό.) γλυκερόλη, 2% (κ.β.) SDS, 5 % (κ.ό.) β-μερκαπτοαιθανόλη, και 0,002% χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 10 min και

118

ακολούθησε η ηλεκτροφόρησή τους, παράλληλα με μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen), σε συνθήκες σταθερής τάσης 150V και σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα επωάζεται για 45 min σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, ώστε να εμφανισθούν οι ζώνες όλων των πρωτεϊνών και να σιγουρευτούμε για τη σωστή διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια ακολουθούν πλύσεις διάλυμα αποχρωματισμού [7% (κ.ό.) οξικό οξύ, 50% (κ.ό.) μεθανόλη], έως ότου επιτευχθεί ο αποχρωματισμός του πηκτώματος.

2.9.3. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

τεχνική της ηλεκτροφορητικής μεταφοράς πρωτεϊνών Η σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έγινε σε συσκευή ημίξηρης μεταφοράς Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories) [423]. Μετά την SDS-ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα, 6 φίλτρα χρωματογραφίας Whatman 3M και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, που θα χρησιμοποιηθούν στην ακόλουθη μεταφορά, τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς [48 mM Tris-HCl με pH=9,2, 39 mM γλυκίνη, 20% (κ.ό.) μεθανόλη, 3,75% (κ.β.) SDS], για 10 min, προκειμένου να εξισορροπηθούν. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν στη συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς με την εξής διάταξη: 3 φίλτρα Whatman 3M τοποθετήθηκαν στη μεταλλική άνοδο, ακολούθησε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και τέλος τα υπόλοιπα 3 φίλτρα Whatman 3M. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε η κάθοδος της συσκευής, προκειμένου να κλείσει το κύκλωμα, και πραγματοποιήθηκε η μεταφορά σε συνθήκες σταθερής τάσης 15 V για 30 min.

Μετά το τέλος της διαδικασίας, γίνεται έλεγχος της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αυτό γίνεται με εμβάπτιση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα που περιέχει τη χρωστική Ponceaux S (0,2% (κ,β,) Ponceaux S σε 35% (κ.ό.) τριχλωροξικό οξύ), για 3 min. Ακολουθούν πλύσεις διάλυμα TNT[10 mM Tris-HCl με pH=8,0, 150 mM NaCl, 0,05% (κ.β.) Tween-20] έως ότου επιτευχθεί ο πλήρης αποχρωματισμός της μεμβράνης.

2.9.4. Ανοσοεντοπισμός της poly(ADP-ριβόζη)-πολυμεράσης (PARP) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγόνουαντισώματος. Χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για την ανίχνευση μιας πρωτεῒνης, από τα οποία το πρώτο είναι ειδικό και αναγνωρίζει το αντιγόνο που είναι ακινητοποιημένο στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και το δεύτερο είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, ALP), και καταλύοντας την οξείδωση του υποστρώματος BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) παρουσία του οξειδωτικού NBT (nitro blue tetrazolium chloride), η οποία είναι μία χρωμογόνος αντίδραση, έχουμε την εμφάνιση της επιθυμητής ζώνης. Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν του εμπορίου (Santa Cruz) και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν αυτό που πρότεινε η εταιρεία. Το δεύτερο αντίσωμα ήταν επίσης του εμπορίου (Sigma-Aldrich Co.), παρασκευάστηκε έναντι των ανοσοσφαιρινών G (IgG) του κουνελιού και ήταν συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση, ενώ είχε απομονωθεί από ορό κατσίκας.

Η τεχνική που εφαρμόστηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου του Batteiger και των συνεργατών του [424]. Σύμφωνα με αυτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρθηκε σε διάλυμα κορεσμού (2% (κ.β.) BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων), σε θερμοκρασία 4°C για 16 ώρες. Μετά την απομάκρυνση του BSA, προστέθηκε το διάλυμα του πρώτου αντισώματος σε αραίωση 1:1000 σε διάλυμα κορεσμού, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 3 πλύσεις για 10 min σε διάλυμα TNT υπό ανάδευση, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος που δεν είχε δεσμευτεί στη μεβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάστηκε με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος, σε αραίωση 1:20000 σε διάλυμα κορεσμού, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν άλλες 3 πλύσεις, με σκοπό την απομάκρυνση και του δεύτερου αντισώματος που δεν είχε δεσμευτεί στη μεμβράνη. Τέλος, η μεμβράνη επωάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης [100 mM Tris-HCl με pH=9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂] υπό ανάδευση, και μετά από 30 min., προστέθηκε το διάλυμα της χρωματικής αντίδρασης [0,033% (κ.β.) NBT (Applichem GmbH) και 0,0165% (κ.β.) BCIP (Applichem GmbH) σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφάνισης]. Μετά την εμφάνιση της έγχρωμης ζώνης που αντιστοιχεί στην υπομονάδα της PARP, η αντίδραση διακόπηκε με απεσταγμένο νερό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και ομογενοποιημένους ιστούς παχέος εντέρου

Η μάζα κάθε ιστού παχέος εντέρου που υποβλήθηκε στη διαδικασία της ομογενοποίησης και της εκχύλισης του ολικού RNA, ήταν 100 mg. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και ομογενοποιημένους ιστούς παχέος εντέρου. Ακολούθησε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσής του και εκτίμηση της ποιότητάς του απομονωμένου ολικού RNA ηλεκτροφορητικά. Ο φασματοφωτομετρικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με την εκτίμηση του λόγου (λ=A₂₆₀/A₂₈₀) των απορροφήσεων του διαλύματος του ολικού RNA στα 260 nm και 280 nm. Επιλέχθηκαν έτσι τα δείγματα καλής ποιότητας RNA, με λόγο απορροφήσεων 1,8 έως 2,2. Επίσης, κατόπιν ηλεκτροφόρησης 1 μg ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (κ.β.), διαπιστώθηκε για ποια δείγματα το απομονωμένο ολικό RNA δεν ήταν αποικοδομημένο, καθώς ήταν ορατές οι ζώνες των μορίων rRNA 18S και 28S (Εικόνα 3.1), χωρίς να εμφανίζονται προϊόντα αποικοδόμησης. Τα δείγματα με αποικοδομημένο RNA εξαιρέθηκαν από τη συνέχεια.



Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου ολικού RNA από ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου. Για τα περισσότερα δείγματα, διακρίνονται οι ζώνες των μορίων 18S και 28S rRNA, χωρίς προϊόντα αποικοδόμησης.

3.2. Ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου KLK10 σε ιστούς παχέος εντέρου

Αφού έγινε απομόνωση ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές HT-29 και DLD-1, καθώς και σύνθεση cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης mRNA των γονιδίων αναφοράς *B2M* και *GAPDH*, με συμβατική PCR. Κατόπιν ανίχνευσης της ισοσταθμισμένης έκφρασης των γονιδίων αυτών, μελετήθηκε η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* στις δυο αυτές καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος

εντέρου (Εικόνα 3.2). Για το σκοπό αυτό, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», σχεδιάστηκαν ζεύγη ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση του cDNA όλων των μεταγράφων του γονιδίου *KLK10*. Στη συνέχεια, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για την ενίσχυση της *KLK10*. Κατόπιν δοκιμής διαφορετικών θερμοκρασιών (60° έως 63°C, ανά 1°C), συγκεντρώσεων MgCl₂ (1,5 έως 3,0 mM, ανά 0,50 mM) και αριθμών θερμικών κύκλων (32, 35, και 38 κύκλοι) για την ενίσχυση του cDNA καθενός από τα παραπάνω γονίδια, καταλήξαμε στις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 2.5.4.3.

Βρέθηκε, λοιπόν, ότι το γονίδιο *KLK10* εκφράζεται τόσο στα κύτταρα HT-29 όσο και στα κύτταρα DLD-1. Ως θετικός μάρτυρας για τη συνέχεια των πειραμάτων με συμβατική PCR επιλέχθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά DLD-1, ενώ για την ποσοτική PCR που ακολούθησε, επιλέχθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά HT-29.



Εικόνα 3.2. Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου *KLK10* σε κύτταρα DLD-1 και HT-29. Μ: Δείκτης Μοριακού Βάρους, NC: Αρνητικός μάρτυρας (Negative control).

3.2.1. Μελέτη της συνολικής έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* σε καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου με συμβατική PCR

Αρχικά, η μελέτη της έκφρασης mRNA της *KLK10* στους ιστούς παχέος εντέρου έγινε με συμβατική PCR, ξεκινώντας αποκλειστικά από cDNA με ισοσταθμισμένη έκφραση των γονιδίων αναφοράς. Κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR των ιστολογικών δειγμάτων που είχαν συγκεντρωθεί, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στην ένταση της αναμενόμενης ζώνης, τόσο μεταξύ των καρκινικών ιστών όσο και ύστερα από σύγκριση αυτών με τους φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση mRNA της *KLK10* μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών παχέος εντέρου. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των τριών γονιδίων σε πέντε ζεύγη πρωτοπαθούς καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού παχέος εντέρου.



Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Μ: Δείκτης Μοριακού Βάρους. 1, 3, 5, 7, και 9: Καρκινικοί ιστοί παχέος εντέρου. 2, 4, 6, 8, και 10: Φυσιολογικοί ιστοί παχέος εντέρου. PC: HT-29 ως θετικός μάρτυρας (Positive control). NC: Αρνητικός μάρτυρας (Negative control).

3.2.2. Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου *KLK10* σε καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου με συμβατική PCR

Η μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων της *KLK10* σε ιστούς παχέος εντέρου έγινε με συμβατική PCR, ξεκινώντας αποκλειστικά από cDNA με ισοσταθμισμένη έκφραση των γονιδίων αναφοράς. Κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR των ιστολογικών δειγμάτων που είχαν συγκεντρωθεί, διαπιστώθηκε ότι το εναλλακτικό μετάγραφο 3 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα HT-29 και όχι σε άλλα δείγματα μεταξύ 20 καρκινικών δειγμάτων παχέος εντέρου που επιλέχθηκαν τυχαία. Αντιθέτως, αξιοσημείωτες διαφορές στην ένταση της αναμενόμενης ζώνης μεταξύ των καρκινικών ιστών παχέος εντέρου παρατηρήθηκαν για τα εναλλακτικά μετάγραφα 1 και 2. Και τα δύο αυτά μετάγραφα βρέθηκε, επίσης, ότι εκφράζονται στην καρκινική κυτταρική σειρά HT-29. Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR των τριών γονιδίων σε τέσσερα ζεύγη πρωτοπαθούς καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού παχέος εντέρου.



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Μ: Δείκτης Μοριακού Βάρους, 1, 3, 5, 7: Καρκινικοί ιστοί παχέος εντέρου. 2, 4, 6, 8: Παρακείμενοι Φυσιολογικοί ιστοί παχέος εντέρου. 9: ΗΤ-29 ως θετικός μάρτυρας (Positive control). 10: Αρνητικός μάρτυρας (Negative control).

3.2.3. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* σε καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου με ποσοτική real-time PCR

Λόγω των σημαντικών διαφορών που παρατηρήθηκαν στην ένταση της αναμενόμενης ζώνης για την *KLK10* στο σύνολο των ιστολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου που είχαν συλλεχθεί, κρίθηκε σκόπιμος ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA του γονιδίου αυτού με PCR σε πραγματικό χρόνο. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε μεθοδολογία και εφαρμόστηκε στα ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου (Εικόνα 3.5 A).

Στα πλαίσια ανάπτυξης της μεθοδολογίας αυτής, έγινε δοκιμή διάφορων συγκεντρώσεων των παραπάνω εκκινητών (25, 50, 75, και 100 nM), προκειμένου να βρεθεί για κάθε ζεύγος εκκινητών η συγκέντρωση που οδηγεί στη σύνθεση της μέγιστης δυνατής ποσότητας του επιθυμητού προϊόντος PCR, χωρίς σχηματισμό διμερών των εκκινητών και/ή άλλων μη ειδικών προϊόντων (Εικόνα 3.5 B). Αυτή η βέλτιστη τελική συγκέντρωση για καθέναν εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε στην ποσοτική real-time PCR ήταν 75 nM για το γονίδιο *B2M* και 100 nM για το γονίδιο *KLK10*. Για όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης συνθηκών της ποσοτικής real-time PCR, χρησιμοποιήθηκε cDNA από την καρκινική κυτταρική σειρά HT-29. Οι συνθήκες στις οποίες καταλήξαμε μετά από τα πειράματα βελτιστοποίησης, περιγράφονται στις παραγράφους 2.6.4.1 και 2.6.4.2.


Εικόνα 3.5. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες ενίσχυσης (A) και αποδιάταξης (B) ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR), για τα γονίδια *B2M* και *KLK10*. Διακρίνεται τόσο η πολύ καλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (A) όσο και η ειδικότητα των προϊόντων της αντίδρασης (B).

3.2.4. Έλεγχος εγκυρότητας της μεθόδου σύγκρισης των C_T (2^{-ΔΔC}T) για το σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK10* ως προς τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *B2M*

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου σύγκρισης C_T (2^{-ΔΔC}T) είναι να έχουν οι αντιδράσεις ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς αποδόσεις που πλησιάζουν το 100% και σχεδόν ίσες μεταξύ τους, κάτι που μπορεί να ελεγχθεί με τη βοήθεια κατάλληλου πειράματος [425]. Για το σκοπό αυτό, οι τιμές C_T για το γονίδια-στόχο (*KLK10*) και το γονίδιο αναφοράς (*B2M*) μετρήθηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις του cDNA του θετικού μάρτυρα (κυτταρική σειρά HT-29) σε μια κλίμακα 1.000 φορών. Συγκεκριμένα, σε κάθε συγκέντρωση προέκυψαν τρία C_T για κάθε γονίδιο, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι C_T (C_T (*B2M*) και C_T (*KLK10*) και τα τυπικά σφάλματά τους, υπολογίστηκαν οι διαφορές των μέσων όρων ΔC_T (*KLK10*) και τα τυπικά σφάλματά τους, και τέλος οι λόγοι των αριθμών των αντιγράφων mRNA του γονιδίου *KLK10* ως προς τον αριθμό αντιγράφων mRNA του γονιδίου σταθερής έκφρασης, *B2M*, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια:

$$\Delta C_{\scriptscriptstyle T,KLK10} = C_{\scriptscriptstyle T,KLK10} - C_{\scriptscriptstyle T,B2M}, \text{ Kai: } \frac{mRNA_\alpha v \tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha_KLK10}{mRNA_\alpha v \tau i \gamma \rho \alpha \phi \alpha_B2M} = 2^{-\Delta CT,KLK10}$$

Ακολούθως, οι μέσες τιμές των C_T για κάθε γονίδιο σε κάθε συγκέντρωση (C_{T,KLK10} και C_{T,B2M}) (Πίνακας 3.1) παραστήθηκαν συναρτήσει του δεκαδικού λογαρίθμου της μάζας ολικού RNA (Εικόνα 3.6). Η κλίση καθεμίας ευθείας του διαγράμματος αυτού ήταν περίπου ίση με -3,32, μια τιμή κλίσης που αντιστοιχεί σε απόδοση 100%, δηλαδή οι αποδόσεις ενίσχυσης των τμημάτων cDNA (amplicons) των δυο γονιδίων ήταν σχεδόν 100%.

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα του προσδιορισμού της σχετικής ποσότητας των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK10* ως προς τον αριθμό μεταγράφων mRNA του γονιδίου *B2M*. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σε μια σειρά διαφορετικών ποσοτήτων cDNA, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε ένα μεγάλο εύρος αρχικών μαζών ολικού RNA.

Μάζα BNA (ng)	$M_{c\sigma} C_{m} + S F^{\alpha}$	Μέσο C _{T,KLK10} ±
Maya KNA (lig)	$111200 C_{T,B2M} \pm 5.12.$	S.E. ^a
100	$15,18 \pm 0,02$	$23,32 \pm 0,05$
10	$18,\!47 \pm 0,\!08$	$26,\!64 \pm 0,\!04$
1	$21,99 \pm 0,11$	$29,93 \pm 0,10$



Εικόνα 3.6. Πρότυπες καμπύλες ενίσχυσης των cDNA των γονιδίων *B2M* και *KLK10*. Τα σφάλματα μέτρησης του C_T σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων cDNA ήταν ελάχιστα.

Επίσης, τα ΔC_T (οι διαφορές $C_{T,KLK10} - C_{T,B2M}$) (Πίνακας 3.1) παραστήθηκαν συναρτήσει του δεκαδικού λογαρίθμου μάζας ολικού RNA (Εικόνα 3.7). Η κλίση της ευθείας του διαγράμματος αυτού ήταν σχεδόν μηδενική, γεγονός που φανερώνει ότι οι αποδόσεις ενίσχυσης των τμημάτων cDNA (amplicons) των δυο γονιδίων ήταν σχεδόν ίσες. Επιπλέον, ο σταθερός όρος της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων για το ΔC_T (*KLK10*) ήταν 6,502, γεγονός που συνεπάγεται με βάση την παραπάνω σχέση ότι η έκφραση mRNA της *KLK10* ως προς αυτή της *B2M* ήταν 2^{-6,502}=0,011, δηλαδή στα καρκινικά κύτταρα HT-29 τα επίπεδα mRNA της *KLK10* είναι 90 φορές χαμηλότερα από αυτά του γονιδίου *B2M*.



Εικόνα 3.7. Έλεγχος εγκυρότητας της μεθόδου σύγκρισης των $C_T (2^{-\Delta\Delta C}T)$ για τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων mRNA του γονιδίου *KLK10*.

3.3. Ποσοτική ανάλυση και κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* στον καρκίνο του παχέος εντέρου

3.3.1. Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* σε ιστούς παχέος εντέρου

Στη μελέτη έκφρασης mRNA της *KLK10* συμπεριελήφθησαν 136 καρκινικά και 54 φυσιολογικά ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου. Στα δείγματα των οποίων η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* ήταν χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης, αποδόθηκε τιμή έκφρασης ίση με το υποδιπλάσιο της ελάχιστης αξιόπιστα μετρήσιμης έκφρασης mRNA της *KLK10*. Η έκφραση mRNA της *KLK10* σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου ήταν σημαντικά αυξημένη, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (*P*<0.001), όπως έδειξε το Mann-Whitney *U* τεστ (Εικόνα 3.8). Συγκεκριμένα, η έκφραση mRNA της *KLK10* στα καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου κυμάνθηκε από 0,001 έως 336,12 RQU (αντίγραφα mRNA της *KLK10* / 1.000 αντίγραφα mRNA της *B2M*) με μέση τιμή 19,22±4,42, ενώ στα φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου κυμάνθηκε από 35,0 έως 93,0 έτη με μέση τιμή 66,5±1,1, και το μέγεθος του όγκου κυμάνθηκε από 1,00 έως 14,00 cm με μέση τιμή 4,73±0,19. Επίσης, η ολική επιβίωση κυμάνθηκε από 1,0 έως 135,0 μήνες με μέση τιμή 48,8±3,5 (Πίνακας 3.2).

			Εκατοστημόρια		
			25°	50°	75°
Μεταβλητή	Μέση τιμή ± S.E. ^β	Εύρος		Διάμεσος	
<i>ΚLΚ10</i> στα καρκινικά δείγματα (μονάδες RQU ^α , N=136)	$19,22 \pm 4,42$	0,001 - 336,12	0,88	3,51	12,59
<i>KLK10</i> στα φυσιολογικά δείγματα (μονάδες RQU ^a , N=54)	$0,58 \pm 0,33$	0,001 – 16,76	0,013	0,046	0,17
Ηλικία ασθενών (έτη, N=132)	$66,5 \pm 1,1$	35,0-93,0	58,5	68,0	75,0
Μέγεθος όγκου (cm, N=128)	$4{,}73\pm0{,}19$	1,00 - 14,00	3,05	4,20	5,50
Ολική επιβίωση (μήνες, N=121)	$48,8\pm3,5$	1,0 – 135,0	17,0	49,0	77,5

Πίνακας 3.2. Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών της μελέτης στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.

 $^{\alpha}$ αντίγραφα mRNA της KLK10 / 1.000 αντίγραφα mRNA της B2M.

^β Τυπικό σφάλμα (standard error).



Εικόνα 3.8. Σχετική έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου. Με οριζόντια γραμμή σημειώνεται το 50° εκατοστημόριο (διάμεσος τιμής) της καθεμιάς κατανομής.

Η σύγκριση της έκφρασης mRNA της *KLK10* σε 54 ζεύγη καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου έδειξε, επίσης, σημαντική υπερέκφραση της *KLK10* στους κακοήθεις όγκους παχέος εντέρου (Πίνακας 3.3 και Εικόνα 3.9).

Πίνακας 3.3. Έκφραση mRNA του γονιδίου KLK10 σε 54 ζεύγη δειγμάτων ιστών παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών (%)	Τιμή <i>p</i>
Έκφραση mRNA της <i>KLK10</i> (N=54)		
υψηλότερη στον καρκινό συγκριτικά με το φυσιολογικό ιστό	51 (94,4)	<0,001 ^α
ίση μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού δείγματος	1 (1,9)	
χαμηλότερη στον καρκινό συγκριτικά με το φυσιολογικό ιστό	2 (3,7)	

^α Υπολογισμένη με τη δοκιμασία Wilcoxon signed-rank.



Εικόνα 3.9. Σχετική έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε 54 ζεύγη καρκινικών και φυσιολογικών ιστολογικών δειγμάτων παχέος εντέρου.

3.3.2. Διαγνωστική αξία της έκφρασης mRNA της *KLK10* για τον καρκίνο του παχέος εντέρου

Για την αξιολόγηση της δυνατότητας χρήσης της έκφρασης mRNA της *KLK10* ως πιθανού βιοδείκτη για τη διάκριση μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών παχέος εντέρου, διεξήχθη ανάλυση ROC (receiver operating characteristic analysis). Όπως φαίνεται στην καμπύλη ROC (Εικόνα 3.10), η έκφραση mRNA της *KLK10* μπορεί να ξεχωρίσει με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, ταυτόχρονα, τους καρκινικούς από τους φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου (εμβαδό κάτω από την καμπύλη [AUC]=0,889, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [95% CI]=0,849-0,951, P<0,001).



Εικόνα 3.10. Καμπύλη ROC για τη σχετική έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*.

3.3.3. Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA της *KLK10* και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου

Η έκφραση mRNA της *KLK10* ήταν σημαντικά αυξημένη σε όγκους παχέος εντέρου προχωρημένου σταδίου (*P*=0,036) (Εικόνα 3.11 A) και/ή υψηλού βαθμού αποδιαφοροποίησης (*P*=0,025) (Εικόνα 3.11 B) έναντι όγκων χαμηλού και/ή χαμηλού βαθμού αποδιαφοροποίησης, αντίστοιχα, καθώς και σε ασθενείς με λεμφαδενικές (P=0,046) (Εικόνα 3.11 Γ) και/ή απομακρυσμένες μεταστάσεις (P=0,027) (Εικόνα 3.11 Δ) έναντι ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες και/ή χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, οι τιμές έκφρασης της *KLK10* κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (θετική ή αρνητική), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.7. Από τα 136 καρκινώματα παχέος εντέρου, 68 (50,0%) ταξινομήθηκαν ως θετικά και 68 (50,0%) ως αρνητικά ως προς την έκφραση mRNA της *KLK10*.



Εικόνα 3.11. Σχετική έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* σε υποομάδες καρκινικών ιστών παχέος εντέρου. Με οριζόντια γραμμή σημειώνεται το 50° εκατοστημόριο της καθεμιάς κατανομής.

Η σταδιοποίηση κατά Dukes και ο βαθμός αποδιαφοροποίησης του όγκου φαίνεται να σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με την έκφραση mRNA της *KLK10* (Πίνακας 3.4), καθώς ορθοκολικοί όγκοι προχωρημένου σταδίων ή υψηλού βαθμού αποδιαφοροποίησης ήταν συχνότερα θετικοί ως προς την έκφραση της *KLK10* σε αντίθεση με όγκους αρχικών σταδίων ή χαμηλού βαθμού αποδιαφοροποίησης (*P*=0,012 και *P*=0,023, αντίστοιχα). Η έκφραση της *KLK10* βρέθηκε, επιπλέον, ότι σχετίζεται οριακά στατιστικώς σημαντικά με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων (*P*=0,05).

		Αριθμός ασθενών (%)			
Μεταβλητή	Σύνολο	<i>KLK10-</i> αρνητικοί ^α	<i>KLK10-</i> θετικοί ^α	Τιμή <i>p</i>	
Κατάσταση λεμφαδένων					
Αρνητική	74	42 (56,8)	32 (43,2)	0,05 ^β	
Θετική	55	21 (38,2)	34 (61,8)		
Х	7				
Στάδιο Dukes					
А	19	14 (73,7)	5 (26,3)	0,012γ	
В	54	28 (51,9)	26 (48,1)		
C / D	54	19 (35,2)	35 (64,8)		
Х	9				
Βαθμός αποδιαφοροποίησης					
I / II	106	55 (51,9)	51 (48,1)	0,023 ^β	
III	18	4 (22,2)	14 (77,8)		
Х	12				

Πίνακας 3.4. Σχέση μεταξύ της έκφρασης της ΚLK10 και άλλων κλινικοπαθολογικών μεταβλητών.

^α Σημείο λήψης απόφασης (cutoff): 3,51 μονάδες RQU, ίσο με το 50° εκατοστημόριο.

^β Υπολογισμένη με τη δοκιμασία Fisher (Fisher's exact test).

 $^{\gamma}$ Υπολογισμένη με τη δοκιμασία χ^2 (Pearson's chi-square test).

Χ: Άγνωστο.

3.3.4. Αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* και της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου

Επί συνόλου 121 ασθενών για τους οποίους κατέστη δυνατή η μετεγχειρητική παρακολούθηση (follow-up), 37 (30,6%) εμφάνισαν υποτροπή και 31 (25,6%) κατέληξαν. Η μονομεταβλητή ανάλυση Cox φανερώνει την ισχύ της σχέσης μεταξύ καθεμίας κλινικοπαθολογικής παραμέτρου και της επιβίωσης των ασθενών. Η σταδιοποίηση κατά Dukes, ο βαθμός αποδιαφοροποίησης των ορθοκολικών καρκινωμάτων και η ύπαρξη θετικών λεμφαδένων αποδείχτηκαν σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (disease-free survival, DFS) και την ολική επιβίωση (overall survival, OS), όπως ήταν αναμενόμενο. Εκτός από αυτούς τους παράγοντες όμως, η μονομεταβλητή ανάλυση (Πίνακας 3.5) έδειξε ότι η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* συνιστά ένα σημαντικό προγνωστικό δείκτη τόσο για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (P=0,017) όσο και για την ολική επιβίωση (P=0,025), καθώς οι ασθενείς που ήταν θετικοί για την έκφραση mRNA της *KLK10* εμφάνισαν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής (HR=2,35) και κατάληξης από τη συγκεκριμένη νόσο (HR=2,43).

	Ελεύθερη νόσου επιβίωση				Ολική επιβίωσ		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>Ρ</i>	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>Ρ</i>	
Μεταβλητή	Μονομεταβλητή ανάλυση (N=121)						
Έκφραση mRNA της <i>KLK10</i>							
Αρνητική	1,00			1,00			
Θετική	2,35	1,16-4,77	0,017	2,43	1,12-5,28	0,025	
Μέγεθος όγκου (cm)	1,03	0,89-1,19	0,68	0,98	0,84-1,15	0,84	
Θετικοί λεμφαδένες	2,35	1,28-4,31	0,006	1,94	1,01-3,71	0,045	
Στάδιο Dukes	3,11	2,03-34,77	<0,001	2,70	1,75-4,17	<0,001	
Βαθμός αποδιαφοροποίησης	3,82	2,01-7,32	<0,001	3,87	1,91-7,83	<0,001	
	Πολυμεταβλητή ανάλυση (N=121)						
Έκφραση mRNA της <i>KLK10^γ</i>							
Αρνητική	1,00			1,00			
Θετική	2,36	1,09-5,08	0,040	2,75	1,16-6,52	0,021	
Έκφραση mRNA της <i>KLK10</i> ^δ							
Αρνητική	1,00			1,00			
Θετική	1,41	0,63-3,16	0,48	1,72	0,71-4,19	0,23	

Πίνακας 3.5 Προγνωστική αξία της έκφρασης mRNA της KLK10 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

^α Αναλογικός κίνδυνος (hazard ratio), εκτιμώμενος από μοντέλο παλινδρόμησης Cox.

^β Διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

^γ Τα πολυπαραμετρικά μοντέλα προσαρμόστηκαν για την ύπαρξη θετικών λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου των ασθενών.

^δ Τα πολυπαραμετρικά μοντέλα προσαρμόστηκαν για το στάδιο Dukes και το βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου των ασθενών.

Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, επίσης, δείχνουν ότι ασθενείς με θετικούς για την έκφραση της *KLK10* ορθοκολικούς όγκους έχουν σημαντικά μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση (P=0,014) από αυτούς που φέρουν αρνητικούς για την έκφραση της *KLK10* κακοήθεις όγκους (Εικόνα 3.12 Α). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για την ολική επιβίωση, καθώς ασθενείς με θετικούς για την έκφραση της *KLK10* ορθοκολικούς όγκους επιβίωσαν για μικρότερο χρονικό διάστημα (P=0,020) (Εικόνα 3.12 Β).



Εικόνα 3.12. Καμπύλες Kaplan-Meier για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (A) και την ολική επιβίωση (B) των ασθενών, θετικών ή αρνητικών ως προς την έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10*.

Τα μοντέλα πολυμεταβλητής παλινδρόμησης Cox που αναπτύχθηκαν έδειξαν ότι η έκφραση mRNA της *KLK10* διατήρησε τη στατιστικώς σημαντική προγνωστική της αξία τόσο για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (HR=2,36, P=0,040) όσο και για την ολική επιβίωση (HR=2,75, P=0,021) των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, όταν τα πολυπαραμετρικά αυτά μοντέλα προσαρμόστηκαν για την ύπαρξη θετικών λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου των ασθενών (Πίνακας 3.5). Με άλλα λόγια, η έκφραση mRNA της *KLK10* είναι ένας δυσμενής προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ανεξάρτητος από την ύπαρξη θετικών λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου των ασθενών.

3.4. Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης KLK10 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Στη μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης KLK10 συμπεριελήφθησαν 157 καρκινικά και 122 φυσιολογικά ιστολογικά δείγματα παχέος εντέρου. Στα δείγματα των οποίων η έκφραση της πρωτεΐνης KLK10 ήταν χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης, αποδόθηκε τιμή έκφρασης ίση με το υποδιπλάσιο της ελάχιστης αξιόπιστα μετρήσιμης έκφρασης της KLK10. Η πρωτεϊνική έκφραση της KLK10 σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου ήταν σημαντικά αυξημένη, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (P<0.001), όπως έδειξε το Mann-Whitney U τεστ (Εικόνα 3.13). Συγκεκριμένα, στους κακοήθεις όγκους παχέος εντέρου η έκφραση της πρωτεΐνης KLK10 είχε μέσο όρο 4,70 ng/mg ολικής πρωτεΐνης και μέγιστη τιμή 51,16 ng/mg ολικής πρωτεΐνης, ενώ στα φυσιολογικά δείγματα παχέος εντέρου η έκφραση της KLK10 είχε μέσο όρο 0,10 ng/mg ολικής πρωτεΐνης και μέγιστη τιμή 0,23 ng/mg ολικής πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.13. Έκφραση της KLK10 σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου.

3.5. Μελέτη της επίδρασης αντικαρκινικών φαρμάκων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου

Όπως προαναφέρθηκε, η ανάλυση επιβίωσης έδειξε στατιστικώς σημαντικά μικρότερες πιθανότητες ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης για τους ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο που έφεραν νεοπλασίες θετικές για την έκφραση mRNA του γονιδίου KLK10. Με στόχο την ερμηνεία των ευρημάτων αυτών, αλλά και την ανάπτυξη μιας νέας μοριακής μεθόδου πρόβλεψης κατάλληλου συστηματικού θεραπευτικού χειρισμού του παχέος εντέρου, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη καρκίνου του της επίδρασης χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (φθοροουρακίλη, γεμσιταβίνη, δοσεταξέλη, οξαλιπλατίνη και σισπλατίνη) στην έκφραση mRNA του γονιδίου KLK10, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση, στην καρκινική κυτταρική σειρά ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος ΗΤ-29.

3.5.1. Διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς ΗΤ-29

Με στόχο τη διερεύνηση της ικανότητας αύξησης της καρκινικής κυτταρικής σειράς HT-29, κατασκευάστηκε καμπύλη ανάπτυξης αυτής (Εικόνα 3.14). Δοκιμάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις εμφύτευσης κυττάρων και μελετώντας την κυτταρική αύξηση ανά 24h για ένα διάστημα 96h αφότου τα κύτταρα είχαν κολλήσει στο ταπήτιο, βρέθηκε η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση εμφύτευσης για την κυτταρική σειρά HT-29, έτσι ώστε τα κύτταρα να παραμένουν σε εκθετική φάση ανάπτυξης μετά και από 72 h. Η συγκέντρωση αυτή βρέθηκε ίση με 30.000 κύτταρα/mL θρεπτικού υλικού (δηλ. 600.000 κύτταρα / 20 mL θρεπτικού υλικού ή, ισοδύναμα, 600.000 κύτταρα / 75 cm² επιφάνεια).



Εικόνα 3.14. Καμπύλη ανάπτυξης της καρκινικής κυτταρικής σειράς ΗΤ-29. Τα κύτταρα εμφυτεύτηκαν εις εξαπλούν σε πέντε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις, μεταξύ 15.000 κύτταρα/mL και 50.000 κύτταρα/mL θρεπτικού υλικού, όπως σημειώνεται στο υπόμνημα του σχήματος. Η συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/mL επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη για τη συνέχεια των πειραμάτων.

3.5.2. Διερεύνηση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων ΗΤ-29 παρουσία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Στα σχήματα που ακολουθούν φαίνεται η βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου, HT-29 (Εικόνα 3.15), παρουσία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων φθοροουρακίλη, γεμσιταβίνη, δοσεταξέλη, οξαλιπλατίνη και σισπλατίνη, τα οποία έχουν προστεθεί σε ποικίλες συγκεντρώσεις, με σκοπό την εύρεση της συγκέντρωσης εκείνης για κάθε φάρμακο που είναι τοξική σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων HT-29 (IC₅₀) ύστερα από 48h ή 72h, χωρίς να προκαλεί εκτεταμένα φαινόμενα νέκρωσης, αλλά οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση ως επί το πλείστον (Πίνακας 3.6). Η μέτρηση του αριθμού των ζώντων και των νεκρών κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer μετά από τρία χρονικά διαστήματα έκθεσης (24h, 48h και 72h) των καρκινικών κυτταρικών σειρών HT-29 σε μια συγκέντρωση για κάθε χημειοθεραπευτικό παράγοντα, η οποία επιλέχθηκε προηγουμένως μεταξύ άλλων με βάση τις καμπύλες βιωσιμότητας, κατέδειξε ότι η εκάστοτε τέτοια συγκέντρωση προκαλούσε εκτεταμένη απόπτωση και όχι νέκρωση σε ευρεία κλίμακα.









Εικόνα 3.15. Καμπύλες βιωσιμότητας των κυττάρων ΗΤ-29, κατόπιν επίδρασης με φθοροουρακίλη, γεμσιταβίνη, δοσεταξέλη, οξαλιπλατίνη και σισπλατίνη, σε διάφορες συγκεντρώσεις για κάθε χημειοθεραπευτικό φάρμακο, όπως φαίνεται στο υπόμνημα που συνοδεύει κάθε καμπύλη βιωσιμότητας. Για κάθε χημειοθεραπευτικό παράγοντα επιλέχθηκε η συγκέντρωση που είναι τοξική σε περίπου 50% των κυττάρων (IC₅₀), χωρίς παράλληλα να προκαλεί εκτεταμένα νεκρωτικά φαινόμενα, αλλά κυρίως αποπτωτικά.

Πίνακας 3.6. Για την καρκινική κυτταρική σειρά HT-29, επιλέχθηκε η συγκέντρωση καθενός από τους πέντε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν και που είναι τοξική σε περίπου 50% των κυττάρων (IC₅₀), χωρίς παράλληλα να προκαλεί εκτεταμένη νέκρωση.

Χημειοθεραπευτικό φάρμακο	Συγκέντρωση (nM)	Συγκέντρωση (ng/mL)
Φθοροουρακίλη	5	0,650
Γεμσιταβίνη	5	1,316
Δοσεταξέλη	50	40,39
Οξαλιπλατίνη	50	19,864
Σισπλατίνη	3.000	0,903

3.5.3. Μελέτη της επαγόμενης απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων ΗΤ-29 παρουσία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Ο έλεγχος για την επαγωγή της απόπτωσης από την επιλεγμένη συγκέντρωση του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα έγινε με ανοσοεντοπισμό ενός πολυπεπτιδικού θραύσματος 89 kDa της πρωτεΐνης PARP κατόπιν στύπωσης Western (Εικόνες 3.16 – 3.17). Ο έλεγχος για την ύπαρξη αυτού του πολυπεπτιδίου, που υποδηλώνει ότι λαμβάνει χώρα αποπτωτικός θάνατος στα καρκινικά κύτταρα, έγινε σε πρωτεΐνικό εκχύλισμα από καρκινικά κύτταρα HT-29 κατόπιν 48 h ή 72h επίδρασης του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού φαρμάκου.



Εικόνα 3.16. Στύπωμα Western για την πρωτεΐνη PARP. Κατόπιν επίδρασης σισπλατίνης, οξαλιπλατίνης, ή φθοροουρακίλης επί 48 h ή 72h, τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε απόπτωση, η οποία συνοδεύτηκε από πρωτεόλυση της πρωτεΐνης PARP σε συγκεκριμένη θέση, δημιουργώντας έτσι ένα πολυπεπτιδικό θραύσμα 89 kDa.



Εικόνα 3.17. Στύπωμα Western για την πρωτεΐνη PARP. Κατόπιν επίδρασης γεμσιταβίνης ή δοσεταξέλης επί 48h, τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε απόπτωση, που συνοδεύτηκε από πρωτεόλυση της πρωτεΐνης PARP σε συγκεκριμένη θέση, δημιουργώντας έτσι ένα πολυπεπτιδικό θραύσμα 89 kDa.

3.5.4. Μελέτη της έκφρασης mRNA αποπτωτικών γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα HT-29

Αρχικά, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών συμβατικής PCR, ειδικών για κάθε επιθυμητή αλληλουχία. Στη συνέχεια, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για την ενίσχυση του cDNA των γονιδίων BCLX, MCL1, BAX, BAK1, BID, PUMA (BBC3), BIRC5 (Survivin) και P21 (CDKN1A), από την καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HT-29. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο B2M. Κατόπιν δοκιμής μιας σειράς διαφορετικών θερμοκρασιών και αριθμών θερμικών κύκλων για την ενίσχυση του cDNA καθενός εκ των παραπάνω γονιδίων (ξεχωριστά), επιλέχθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.5.4.1

Ακολούθως, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών real-time PCR, ειδικών για κάθε επιθυμητή αλληλουχία. Στη συνέχεια, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών της real-time PCR για την ενίσχυση του cDNA όλων των μεταγράφων των γονιδίων *KLK10* και *BAX*, του μετάγραφου *BCL2-alpha* του γονιδίου *BCL2* (το μετάγραφο αυτό κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική ισομορφή BCL2), καθώς και των μεταγράφων των γονιδίων *BIM* και *NOXA* (*PMAIP1*), από την καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HT-29. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *B2M*. Κατόπιν δοκιμής μιας σειράς διαφορετικών θερμοκρασιών και αριθμών θερμικών κύκλων για την ενίσχυση του cDNA καθενός εκ των παραπάνω γονιδίων (ξεχωριστά), επιλέχθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται στις παραγράφους 2.6.4.1 έως 2.6.4.6.

Όπως φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνες 3.18 – 3.32), παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν στα κύτταρα HT-29 που καλλιεργήθηκαν παρουσία αντικαρκινικών φαρμάκων. Συγκεκριμένα, για όλα τα φάρμακα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης των αντιαποπτωτικών μεταγράφων $BCLX_L$ και $MCL1_L$ των γονιδίων BCLX και MCL1, αντίστοιχα. Αντίθετα, σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των προαποπτωτικών μεταγράφων $BCLX_S$ και $MCL1_S$ των γονιδίων BCLX και MCL1, αντίστοιχα, ενώ διαφορετικής έκτασης ήταν ανά φάρμακο οι μεταβολές στην έκφραση mRNA των προαποπτωτικών γονιδίων BAX, BAK1, BIM, BID, NOXA (PMAIP1), και PUMA (BBC3). Επίσης, πάντοτε σε σύγκριση με τα κύτταρα όπου δεν είχε προηγηθεί επίδραση με κάποιο αντικαρκινικό φάρμακο, σημειώθηκαν εμφανείς μεταβολές των επιπέδων πRNA του αναστολέα της απόπτωσης BIRC5 (Survivin) και του γονιδίου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου P21 (CDKN1A).



Εικόνα 3.18. Έκφραση των γονιδίων *BCLX*, *MCL1*, *BAX*, και *BAK1*, σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με φθοροουρακίλη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 72 ώρες (24h και 72h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.19. Έκφραση των γονιδίων *BID*, *PUMA* (*BBC3*), *BIRC5* (*Survivin*), και *P21* (*CDKN1A*), σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με φθοροουρακίλη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 72 ώρες (24h και 72h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.20. Σχετική έκφραση των γονιδίων *KLK10*, *BCL2*, *BAX*, *BIM*, και *NOXA* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε κύτταρα HT-29 κατόπιν επίδρασης με φθοροουρακίλη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 72 ώρες (24h και 72h ανάκαμψη), σε σχέση με κύτταρα HT-29 απουσία φαρμάκου.



Εικόνα 3.21. Έκφραση των γονιδίων *BCLX*, *MCL1*, *BAX*, και *BAK1*, σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με γεμσιταβίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.22. Έκφραση των γονιδίων *BID*, *PUMA* (*BBC3*), *BIRC5* (*Survivin*), και *P21* (*CDKN1A*), σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με γεμσιταβίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.23. Σχετική έκφραση των γονιδίων *KLK10*, *BCL2*, *BAX*, *BIM*, και *NOXA* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε κύτταρα HT-29 κατόπιν επίδρασης με γεμσιταβίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη), σε σχέση με κύτταρα HT-29 απουσία φαρμάκου.



Εικόνα 3.24. Έκφραση των γονιδίων *BCLX*, *MCL1*, *BAX*, και *BAK1*, σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με δοσεταξέλη, ύστερα από 24, 36, και 48 ώρες (24h, 36h, και 48h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.25. Έκφραση των γονιδίων *BID*, *PUMA* (*BBC3*), *BIRC5* (*Survivin*), και *P21* (*CDKN1A*), σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με δοσεταξέλη, ύστερα από 24, 36, και 48 ώρες (24h, 36h, και 48h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.26. Σχετική έκφραση των γονιδίων *KLK10*, *BCL2*, *BAX*, *BIM*, και *NOXA* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε κύτταρα HT-29 κατόπιν επίδρασης με δοσεταξέλη, ύστερα από 24, 36, και 48 ώρες (24h, 36h, και 48h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη), σε σχέση με κύτταρα HT-29 απουσία φαρμάκου.



Εικόνα 3.27. Έκφραση των γονιδίων *BCLX*, *MCL1*, *BAX*, και *BAK1*, σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με οξαλιπλατίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.28. Έκφραση των γονιδίων *BID*, *PUMA* (*BBC3*), *BIRC5* (*Survivin*), και *P21* (*CDKN1A*), σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με οξαλιπλατίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.29. Σχετική έκφραση των γονιδίων *KLK10*, *BCL2*, *BAX*, *BIM*, και *NOXA* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε κύτταρα HT-29 κατόπιν επίδρασης με οξαλιπλατίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη), σε σχέση με κύτταρα HT-29 απουσία φαρμάκου.



Εικόνα 3.30. Έκφραση των γονιδίων *BCLX*, *MCL1*, *BAX*, και *BAK1*, σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με σισπλατίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.31. Έκφραση των γονιδίων *BID*, *PUMA* (*BBC3*), *BIRC5* (*Survivin*), και *P21* (*CDKN1A*), σε κύτταρα HT-29 με ισοσταθμισμένη έκφραση του γονιδίου αναφοράς, απουσία χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (0h) και κατόπιν επίδρασης με σισπλατίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη).



Εικόνα 3.32. Σχετική έκφραση των γονιδίων *KLK10*, *BCL2*, *BAX*, *BIM*, και *NOXA* ως προς την έκφραση του γονιδίου *B2M*, σε κύτταρα HT-29 κατόπιν επίδρασης με σισπλατίνη, ύστερα από 24, 36, 48 και 72 ώρες (24h, 36h, 48h και 72h), καθώς και κατόπιν αφαίρεσης του φαρμάκου ύστερα από 24 και 48 ώρες (24h και 48h ανάκαμψη), σε σχέση με κύτταρα HT-29 απουσία φαρμάκου.

Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με το ότι η συγκέντρωση κάθε αντικαρκινικού φαρμάκου που επιλέχθηκε αντιστοιχούσε στο IC_{50} , όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, υποδηλώνουν ότι η τοξικότητα που προκλήθηκε στα κύτταρα HT-29 από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, στην εκάστοτε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, οφειλόταν σε απόπτωση, και όχι σε νέκρωση ή άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η πιο συχνή κακοήθης πάθηση του πεπτικού συστήματος σε ΗΠΑ και Ευρώπη. Παγκοσμίως, αποτελεί το 9,4% όλων των περιστατικών καρκίνου στους άνδρες και το 10,1% στις γυναίκες, ενώ υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο 394.000 άνθρωποι πεθαίνουν από καρκίνο του παχέος εντέρου [4]. Στις ΗΠΑ, το 2013, η νόσος ευθυνόταν για το 8,7% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο. Στην Ευρώπη, αποτελεί τη δεύτερη πιο συνηθισμένη νεοπλασία στις γυναίκες και την τρίτη στους άνδρες, καθώς επίσης τη δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου, και στα δύο φύλα [6]. Στη χώρα μας, ο καρκίνος του παχέος εντέρου καταλαμβάνει την τέταρτη θέση των αιτιών θανάτου από νεοπλάσματα [7]. Τα ποσοστά επίπτωσής του έχουν ελαττωθεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Η μείωση αυτή έχει αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση των προσυμπτωματικών ελέγχων, που επιτρέπουν την ανίχνευση και αφαίρεση των πολυπόδων του παχέος εντέρου, πριν την πρόοδό τους σε καρκίνο. Σε αντίθεση με το συνολικό ποσοστό μείωσης εμφάνισης της νόσου, σε άτομα ηλικίας κάτω των 50 ετών, οι οποίοι δεν αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου και στους οποίους δε συνιστάται προσυμπτωματικός έλεγχος, τα ποσοστά εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου έχουν αυξηθεί κατά περίπου 2% ετησίως από το 1994, σε άνδρες και γυναίκες. Την ίδια περίοδο, τα ποσοστά θνησιμότητας έχουν μειωθεί και στα δύο φύλα. Η συνολική μείωση στην επίπτωση και θνησιμότητα, αντικατοπτρίζουν βελτιώσεις στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία του ορθοκολικού καρκίνου [4].

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου καθορίζεται από τα παθολογοανατομικά και μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου. Υπάρχουν τρία συστήματα σταδιοποίησης του ορθοκολικού καρκίνου: κατά Dukes, κατά Astler-Coller, και το σύστημα TNM/AJCC. Κοινό κριτήριο για τα τρία αυτά συστήματα σταδιοποίησης είναι ο βαθμός εξάπλωσης του καρκίνου στις στοιβάδες του εντερικού τοιχώματος, τα παρακείμενα και τα απομακρυσμένα όργανα [71]. Η ταξινόμηση κατά Dukes βασίζεται στην τοπική έκταση της νόσου και στην παρουσία διηθημένων λεμφαδένων και σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου. Το σύστημα Dukes κατατάσσει τον ορθοκολικό καρκίνο σε στάδια από Α έως και C [72]. Η τροποποίησή κατά Astler-Coller στην κατά Dukes ταξινόμηση, προσθέτει το στάδιο D και διαιρεί τα επιμέρους στάδια σε υποστάδια [73]. Το σύστημα TNM (Tumors, Nodes, Metastases) αποτελεί το συνηθέστερο σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου, που έχει καθιερωθεί από τη Διεθνή Ένωση Κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer: UICC). Με το σύστημα αυτό, εκτιμώνται τρεις παράμετροι: ο πρωτοπαθής όγκος (T), η παρουσία θετικών επιχώριων λεμφαδένων (N) και η ύπαρξη απομακρυσμένων

μεταστάσεων σε άλλους ιστούς και/ή όργανα (M) [75]. Το στάδιο ενός ορθοκολικού κακοήθη όγκου περιγράφεται με χρήση των λατινικών αριθμών Ι έως IV, έτσι ώστε ένας υψηλός αριθμός σταδίου να φανερώνει έναν περισσότερο προχωρημένο όγκο.

Οι κυριότεροι καρκινικοί δείκτες παχέος εντέρου που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη κλινική πράξη είναι το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο CEA (carcinoembryonic antigen), το υδατανθρακικό αντιγόνο 19-9 (carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9), το καρκινικό αντιγόνο 72-4 (cancer antigen 72-4, CA 72-4) [86-88] και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου των ιστών PLAT (tissue plasminogen activator) [89].

Έχουν αναγνωριστεί αρκετοί προγνωστικοί δείκτες και δείκτες πρόβλεψης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αν και πολύ λίγοι από αυτούς χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται για την επανεμφάνιση της νόσου και την πρόβλεψη της συνολικής επιβίωσης ασθενών σταδίου ΙΙ και ΙΙΙ [426]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS χρησιμοποιούνται επίσης στην κλινική πράξη, ως δείκτης πρόγνωσης κακής απόκρισης σε θεραπεία με αντι-EGFR αντισώματα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παγέος εντέρου [427, 428]. Έχουν αναγνωριστεί και άλλοι προγνωστικοί δείκτες, οι οποίοι περιλαμβάνουν την απώλεια της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 18q [429], καρκινικά αντιγόνα, όπως το CEA, CA19-9 [430], και RCAS1 [431], ένζυμα όπως η θυμιδυλική συνθετάση [432] και η L-DOPA αποκαρβοξυλάση [433], σχετιζόμενα γονίδια με την απόπτωση γονίδια, όπως BCL2 [434] και BCL2L12 [435], οι οποίοι όμως δε χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη. Κανένας προγνωστικός δείκτης για απόκριση σε επικουρική θεραπεία δεν έχει φτάσει ακόμα στην κλινική πράξη, αν και ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι οι όγκοι MSI είναι ανθεκτικοί στην θεραπεία με φθοροουρακίλη [436, 437]. Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι μια πολύπλοκη ασθένεια και οι βιοδείκτες ορού που είναι τώρα στην κλινική πράξη, χαρακτηρίζονται από έλλειψη σε ειδικότητα και ευαισθησία. Υπάρχει μια επείγουσα ανάγκη για την ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών εάν μια πιο αποτελεσματική διάγνωση, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία θέλουμε να επιτευχθεί.

Η οικογένεια γονιδίων των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών είναι η μεγαλύτερη συνεχόμενη γονιδιακά οικογένεια πρωτεασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, χωρίς παρέμβαση από άλλα γονίδια. Βρίσκονται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3-q13.4 και κωδικοποιούν για 15 πολύ συντηρημένες πρωτεάσες σερίνης [157]. Η οικογένεια των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών αποτελεί ελκυστικό τομέα μελέτης, καθώς ένα από τα μέλη της, το διάσημο PSA/KLK3, είναι ο πλέον αποδεκτός και ευρέως χρησιμοποιημένος καρκινικός δείκτης, μέχρι σήμερα [438]. Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, μελέτες έχουν
υποδείξει άλλα μέλη της οικογένειας ως πιθανούς δείκτες πρόγνωσης ή/και πρόβλεψης, συμπεριλαμβανομένων των *KLK4* [439] και *KLK7*, σε επίπεδο mRNA [220], καθώς και KLK5, KLK7 και KLK11,σε επίπεδο πρωτεῒνης [195].

Το γονίδιο της *KLK10* είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ιστικών καλλικρεϊνών. Κλωνοποιήθηκε το 1996, με τη μέθοδο του αφαιρετικού υβριδισμού, που βασίστηκε στη μείωση της έκφρασής του σε μία τροποποιημένη με ακτινοβολία επιθηλιακή κυτταρική σειρά μαστού [121]. Το μήκος του γονιδίου της *KLK10* είναι περίπου 5.5 kb και αποτελείται από έξι εξώνια, το ένα από τα οποία είναι αμετάφραστο, και πέντε ιντρόνια. Έχουν αναφερθεί τρία εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου τα οποία και έχουν καταχωρηθεί με GenBank accession No. NM_002776, NM_145888, NM_001077500 ως SV1, SV2 και SV3 αντιστοίχως. Και τα τρία εναλλακτικά μετάγραφα κωδικοποιούν για την ίδια ώριμη πρωτεΐνη και οι διαφορές τους φαίνονται να είναι στο πρώτο αμετάφραστο εξώνιο. Από in silico μελέτες έχουν χαρακτηριστεί και άλλα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου, για τα οποία όμως ακόμα απαιτείται και πειραματική επιβεβαίωση [259]. Το γονίδιο *KLK10* κωδικοποιεί για μια εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης με ενζυμική ενεργότητα θρυψίνης, που αποτελείται από 276 αμινοξέα από τα οποία τα 234 συνιστούν την ώριμη πρωτεΐνη και έχει μοριακό βάρος 30 kDa [270].

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να αξιολογηθεί ο πιθανός ρόλος της KLK10 ως καρκινικός δείκτης [440]. Λόγω των υψηλότερων επιπέδων της στους καρκινικούς ιστούς και στον ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, η KLK10 έχει προταθεί ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο των ωοθηκών, σε συνδυασμό με τον ήδη χρησιμοποιούμενο δείκτη CA125, για αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας [235, 441-444]. Η έκφραση mRNA της KLK10 βρέθηκε επίσης να αυξάνεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του παγκρέατος, από *in silico* μελέτες EST και SAGE βιβλιοθηκών [445].

Αντίθετα, η έκφραση της KLK10 έχει βρεθεί να ελαττώνεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού και προστάτη, όπως επίσης και σε όγκους μαστού [446, 447] και όρχεων [448]. Επιμόλυνση με KLK10 μιας ιδιαίτερα επιθετικής καρκινικής κυτταρικής σειράς μαστού, η οποία δεν εξέφραζε KLK10, οδήγησε σε καταστολή του καρκινογόνου φαινότυπου σε knock-out ποντίκια [446]. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο χαρακτηρισμό της KLK10 ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο [230]. Ωστόσο, όταν μετρήθηκαν τα επίπεδα της KLK10 στον ορό γυναικών με κακοήθεις ή καλοήθεις όγκους μαστού, καθώς και σε υγιείς μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά [449]. Το εύρημα αυτό βέβαια δεν ήταν περίεργο, δεδομένου ότι η KLK10 είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη

που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς. Έτσι, στον ορό θα μετρηθούν τα συνολικά επίπεδα της έκκρισής της KLK10 από πολλαπλούς ιστούς, και αυτό μάλλον καθιστά δύσκολη την ανίχνευση μιας διαφοράς που προκαλείται από τα κύτταρα των όγκων. Ωστόσο, μια τέτοια διαφορά παρατηρήθηκε στον ορό των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών [235].

Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να αναλύσουν το μηχανισμό της απώλειας της έκφρασης τη KLK10 σε μερικούς καρκίνους. Τα αποτελέσματα πρότειναν ότι η υπερμεθυλίωση του γονιδίου είναι ίσως η αιτία της αποσιώπησής του, και όχι η διαγραφή ή η αναδιάταξη του γονιδίου. Δεδομένου ότι η περιοχή του υποκινητή της φαίνεται να είναι φτωχή σε νησίδες CpG, και επίσης πως οι περισσότερες καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι σε θέση να υποστηρίξουν πλήρη ή μερική μεταγραφή από τον υποκινητή της *KLK10*, ένας άλλος μηχανισμός θεωρήθηκε υπεύθυνος για την απώλεια της έκφρασης της KLK10. Οι περιοχές που ανακαλύφθηκαν και μελετήθηκαν ως πιθανότερες περιοχές μεθυλίωσης είναι τα εξώνια 2-4, ειδικά το εξόνιο 3, τα οποία είναι πλούσια σε CpG [232, 273, 274].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, έγινε κλινική αξιολόγηση του γονιδίου *KLK10* για πιθανή εφαρμογή του ως νέο προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Για την επίτευξη της κλινικής αυτής αξιολόγησης, έγινε μελέτη της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* στον καρκίνο του παχέος εντέρου, τόσο με συμβατική RT-PCR όσο και με μεθοδολογία ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR), η οποία αναπτύχθηκε για το σκοπό αυτό, καθώς επίσης και ανίχνευση της πρωτεῒνης KLK10, με ανοσοδοκιμασία ELISA. Δεν υπάρχουν και δεν χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα kit για τους παραπάνω προσδιορισμούς αλλά πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας των τεχνικών που αναπτύχθηκαν ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των προσδιορισμών. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε εκτενής βιοστατιστική ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές μεθοδολογίες, ανάλυση ROC, ανάλυση Kaplan Meier, καθώς και ανάλυση μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής παλινδρόμησης.

Τα αποτελέσματα, τόσο αυτά που προέκυψαν με χρήση συμβατικής RT-PCR όσο και αυτά της ποσοτικής RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, δείχνουν ότι η έκφραση mRNA του γονιδίου KLK10 σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους του καρκίνου του παχέος εντέρου, συμπεριλαμβανομένων της σταδιοποίησης κατά Dukes (p=0,036), του βαθμού αποδιαφοροποίησης (p=0,025), της μετάστασης στους λεμφαδένες (p=0,046) και της μετάστασης σε απομακρυσμένα όργανα (p=0,027). Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier έδειξε στατιστικώς σημαντικά μικρότερες πιθανότητες ελεύθερης νόσου (DFS) και ολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών με θετική έκφραση mRNA του γονιδίου της KLK10 (p=0,014 και p=0,020, αντίστοιχα). Η

έκφραση της πρωτεΐνης KLK10 ήταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p<0,001) υψηλότερη στα καρκινικά δείγματα απ'ότι στα φυσιολογικά, με τις τιμές της να αγγίζουν τα 51,16 ng ανά mg ολικής πρωτεΐνης, με μέσο όρο 4,6993 ng KLK10 ανά mg ολικής πρωτεΐνης. Αντιθέτως, η υψηλότερη τιμή των φυσιολογικών δειγμάτων ήταν μόλις 0,23 ng ανά mg ολικής πρωτεΐνης, με αντίστοιχο μέσο όρο 0,1042 ng KLK10 ανά mg ολικής πρωτεΐνης. Συμπερασματικά, στους καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου της *KLK10*. Η υπερέκφραση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και μπορεί να συνιστά ένα χρήσιμο μοριακό δείκτη.

Η βασική θεραπεία του εντοπισμένου καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η χειρουργική επέμβαση, η οποία σε αρκετές περιπτώσεις συνδυάζεται με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία συνίσταται στην χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία αλληλεπιδρώντας με το DNA ή ρυθμίζοντας έναν ή περισσότερους βιοχημικούς παράγοντες, επηρεάζουν μονοπάτια που εμπλέκονται στην απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και την καρκινογένεση, καταστρέφοντας τελικά τα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η συμπληρωματική χημειοθεραπευτική αγωγή, που γίνεται μετεγχειρητικά, περιλαμβάνει τη χορήγηση συνδυασμού των αντικαρκινικών παραγόντων 5-φθοροουρακίλη ή Capecitabine (Xeloda), Λευκοβορίνη (Φολινικό οξύ) και Οξαλιπλατίνη (Eloxatin) (θεραπευτικό σχήμα FOLFOX) [10]. Στην περίπτωση κατά την οποία υπάρχει μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου, τα πλέον συνήθη χημειοθεραπευτικά σχήματα περιλαμβάνουν έναν συνδυασμό χορήγησης 5-φθοροουρακίλης, λευκοβορίνης, και οξαλιπλατίνης (FOLFOX) ή ιρινοτεκάνης (FOLFIRI), πάντοτε μαζί με Bevacizumab (Avastin) [105].

Η απόπτωση (ή «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος») συνδέεται με ένα σύνολο βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη μορφογένεση, την ομοιόσταση των ιστών, τη γήρανση, την εξάλειψη κυττάρων μολυσμένων από ιούς, και την καταστροφή αυτοαντιδρώντων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος [296]. Τυχόν βλάβες στην απόπτωση μπορεί να επιβραδύνουν ή ακόμα και να ανακόψουν το φυσιολογικό ρυθμό ανανέωσης των κυττάρων του οργανισμού, προκαλώντας έτσι συσσώρευση κυττάρων και σχηματισμό όγκου [299]. Επιπλέον, ελαττωματικοί αποπτωτικοί μηχανισμοί μπορεί να ευθύνονται για την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπεία, ακτινοβολίες, στέρηση

τροφικών παραγόντων, υποξία, οξειδωτικό στρες, και άλλα αίτια που προκαλούν κυτταρικό θάνατο, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες [300].

Μια ποικιλία φυσιολογικών σημάτων θανάτου, καθώς και παθολογικές κυτταρικές προσβολές, διεγείρουν το γενετικά προγραμματισμένο μονοπάτι της απόπτωσης [450]. Μετά από ένα σήμα θανάτου, η απόπτωση που ακολουθεί χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των κασπασών και από δυσλειτουργία των οργανιδίων, από τα οποία η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη [306, 320]. Στο μονοπάτι αυτό, εμπλέκεται η οικογένεια BCL2, τα μέλη της οποίας φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην απόφαση ενός κυττάρου αν θα ζήσει ή θα πεθάνει. Το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε ήταν το πρωτο-ογκογονίδιο *BCL2*, ενώ έκτοτε η οικογένεια έχει επεκταθεί σημαντικά και περιλαμβάνει προ- καθώς και αντι-αποπτωτικά μόρια. Μάλιστα, η αναλογία μεταξύ αυτών των δύο μορίων φαίνεται να καθορίζει,εν μέρει, την ευαισθησία των κυττάρων σε ένα σήμα θανάτου [342]. Ένα χαρακτηριστικό των μελών αυτής της οικογένειας είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν όμο - καθώς και ετεροδιμερή. Στη δεύτερη περίπτωση, τα ετεροδιμερή που σχηματίζονται έχουν στόχο την εξουδετέρωση της δράσης των αντιαποπτωτικών μορίων.

Ελλείψει ενός σήματος θανάτου, το μεγαλύτερο ποσοστό των προαποπτωτικών μελών της οικογένειας βρίσκονται σε διαφορετικό κυτταρικό διαμέρισμα από τα αντιαποπτωτικά μέλη. Τα αντιαποπτωτικά μέλη αποτελούν μεμβρανικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), ή την πυρηνική μεμβράνη [337, 351, 352, 451]. Αντιθέτως, το μεγαλύτερο ποσοστό των προαποπτωτικών μελών, πριν από ένα σήμα θανάτου, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στον κυτταροσκελετό [452-454]. Μετά από ένα σήμα θανάτου, τα προαποπτωτικά μέλη, που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα, υφίστανται αλλαγές στη διαμόρφωσή τους που τους επιτρέπουν να στοχεύουν και να ενσωματώνονται σε μεμβράνες, ειδικά στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα αντιαποπτωτικά μέλη δηλαδή της BCL2 οικογένειας λειτουργούν σα «φύλακες της μιτοχονδρακής πύλης» σε αντίθεση με τα προαποπτωτικά, τα οποία προσπαθούν να αποκτήσουν πρόσβαση, μετά από ένα σήμα θανάτου.

Η οικογένεια BCL2 αριθμεί πολλά μέλη, τα οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, διακρίνονται σε προαποπτωτικά (λ.χ. BAX, BID) και αντιαποπτωτικά (λ.χ. BCL2, BCL-X_L) [328]. Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 αποτελούν οι πρωτεΐνες BCL2 [337], BCLX_L (ισομορφή 1 της BCL2L1) [330], BCLW (BCL2L2) [338], BCL-B (BCL2L10, BOO ή DIVA) [339], MCL1 (BCL2L3) [340], και BCL2A1 (BCL2L5 ή BFL1) [341]. Τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2 απαρτίζουν οι πρωτεΐνες BAD

(BCL2L8) [354], BIK (NBK) [355], BID [356], HRK (DP5) [357], BIM (BCL2L11 ή BOD) [358], BMF [359], NOXA (PMAIP1 ή APR) [360], PUMA (BBC3) [361], BNIP1, BNIP2, BNIP3 BAX (BCL2L4) [342], BAK1 (BAK ή BCL2L7) [343], BOK (BCL2L9) [344], και BCLX_S (ισομορφή 2 της BCL2L1) [362]. Το κοινό χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας είναι ότι περιέχουν μία έως τέσσερις εξελικτικά συντηρημένες περιοχές, οι οποίες έχουν μεγάλη δομική ομοιότητα και αρκετά υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες δομικές περιοχές της πρωτεΐνης BCL2, και ονομάζονται BH1 (BCL2-homology region 1), BH2, BH3, και BH4 [329]. Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί 24 μέλη της γονιδιακής οικογένειας *BCL2* [328, 331].

Μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL2, και ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων και/ή μειωμένη έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας, έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο [376]. Η ρύθμιση όμως τόσο των προ- όσο και των αντιαποπτωτικών μελών μπορεί να γίνεται και από άλλους μηγανισμούς, πέρα των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων και/ή αλλαγών στη διαμόρφωσή τους. Μία πρόβλεψη υποστηρίζει ότι τα ενεργά προαποπτωτικά μέλη ρυθμίζονται μεταγραφικά. Προκειμένου να αποφευχθεί η τοξικότητα στα υγιή κύτταρα, θα παραμείνουν μεταγραφικά ανενεργά, αλλά σαν απόκριση σε επιλεγμένα σήματα θανάτου, θα ενεργοποιηθεί η μεταγραφή τους. Στο γενετικό μονοπάτι του Caenorhabditis elegans, εντοπίζονται μεταγραφικοί παράγοντες ανοδικά του EGL-1, υποστηρίζοντας την ιδέα πως το μέλος αυτό της BCL2 οικογένειας υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση [455]. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι στο ενεργό προαποπτωτικό μέλος Hrk, σε απόκριση σήματος θανάτου αυξάνεται η μεταγραφή του [357]. Η μεταγραφική ρύθμιση δεν περιορίζεται μόνο στα προαναφερθέντα μόρια. Η μεταγραφή του γονιδίου ΒΑΧ στον άνθρωπο ρυθμίζεται άμεσα από την πρωτεΐνη p53, γεγονός που ενισχύει τη σύνδεση αυτής της πολύ σημαντικής ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης με αποπτωτικά μονοπάτια [382]. Από άλλες μελέτες προκύπτει ότι και τα αντιαποπτωτικά μέλη BCLX_L [456], MCL1 [457], BCL2A1 [341, 458, 459], BCL2 [460], υπόκεινται σε μεταγραφική ρύθμιση, πάντα ακολουθώντας συγκεκριμένα σήματα θανάτου.

Η υπερέκφραση του BCL2, καθώς και των υπόλοιπων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από πολλά ερεθίσματα, όπως έλλειψη αυξητικού παράγοντα, υποξία και οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, η ικανότητα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας να καταστείλουν τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα, τις καθιστά πιθανούς στόχους στις μελέτες για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων κατά του καρκίνου. Ανεξάρτητα

από τον κύριο τρόπο δράσης του, είτε προκαλώντας θραύσεις στο DNA, ή πολυμερισμό ή συνάθροιση των μικροσωληνίσκων, ενεργοποίηση ορμονικών υποδοχέων (π.χ.υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών) ή αναστολή αυτών (υποδοχείς οιστρογόνων και ανδρογόνων), όλα τα παραδοσιακά αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα, η δράση τους φαίνεται να βασίζεται σε μεγάλο βαθμό από την αναλογία BCL2/Bax, προκειμένου τα καρκινικά κύτταρα να οδηγηθούν σε απόπτωση [461, 462].

Κατά συνέπεια, φαίνεται πως η BCL2 πρωτεΐνη, λειτουργεί σε ένα απομακρυσμένο σημείο στο συντηρημένο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου, το οποίο χρησιμοποιείται από τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα, αποτελώντας μία μορφή εγγενούς ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία, διαφορετική από άλλους εντοπισμένους μηχανισμούς, όπως αποβολή, μεταβολισμό, αδρανοποίηση των φαρμάκων, και άλλων σχετικών μηχανισμών. Αυτή η παρατήρηση προφανώς εξηγεί γιατί η έκφραση μιας ποικιλίας πρωτεϊνών της BCL2 οικογένειας έχει αποδειχθεί να έχει προγνωστική σημασία για πολλούς τύπους καρκίνου και λευχαιμίας, που αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία. [388, 463-470]. Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών BAX και BCLXs ευαισθητοποιεί καρκινικά κύτταρα μαστού στη χημειοθεραπεία [387]. Επιπρόσθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης BCL2 αποτελεί ευμενή προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού, καθώς oι BCL2-θετικές νεοπλασίες παρουσιάζουν ικανοποιητική ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία [399, 400]. Εντούτοις, στις περισσότερες περιπτώσεις η υπερέκφραση του γονιδίου BCL2 σχετίζεται με ανοχή στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία [383]. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα mRNA και/ή πρωτεΐνης που παράγονται από το γονίδιο BCL2 φανερώνουν φτωχή ανταπόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και έχουν δυσμενή προγνωστική αξία για την οξεία μυελοειδή λευχαιμία, καθώς σχετίζονται με υποτροπή της νόσου και βραχεία ολική επιβίωση [391, 392, 401]. Σε πολλούς τύπους καρκίνου έχει δειχτεί ότι τυχόν απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης BCL2 προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από τη δράση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, όπως γλυκοκορτικοειδών, αλκυλιωτικών παραγόντων και αναστολέων της τοποϊσομεράσης ΙΙ [402-404]. Επιπροσθέτως, στο διάχυτου τύπου non-Hodgkin λέμφωμα μεγάλων Bλεμφοκυττάρων η έκφραση των πρωτεϊνών BCL2, BCLX και BAX, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, έχουν συσχετιστεί με ανοχή στη χημειοθεραπεία και σύντομο χρονικό διάστημα επιβίωσης [405, 406]. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα στοχεύουν στην αύξηση της έκφρασης του γονιδίου BAX, προκειμένου να μπλοκάρουν την εξέλιξη του καρκίνου, όπως για παράδειγμα οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες της ομάδας των ανθρακυκλινών [407].

Το γονίδιο *p21* κωδικοποιεί για έναν ισχυρό κυκλινο-εξαρτώμενο αναστολέα κινασών. Η παραγόμενη πρωτεΐνη δεσμεύεται και αναστέλλει τη δραστηριότητα των συμπλεγμάτων κυκλίνη-CDK2 ή κυκλίνη-CDK4, και έτσι λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η έκφραση αυτού του γονιδίου ελέγχεται αυστηρά από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, μέσω της οποίας η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει την p53εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, ως απόκριση σε μια ποικιλία στρεσογόνων ερεθισμάτων [471]. Η p21 έχει βρεθεί ότι υπόκειται σε πέψη από CASP3- like κασπάσες, η οποία πέψη οδηγεί έτσι σε δραματική ενεργοποίηση της CDK2, και μπορεί να αποτελέσει ένα κομβικό σημείο στην εκτέλεση της απόπτωσης, μετά την ενεργοποίηση των κασπασών. Παρότι η πρωτεΐνη p21 μπορεί να αναστείλλει την απόπτωση, δε μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο από μόνη της [472].

Το γονίδιο Survivin είναι μέλος της οικογένειας αναστολέων της απόπτωσης (IAP), που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες αναστέλλουν την ενεργοποίηση των κασπασών, επομένως οδηγούν σε αναστολή του φυσιολογικού κυτταρικού θάνατου. Αυτό έχει αποδειχθεί με σιώπηση του γονιδίου, η οποία οδήγησε σε αύξηση της απόπτωσης και μείωση στην ανάπτυξη των όγκων. Η έκφραση του γονιδίου αυτού είναι υψηλή κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και στους περισσότερους όγκους, ενώ είναι χαμηλή στους φυσιολογικούς ιστούς των ενηλίκων [473]. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι η Survivin θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο στόχο για την θεραπεία του καρκίνου που θα μπορούσε να διακρίνει μεταξύ μετασχηματισμένων και κανονικών κυττάρων.Οι μοριακοί μηχανισμοί της ρύθμισής της δεν είναι ακόμα καλά μελετημένοι, ωστόσο φαίνεται να ελέγχεται από την πρωτεΐνη p53 [474].

Το πεδίο της φαρμακογονιδιωματικής εστιάζει στο χαρακτηρισμό των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στην απόκριση των ασθενών σε φαρμακευτικούς παράγοντες. Μολονότι η φαρμακογενετική και η φαρμακογονιδιωματική είναι όροι ανταλλάξιμοι, γενικά αναφέρεται η φαρμακογενετική σε ένα γονίδιο ή μονοπάτι, ενώ η φαρμακογονιδιωματική αναφέρεται σε πιο ολοκληρωμένες ευρείες μελέτες σε ολόκληρο το γονδίωμα για τον εντοπισμό δεικτών που σχετίζονται με την απόκριση στα φάρμακα. Η απόκριση σε ένα φάρμακο και η τοξικότητα είναι σύνθετα γνωρίσματα, ως εκ τούτου, οι επιπτώσεις είναι πιθανό ότι επηρεάζονται από πολλαπλά γονίδια. Η έρευνα για την γενετική βάση της απόκρισης στα φάρμακα έχει εξελιχθεί από τη μελέτη ενός γονιδίου σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Προκλινικές (μελέτες σε κύτταρα, cell-based models) και κλινικές μελέτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα (genome-wide association studies, GWAS), προσφέρουν στην ογκολογία μια άνευ προηγουμένου ευκαιρία για μια ολοκληρωμένη και αμερόληπτη

εκτίμηση των παραγόντων που σχετίζονται με την απόκριση στη θεραπεία. Η κύρια πρόκληση για την απόπειρα να εντοπιστούν φαρμακογονιδιωματικοί δείκτες από κλινικές μελέτες είναι ότι απαιτούν ομοιογενή πληθυσμό των ασθενών που θεραπεύθηκαν με την ίδια δοσολογία, και ελάχιστες άλλες διαφορετικές μεταβλητές. Συνεπώς, οι προκλινικές μελέτες σε κύτταρα έχουν μεγάλη χρησιμότητα για την ανακάλυψη φαρμακογονιδιωματικών δεικτών, εφόσον ανάλογες μελέτες σε ανθρώπους είναι δύσκολες και δαπανηρές.

Οι περισσότεροι ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία, έχουν μια περίοδο "παρακολούθησης και αναμονής" πριν την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Μερικοί ασθενείς έχουν παρενέργειες που είναι πολύ σοβαρές, ίσως ακόμα και απειλητικές για την ίδια τους τη ζωή, με τη χρήση ενός αναποτελεσματικού χημειοθεραπευτικού σχήματος. Αν οι γιατροί μπορούσαν να προβλέψουν καλύτερα την πιθανότητα τοξικότητας κα/ή μη απόκρισης στη χημειοθεραπεία, θα μπορούσαν να χρησιμοποιούσαν αυτή την πληροφορία για την επιλογή και της κατάλληλης θεραπείας αλλά και δοσολογίας, και η συνολική φροντίδα των ασθενών με καρκίνο θα μπορούσε να βελτιωθεί σημαντικά. Σε αυτή την εποχή της γονιδιωματικής ιατρικής, ιατροί και επαγγελματίες υγείας χρειάζεται να ξέρουν πως να χρησιμοποιήσουν τους γενετικούς βιοδείκτες για την εξατομικευμένη θεραπεία του καρκίνου.

Η κλινική φαρμακευτική ανταπόκριση έχει πολλαπλές όψεις, συμπεριλαμβανομένων των επιπτώσεων στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων και την επιβίωση, την έκταση των ανεπιθύμητων ενεργειών, και τις αλλαγές στην ποιότητα ζωής του ασθενούς. Αυτοί οι "φαινότυποι" απόκρισης είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων που σχετίζονται με τον ασθενή, τον καρκινικό όγκο, και το περιβάλλον. Παρόλο που οι μη γενετικοί παράγοντες όπως η διατροφή, η ηλικία, το φύλο και οι παράλληλες φαρμακευτικές αγωγές μπορούν να επηρεάσουν την ανταπόκριση ενός ασθενούς στη χημειοθεραπεία, η κατανόηση της συμβολής της γενετικής μπορεί να είναι το κλειδί για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών. [475]

Οι πρώτες ανακαλύψεις της φαρμακογενετικής βασίστηκαν σε παρατηρήσεις σε πληθυσμούς ασθενών, και περιορίζονταν σε φαινότυπους στους οποίους η παραλλαγή σε ένα μόνο γονίδιο είχε μεγάλη επίδραση στην ενεργότητα του φαρμάκου. Ωστόσο, αυτή δεν είναι μια πρακτική προσέγγιση για φαρμακογενετική ανάλυση των περισσότερων φαρμάκων, για πολλούς λόγους. Πρώτον, η διακύμανση στην ανταπόκριση στα περισσότερα φάρμακα που χορηγούνται στην κλινική πράξη, εξαρτάται από το συνδυασμό

πολλαπλών γονίδιων με μικρές, ανεξάρτητες επιδράσεις. Ολοκληρωμένες φαρμακογονιδιωματικές μελέτες σχετικά με τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική γονιδίων σχετιζόμενων με την απόκριση στα φάρμακα, τυπικά αποκλείουν τη χρήση των κλινικών δοκιμών ως μέσο για την ανακάλυψη των γονιδίων αυτών, γιατί αυτές οι μελέτες είναι ακριβές, χρονοβόρες και απαιτούν μεγάλους αριθμούς ασθενών αλλά και την κατάλληλη υποδομή για την επίτευξη αξιόπιστων κλινικών φαινοτυπικών δεδομένων. Ένα άλλο πρόβλημα των κλινικών φαρμακογενετικών μελετών αίναι η διάκριση της απόκρισης στο φάρμακο λόγω γενετικής βάσης ή εξαιτίας άλλων παραγόντων, όπως συννοσηρότητες, δοσολογία, χρονοδιάγραμμα και διατροφή. Επιπλέον, φαρμακογενετικές ανακαλύψεις για εξαιρετικά τοξικά φάρμακα, όπως χημειοθεραπευτικά και ορισμένους αντιϊκούς παράγοντες, θέτουν πρόσθετες προκλήσεις που απαιτούν την ανάπτυξη ex vivo μοντέλων. [476]

Αν και οι μελέτες σε κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη φαρμάκων σε προκλινικό στάδιο για χρόνια ως ένα μέσο για την αξιολόγηση της επαγόμενης από το φάρμακο αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων ή απόπτωσης ή για τον προσδιορισμό αλληλεπιδράσεων των ενώσεων-στόχων με τα μεταβολικά ένζυμα και τις πρωτεΐ νες μεταφορείς, η χρήση τους στη φαρμακογενετική είναι σχετικά πρόσφατη. Οι κυτταρικές σειρές είναι εύκολες στο χειρισμό, εφόσον μπορούμε να επιδράσουμε με φαρμακευτική αγωγή και να εξετάσουμε μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων και στην κυτταρικές σειρές διευκολύνουν επίσης την εξέταση των μοριακών και κυτταρικών βιοδεικτών ή ενδιάμεσων φαινοτύπων, και μπορεί να βοηθήσουν στη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του φαρμάκου και/ή στην αιτιολογία διαφόρων κλινικών φαινότυπων υπό μελέτη.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας για την κυτταρική σειρά ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος HT-29, για την οποία κατασκευάστηκαν καμπύλες βιωσιμότητας. Στη συνέχεια, έγινε επίδραση με χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη συστηματική θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου(φθοροουρακίλη, οξαλιπλατίνη), καθώς και με άλλα, ευρέως διαδεδομένα αντικαρκινικά φάρμακα (σισπλατίνη, δοσεταξέλη, γεμσιταβίνη). Ακολούθως, προσδιορίστηκε για κάθε έναν παράγοντα η κατάλληλη συγκέντρωση η οποία οδηγεί σε θάνατο το 50% των κυττάρων (IC₅₀), μέσω του μονοπατιού της απόπτωσης, χωρίς να προκαλεί εκτεταμένα φαινόμενα νέκρωσης. Κατόπιν, μελετήθηκαν οι μεταβολές στο προφίλ

απόπτωση, όπως τα BCL2, BCLX, MCL1, BAX, BAK1, BIM, BID, PUMA (BBC3), NOXA (PMAIP1), BIRC5 (Survivin), και P21 (CDKN1A), προκειμένου να ελέγξουμε αν υπάρχει μεταγραφική ενεργοποίηση σε κάποιο από τα εμπλεκόμενα στην απόπτωση γονίδια και να αποδώσουμε έναν πιθανό ρόλο στο γονίδιο της KLK10. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα αποπτωτικά γονίδια που μελετήθηκαν, εμφανίζουν μεταβολές στην έκφραση τους σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού [477-480], των ωοθηκών [478], και του στομάχου [481], καθώς και σε λευχαιμικά κύτταρα [482-485], κατόπιν επίδρασης σε αυτά με χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Όσο αφορά, όμως, το γονίδιο KLK10, είναι η πρώτη φορά που μελετάται η έκφρασή του σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ως πιθανός δείκτης ανταπόκρισης στη χημειοθεραπευτική αγωγή. Η επιλογή των ευρέως διαδεδομένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων έγινε ως μια προσέγγιση μιας νέας μοριακής μεθόδου πρόβλεψης κατάλληλου συστηματικού θεραπευτικού χειρισμού για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στα πειράματα που ακολούθησαν έγινε συλλογή των κυττάρων στο χρονικό σημείο που άρχισαν να παρατηρούνται φαινόμενα απόπτωσης μέχρι το σημείο εκείνο που το 50% των κυττάρων είχε οδηγηθεί σε θάνατο. Για πρώτη φορά, μετά το τέλος της επίδρασης με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα, ακολούθησε καλλιέργεια των εναπομείνοντων κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό, προκειμένου να αξιολογήσουμε εάν τα κύτταρα συνεχίζουν να αποπίπτουν ή εάν επανέρχονται σε κανονική κυτταρική διαίρεση, όταν απομακρύνεται πλέον το φάρμακο. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά μετά την επίδραση των χημειοθεραπευτικών δοσεταξέλη και σισπλατίνη συνεχίζουν να αποπίπτουν, ακόμα και μετά την απομάκρυνση του παράγοντα. Αντιθέτως, μετά την αφαίρεση των φαρμάκων φθοροουρακίλη, οξαλιπλατίνη και γεμσιταβίνη τα κύτταρα φαίνεται να επανέρχονται σε φυσιολογική κυτταρική διαίρεση. Εφόσον τα φάρμακα δοσεταξέλη και σισπλατίνη δε χρησιμοποιούνται στην καθιερωμένη κλινική πράξη έναντι του ορθοκολικού καρκίνου, ίσως η μελέτη αυτή να οδηγεί σε νέα μονοπάτια για την αντιμετώπιση της νόσου.

Στα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων που μελετήθηκαν μετά την επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές. Συγκεκριμένα, μετά από επίδραση με φθοροουρακίλη, παρατηρήθηκε μικρή μείωση στα επίπεδα έκφρασης mRNA στο γονίδιο *BCL2*, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των άλλων δύο αντιαποπτωτικών μελών της *BCL2* οικογένειας, *BCLX* και *MCL1*. Αντιθέτως, αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης όλων των προαποπτωτικών μελών *Noxa, BAX* και *BAK*, καθώς και των μελών που διαθέτουν μόνο BH3 επιφάνεια, *BIM* και

BID, με εξαίρεση το γονίδιο PUMA, η έκφραση του οποίου δεν έδειξε κάποια μεταβολή. Μετά από επίδραση με γεμσιταβίνη, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης mRNA στο αντιαποπτωτικό γονίδιο BCL2, ενώ παρατηρήθηκε μεταβολή αύξηση των επιπέδν έκφρασης mRNA των BCLX και MCL1. Αύξηση παρατηρήθηκε επίσης στα επίπεδα έκφρασης των προαποπτωτικών μελών Noxa και BAX, ενώ καμία μεταβολή δε φάνηκε να έχει το γονίδιο BAK. Στα μέλη που διαθέτουν μόνο BH3 επιφάνεια, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων οποίου δεν έδειξε κάποια μεταβολή.

Μετά από επίδραση με δοσεταξέλη, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης mRNA στο γονίδιο BCL2, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των άλλων δύο αντιαποπτωτικών μελών της BCL2 οικογένειας, BCLX και MCL1. Αντιθέτως, αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των προαποπτωτικών μελών Noxa, και BAX, ενώ στο γονίδιο BAK δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής του. Αύξηση παρατηρήθηκε και στα μέλη που διαθέτουν μόνο BH3 επιφάνεια, BIM και PUMA, ενώ η έκφραση του γονιδίου BID δεν έδειξε κάποια μεταβολή. Μετά από επίδραση με οξαλιπλατίνη, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης mRNA στο γονίδιο BCL2, αύξηση στα επίπεδα έκφρασης mRNA στο γονίδιο BCLX, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του άλλου αντιαποπτωτικού μέλους, MCL1. Στα αποπτωτικά μέλη, έντονη μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BAX, αύξηση στο γονίδιο Noxa, ενώ στο γονίδιο BAK δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής του. Αύξηση παρατηρήθηκε και στα μέλη που διαθέτουν μόνο BH3 επιφάνεια, BID και PUMA, ενώ η έκφραση του γονιδίου BIM μειώθηκε. Μετά από επίδραση με σισπλατίνη, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα έκφρασης mRNA στο γονίδιο BCL2, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των άλλων δύο αντιαποπτωτικών μελών της BCL2 οικογένειας, BCLX και MCL1. Αντιθέτως, αυξήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των προαποπτωτικών μελών Noxa, και BAK, ενώ στο γονίδιο BAX παρατηρήθηκε έντονη μείωση στα επίπεδα έκφρασής του. Αύξηση παρατηρήθηκε στο γονίδιο PUMA, μείωση στο γονίδιο BIM, ενώ στο άλλο μέλος αυτής της κατηγορίας αντιαποπτωτικών μορίων BID, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στα επίπεδα της έκφρασής του.

Η έκφραση του γονιδίου *p21*, το οποίο λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και του οποίου η πέψη σχετίζεται άμεσα με την απόπτωση και η μεταγραφική του ενεργοποίηση υποδηλώνει αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, βρέθηκε αυξημένη κατά την επεξεργασία με όλα τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Καμία

αξιοσημείωτη μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Survivin, το οποίο όπως αναφέραμε προηγουμένως ανήκει στην οικογένεια αναστολέων της απόπτωσης.

Στο γονίδιο *KLK10* παρατηρήθηκαν οι σημαντικότερες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA με την επεξεργασία του με φθοροουρακίλη και σισπλατίνη, ενώ μικρότερης έκτασης ήταν οι μεταβολές κατά την επεξεργασία του με τα υπόλοιπα φάρμακα. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσίασε και το γεγονός ότι το πρότυπο έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* συνολικά ακολουθούσε το πρότυπο έκφρασης του προαποπτωτικού γονιδίου *NOXA*. Οι μεταβολές των επιπέδων έκφρασης mRNA της *KLK10* παρουσία χημειοθεραπευτικών παραγόντων δείχνει ότι υπάρχει μεταγραφική ενεργοποίηση και ίσως το γονίδιο αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανταπόκρισης στη χημειοθεραπευτική αγωγή.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τα μέλη της οικογένειας BCL2, ανάλογα με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε, άλλων τα επίπεδα έκφρασης αυξήθηκαν, άλλων μειώθηκαν ενώ άλλων παρέμειναν αμετάβλητα. Η μεταγραφική ενεργοποίηση κάποιων μελών σε κάθε επίδραση με κυτταροτοξικό παράγοντα όμως, υποδεικνύει πως, ανάλογα με το ερέθισμα, τα προαποπτωτικά μέλη ξεκινούν το μονοπάτι της απόπτωσης. Ίσως η ύπαρξη των αποπτωτικών μορίων σε ποικίλες θέσεις και η ενεργοποίησή τους μετά από κατάλληλα σήματα θανάτου μπορεί να σημαίνει ότι τα μέλη αυτά μπορεί να χρησιμεύουν ως φρουροί για τον κυτταρικό θάνατο. Η θέση του κάθε μορίου μπορεί να είναι στρατηγικής σημασίας, προκειμένου να εξασφαλιστεί το μονοπάτι της απόπτωσης. Σε ένα τέτοιο προτεινόμενο μοντέλο, η πρωτεῒνη ΒΙΜ θα παρακολουθούσε τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων, η πρωτεῒνη BID θα ήταν σε επιφυλακή για ελάχιστη ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και οι πρωτεῒνες BAX και BAD θα ήταν υπεύθυνες για το μεταβολικό στρες που προκύπτει από απώλεια σημαντικών παραγόντων επιβίωσης. Αυτός θα ήταν ένας ελκυστικός μηχανισμός, με τον οποίο μια πληθώρα φαινομενικά διαφορετικών σημάτων θανάτου, θα μπορούσε να εξασφαλίσει το κοινό αποπτωτικό μονοπάτι. Η ξαφνική έκθεση μιας οποιαδήποτε BH3 επιφάνειας σαν απόκριση στο εκάστοτε σήμα θανάτου, θα επέτρεπε στα κύτταρα να εισέλθουν στο φυσιολογικό μονοπάτι της απόπτωσης αντί αυτού της νέκρωσης. Αυτό θα μπορούσε να αποδώσει έναν ενοποιημένη ρόλο στα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας που διαθέτουν μόνο BH3 επιφάνεια[331]. Και ίσως ένας τέτοιος μηχανισμός να αποδεικνύεται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφορετικών μελών της οικογένειας κατά την επίδραση με διαφορετικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Αξίζει να αναφερθεί τέλος πως τα επίπεδα έκφρασης mRNA του αντιαποπτωτικού γονιδίου BCL2 μειώθηκαν σε κάθε επίδραση με κυτταροτοξικό παράγοντα, το οποίο έρχεται σε συμφωνία

με προηγούμενες μελέτες όπου υπερέκφραση του γονιδίου συνδυαζόταν με ανοχή στη χημειοθεραπεία.

Ένα δεύτερο σημαντικό σημείο που προκύπτει από την παρούσα μελέτη είναι η χρήση των χημειοθεραπευτικών δοσεταξέλη και σισπλατίνη για την καταπολέμηση του καρκίνου του παχεός εντέρου. Απο την εφαρμογή και των δύο παραγόντων, τα κύτταρα συνέχισαν να αποπίπτουν και μετά την αφαίρεσή τους από τη φλάσκα καλλιέργειας. Χρειάζονται πολλές περισσότερες μελέτες, αλλά είναι μια ικανοποιητική ένδειξη πως τα αντινεοπλασματικά αυτά φάρμακα ίσως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη συστημική θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *KLK10*, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐ νης, αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη στον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς σχετίζεται με μικρότερη πιθανότητα ελευθέρας νόσου και ολικής επιβίωσης. Ίσως αυτό να αποτελεί το σημαντικότερο αποτέλεσμα της παρούσας διδακτορική διατριβής. Η μεταγραφική του ενεργοποίηση μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, ίσως του προσδίδει και ένα πιθανό ρόλο ως δείκτη απόκρισης σε χημειοθεραπεία. Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης και η ανακάλυψη των φυσιολογικών υποστρωμάτων του ενζύμου αυτού, θα βοηθήσουν και σε μετέπειτα αξιολόγησή του ως πιθανό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Μελέτη και κλινική αξιολόγηση του γονιδίου NES1 (KLK10) καθώς και των εναλλακτικών μεταγράφων του στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Δήμητρα Αλεξοπούλου

Διδακτορική Διατριβή Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η πιο συχνή κακοήθης πάθηση του πεπτικού συστήματος σε ΗΠΑ και Ευρώπη. Στη χώρα μας, ο καρκίνος του παχέος εντέρου καταλαμβάνει την τέταρτη θέση των αιτιών θανάτου από νεοπλάσματα. Οι κυριότεροι καρκινικοί δείκτες παχέος εντέρου που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη κλινική πράξη είναι το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο CEA (carcinoembryonic antigen), το υδατανθρακικό αντιγόνο CA 19-9 (carbohydrate antigen 19-9), το καρκινικό αντιγόνο CA 72-4 (cancer antigen 72-4) και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου των ιστών PLAT (tissue plasminogen activator). Έχουν αναγνωριστεί αρκετοί προγνωστικοί δείκτες και δείκτες πρόβλεψης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αν και πολύ λίγοι από αυτούς χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη.

Η οικογένεια γονιδίων των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεϊνών είναι η μεγαλύτερη συνεχόμενη γονιδιακά οικογένεια πρωτεασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, χωρίς παρέμβαση από άλλα γονίδια. Αποτελεί σημαντικό τομέα μελέτης, καθώς ένα από τα μέλη της, το PSA/KLK3, είναι ο πλέον αποδεκτός και ευρέως χρησιμοποιημένος καρκινικός δείκτης, μέχρι σήμερα. Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, μελέτες έχουν υποδείξει άλλα μέλη της οικογένειας ως πιθανούς δείκτες πρόγνωσης ή/και πρόβλεψης, συμπεριλαμβανομένων των *KLK4* και *KLK7*, σε επίπεδο mRNA, καθώς και KLK5, KLK7 και KLK11,σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Το γονίδιο της *KLK10* είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των ιστικών καλλικρεϊνών. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να αξιολογηθεί ο πιθανός ρόλος της KLK10 ως καρκινικός δείκτης. Λόγω των υψηλότερων επιπέδων της στους καρκινικούς ιστούς και στον ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, η KLK10 έχει

προταθεί ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο των ωοθηκών, σε συνδυασμό με τον ήδη χρησιμοποιούμενο δείκτη CA125, για αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, έγινε μελέτη της έκφρασης και κλινική αξιολόγηση του γονιδίου *KLK10* για πιθανή εφαρμογή του ως νέο προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αναπτύχθηκαν αναλυτικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* στον καρκίνο του παχέος εντέρου, βασιζόμενα στην αντίστροφη μεταγραφή (RT), στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και στη μεθοδολογία ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR). Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης KLK10, πραγματοποιήθηκε με ανοσοδοκιμασία ELISA. Δεν υπάρχουν και δεν χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα kit για τους παραπάνω προσδιορισμούς αλλά πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας των τεχνικών που αναπτύχθηκαν ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των προσδιορισμών. Συλλέχθηκε ένα στατιστικά σημαντικό μέγεθος καρκινικών και μη καρκινικών ιστών παχέος εντέρου (194 ιστολογικά δείγματα) από ασθενείς με πλήρες κλινικό ιστορικό. Για την ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε εκτενής βιοστατιστική ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές μεθοδολογίες, ανάλυση ROC, ανάλυση Kaplan Meier, καθώς και ανάλυση μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής Cox παλινδρόμησης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK10* σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων της σταδιοποίησης κατά Dukes (*P*=0,036), του βαθμού αποδιαφοροποίησης (*P*=0,025), της μετάστασης στους λεμφαδένες (*P*=0,046) και της μετάστασης σε απομακρυσμένα όργανα (*P*=0,027). Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier έδειξε στατιστικώς σημαντικά μικρότερες πιθανότητες ελεύθερης νόσου (DFS) και ολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών με θετική έκφραση mRNA του γονιδίου της *KLK10* (*P*=0,014 και *P*=0,020, αντίστοιχα). Η έκφραση της πρωτεΐνης KLK10 ήταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (*P*<0,001) υψηλότερη στα καρκινικά δείγματα απ'ότι στα φυσιολογικά. Συμπερασματικά, στους καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου της *KLK10*. Η υπερέκφραση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και μπορεί να συνιστά ένα χρήσιμο νέο μοριακό δείκτη.

Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου ώστε να διαπιστωθεί ενάν το γονίδιο *KLK10* εμπλέκεται στην ανταπόκριση των ασθενών σε κυτταροστατικά φάρμακα, γεγονός που θα εξηγούσε αρκετά από τα παραπάνω

συμπεράσματα. Πιο συγκεκριμένα, έγινε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος ΗΤ-29, για την οποία κατασκευάστηκαν καμπύλες βιωσιμότητας. Στη συνέχεια, έγινε επίδραση με χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη συστηματική θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου(φθοροουρακίλη, οξαλιπλατίνη), καθώς και με άλλα, ευρέως διαδεδομένα αντικαρκινικά φάρμακα (σισπλατίνη, δοσεταξέλη, γεμσιταβίνη). Για πρώτη φορά, μετά το τέλος της επίδρασης με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα, ακολούθησε καλλιέργεια των εναπομείνοντων κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό, προκειμένου να αξιολογήσουμε εάν τα κύτταρα συνεχίζουν να αποπίπτουν ή εάν επανέρχονται σε κανονική κυτταρική διαίρεση, όταν απομακρύνεται πλέον το φάρμακο. Κατόπιν, μελετήθηκαν οι μεταβολές στο προφίλ έκφρασης mRNA του γονιδίου KLK10 καθώς και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση: BCL2, BCLX, MCL1, BAX, BAK1, BIM, BID, PUMA (BBC3), NOXA (PMAIP1), BIRC5 (Survivin), και P21 (CDKN1A).

Στο γονίδιο *KLK10* παρατηρήθηκαν οι σημαντικότερες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA με την επεξεργασία του με φθοροουρακίλη και σισπλατίνη, ενώ μικρότερης έκτασης ήταν οι μεταβολές κατά την επεξεργασία του με τα υπόλοιπα φάρμακα. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσίασε και το γεγονός ότι το πρότυπο έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK10* συνολικά ακολουθούσε το πρότυπο έκφρασης του προ-αποπτωτικού γονιδίου *NOXA*.

Όσον αφορά τα μέλη της οικογένειας BCL2, ανάλογα με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στο πρότυπο έκφρασής τους. Η μεταγραφική ενεργοποίηση κάποιων μελών σε κάθε επίδραση με κυτταροτοξικό παράγοντα όμως, υποδεικνύει πως, ανάλογα με το ερέθισμα, τα προαποπτωτικά μέλη ξεκινούν το μονοπάτι της απόπτωσης. Η θέση του κάθε μορίου μπορεί να είναι στρατηγικής σημασίας, προκειμένου να εξασφαλιστεί το μονοπάτι της απόπτωσης. Αυτό θα μπορούσε να αποδώσει έναν ενοποιημένο ρόλο στα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας που διαθέτουν μόνο BH3 περιοχή. Και ίσως ένας τέτοιος μηχανισμός να αποδεικνύεται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφορετικών μελών της οικογένειας κατά την επίδραση με διαφορετικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Αξίζει να αναφερθεί, τέλος, πως τα επίπεδα έκφρασης mRNA του αντιαποπτωτικού γονιδίου *BCL2* μειώθηκαν σε κάθε επίδραση με κυτταροτοξικό παράγοντα, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου υπερέκφραση του γονιδίου συνδυαζόταν με ανοχή στη χημειοθεραπεία.

Ένα δεύτερο σημαντικό σημείο που προκύπτει από την παρούσα μελέτη είναι η χρήση των χημειοθεραπευτικών δοσεταξέλη και σισπλατίνη για την καταπολέμηση του καρκίνου του παχεός εντέρου. Απο την εφαρμογή και των δύο παραγόντων, τα κύτταρα συνέχισαν να αποπίπτουν και μετά την αφαίρεσή τους από τη φλάσκα καλλιέργειας.

Εν κατακλείδι, η έκφραση του γονιδίου *KLK10*, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐ νης, αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη στον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς σχετίζεται με μικρότερη πιθανότητα ελευθέρας νόσου και ολικής επιβίωσης, το οποίο και αποτελεί το σημαντικότερο αποτέλεσμα της παρούσας διατριβής. Η μεταγραφική του ενεργοποίηση μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, του προσδίδει και ένα πιθανό ρόλο ως δείκτη απόκρισης σε χημειοθεραπεία. Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης και η ανακάλυψη των φυσιολογικών υποστρωμάτων του ενζύμου αυτού, θα βοηθήσουν και σε μετέπειτα αξιολόγησή του ως πιθανό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Study and clinical evaluation of the *NES1* (*KLK10*) gene as well as its alternative splice variants in colon cancer

Dimitra Alexopoulou

Ph.D Thesis

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens

ABSTRACT

Colon cancer is the most frequent malignant disease of the digestive system in USA and Europe. In our country, colon cancer ranked fourth among causes of death from neoplasms. The biomarkers used in modern clinical practice are the Carcinoembryonic Antigen (CEA), the Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9), the 72-4 Cancer Antigen (CA 72-4) and the Tissue plasminogen activator (PLAT). Although several prognostic and predictive markers for colon cancer have been recognized, very few of them are currently used in clinical practice.

The human tissue kallikrein gene family is the largest contiguous gene family of proteases in the human genome, with no intervention from other genes. It is a very attractive field of study, as one of its members, the famous PSA/KLK3, is the most accepted and widely used cancer biomarker, until today. Studies have suggested other family members as potential biomarkers for prognosis or/and prediction of colon cancer, including *KLK4* and *KLK7*, at mRNA level, and KLK4, KLK7 and KLK11, at protein level.

KLK10 gene is a new member of the kallikrein tissue family. Several studies have been conducted to assess the potential role of KLK10 as a tumor marker. Due to its higher levels in tumor tissues and serum of patients with ovarian cancer, KLK10 has been proposed as diagnostic and prognostic marker for ovarian cancer, in combination with the already used marker CA125, for increased diagnostic sensitivity.

In this thesis, we performed clinical evaluation of the *KLK10* gene for its possible application as a new prognostic marker for colorectal cancer. The mRNA expression study was performed with conventional RT-PCR and quantitative PCR methodology in real-time (real-time PCR), and the protein was detected and measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Analytical protocols were developed to determine the

mRNA expression of KLK10 gene in colorectal cancer based on reverse transcription (RT), polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR (real-time PCR) methodology. Detection and quantification of protein KLK10 performed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). There weren't any ready kit to be used for the abovementioned experiments, all the assays were developed in our lab, so we also performed quality control in order to ensure the reliability of the results. We collected a statistically significant size from cancerous and non- cancerous colon tissue samples (194 tissues), from patients with complete clinical history. For the analysis of data, an extensive biostatistical analysis was performed. We used parametric and nonparametric methodologies, ROC analysis, Kaplan-Meier survival analysis, as well as univariate and multivariate Cox regression analysis.

The results obtained showed that the mRNA expression of the *KLK10* gene is statistically associated with several clinicopathological parameters, including Duke's Stage (P=0.036), Grade (P=0.025), lymph nodes status (P=0.046) and distant organs metastasis (P=0.027). The Kaplan Meier survival analysis showed statistically significantly shorter possibility of disease-free (DFS) and overall survival (OS) of patients with positive *KLK10* mRNA expression (P=0.014 and P=0.020, respectively). The expression of KLK10 protein was statistically significant higher in tumor samples than in normal counterparts (P<0.001). In conclusion, the cancerous colon tissues examined showed a higher expression of *KLK10* gene. The over-expression of this appears to be associated with poor prognosis in patients with colon cancer and may constitute a useful novel molecular biomarker.

We then cultured colorectal adenocarcinoma cell line HT-29, for which we constructed viability curves, followed by treatment with chemotherapy drugs used in systematic treatment of colon cancer (fluorouracil, oxaliplatin), as well as with other widely used cancer drugs (taxotere, cisplatin, gemcitabine). For the first time, after the treament with the administered agent, we removed the agent and we continued the cell culture, in order to evaluate whether the cells continue to die or if they revert to normal cell division, when the drug is removed. Then, we evaluated the mRNA expression profiles of *KLK10* gene, as well as other genes involved in apoptosis: *BCL2*, *BCLX*, *MCL1*, *BAX*, *BAK1*, *BIM*, *BID*, *PUMA* (*BBC3*), *NOXA* (*PMAIP1*), *BIRC5* (*Survivin*), and *P21* (*CDKN1A*).

KLK10 mRNA expression levels were elevated, after the treatment with fluorouracil and cisplatin, while smaller scale changes were observed with the treatment with other drugs. Finally, what was very interesting, was the fact that *KLK10* mRNA pattern of expression followed the mRNA pattern of expression of the proapoptotic *NOXA* gene.

Regarding the BCL2 family members, depending on the chemotherapeutic agent used, other members expression levels increased, while others decreased and others remained the same. The transcriptional activation of some members in each treatment with cytotoxic agent, however, suggests that, depending on the stimulus, the proapoptotic members begin their path to apoptosis. The position of each molecule may be of strategic importance in order to ensure the pathway of apoptosis. This could reveal a unified role in proapoptotic BH3-only family members. Perhaps such a mechanism is established by the transcriptional activation of different members of the family, during the treatment with different chemotherapeutic agents. It is worth noting, finally, that the mRNA expression of the antiapoptotic *BCL2* gene was downregulated in the presence of all the abovementioned cytotoxic agents, which is in agreement with previous studies where overexpression of the gene was combined with tolerance to chemotherapy. A second important point that emerges from this study, is the use of taxotere and cisplatin in colon cancer chemotherapy. From treatment with both agents, the cells continued to die, even after their removal from the flask.

Finally, the expression of the *KLK10* gene, at both mRNA and protein level, has features of an unfavorable prognostic marker for colon cancer, as it is associated with shorter disease free and overall survival, and this is the most important result of this thesis. Its transcriptional activation after treatment with chemotherapeutic agents, perhaps assigns it a possible role as a biomarker for response to chemotherapy. The understanding of regulation mechanisms and the discovery of the physiological substrate of this enzyme, will lead to its evaluation as a potential target for colon cancer treatment.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Widmaier EP, Raff H, Strang KT: Vander, Sherman, Luciano's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function: McGraw-Hill; 2003.
- Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA: ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000, 321(7265):886-889.
- 3. Bocker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie, 2nd edn: Urban & Fischer; 2001.
- 4. Boyle P, Langman JS: ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000, 321(7264):805-808.
- 5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013, 63(1):11-30.
- 6. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013, 49(6):1374-1403.
- 7. Fragoulakis V, Papagiannopoulou V, Kourlaba G, Maniadakis N, Fountzilas G: Costminimization analysis of the treatment of patients with metastatic colorectal cancer in Greece. *Clinical therapeutics* 2012, 34(10):2132-2142.
- 8. Rubin L: Essential Pathology, 5th edn: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- 9. Saclarides TJ, Szeluga D, Staren ED: Neuroendocrine cancers of the colon and rectum. Results of a ten-year experience. *Dis Colon Rectum* 1994, 37(7):635-642.
- 10. Fujita R, Jass JR, Kaminishi M, Schlemper RJ: Early Cancer of the Gastrointestinal Tract: Endoscopy, Pathology, and Treatment: Springer; 2006.
- 11. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci E: Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* 2011, 60(3):397-411.
- 12. Hamilton SR, Aaltonen LA: Pathology and genetics. Tumours of the digestive system. Lyon: IARC *Press*; 2000.
- 13. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T: Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 2008, 7(1):27-39.
- 14. Lynch HT, de la Chapelle A: Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003, 348(10):919-932.
- Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomaki P, De La Chapelle A, Mecklin JP: Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000, 118(5):829-834.
- 16. de la Chapelle A: Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(10):769-780.
- 17. Peltomaki P, Vasen H: Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 2004, 20(4-5):269-276.
- 18. Plaschke J, Engel C, Kruger S, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Mangold E, Moeslein G, Schulmann K, Gebert J, von Knebel Doeberitz M *et al*: Lower incidence

of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Clin Oncol* 2004, 22(22):4486-4494.

- 19. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM *et al*: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994, 371(6492):75-80.
- 20. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991, 34(5):424-425.
- 21. Vasen HF, Wijnen J: Clinical implications of genetic testing of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cytogenet Cell Genet* 1999, 86(2):136-139.
- 22. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R *et al*: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(4):261-268.
- 23. Bussey HJ: Familial polyposis coli. Pathol Annu 1979, 14 Pt 1:61-81.
- 24. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D *et al*: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991, 253(5020):661-665.
- 25. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M *et al*: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991, 66(3):589-600.
- 26. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, Niebuhr E, Mohr J: Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994, 3(2):121-125.
- 27. Bulow S, Alm T, Fausa O, Hultcrantz R, Jarvinen H, Vasen H: Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. DAF Project Group. *Int J Colorectal Dis* 1995, 10(1):43-46.
- 28. Arvanitis ML, Jagelman DG, Fazio VW, Lavery IC, McGannon E: Mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1990, 33(8):639-642.
- 29. Bertario L, Russo A, Sala P, Eboli M, Giarola M, D'Amico F, Gismondi V, Varesco L, Pierotti MA, Radice P: Genotype and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis. *Int J Cancer* 2001, 95(2):102-107.
- 30. Cetta F, Montalto G, Gori M, Curia MC, Cama A, Olschwang S: Germline mutations of the APC gene in patients with familial adenomatous polyposis-associated thyroid carcinoma: results from a European cooperative study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(1):286-292.
- 31. Bulow C, Bulow S: Is screening for thyroid carcinoma indicated in familial adenomatous polyposis? The Leeds Castle Polyposis Group. *Int J Colorectal Dis* 1997, 12(4):240-242.

- 32. Giardiello FM, Petersen GM, Brensinger JD, Luce MC, Cayouette MC, Bacon J, Booker SV, Hamilton SR: Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1996, 39(6):867-869.
- 33. Attard TM, Giglio P, Koppula S, Snyder C, Lynch HT: Brain tumors in individuals with familial adenomatous polyposis: a cancer registry experience and pooled case report analysis. *Cancer* 2007, 109(4):761-766.
- 34. Galiatsatos P, Foulkes WD: Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2006, 101(2):385-398.
- 35. Nieuwenhuis MH, Vasen HF: Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007, 61(2):153-161.
- 36. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y: Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992, 52(14):4055-4057.
- 37. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000, 18(9):1967-1979.
- 38. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B *et al*: Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993, 75(5):951-957.
- 39. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P *et al*: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987, 328(6131):614-616.
- 40. Thliveris A, Albertsen H, Tuohy T, Carlson M, Groden J, Joslyn G, Gelbert L, Samowitz W, Spirio L, White R: Long-range physical map and deletion characterization of the 1100-kb NotI restriction fragment harboring the APC gene. *Genomics* 1996, 34(2):268-270.
- 41. Beroud C, Soussi T: APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996, 24(1):121-124.
- 42. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y: Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992, 1(4):229-233.
- 43. Sulekova Z, Reina-Sanchez J, Ballhausen WG: Multiple APC messenger RNA isoforms encoding exon 15 short open reading frames are expressed in the context of a novel exon 10A-derived sequence. *Int J Cancer* 1995, 63(3):435-441.
- 44. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR *et al*: Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002, 30(2):227-232.
- 45. Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP: MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 2005, 33(Pt 4):679-683.
- 46. Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N, Vogt S, Tops CM, Vasen HF, Sampson JR, Aretz S, Hes FJ: Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 2009, 136(2):471-476.

- 47. Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M *et al*: Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004, 109(5):680-684.
- 48. Jeghers H, Mc KV, Katz KH: Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N Engl J Med* 1949, 241(26):1031-1036.
- 49. McGarrity TJ, Kulin HE, Zaino RJ: Peutz-Jeghers syndrome. Am J Gastroenterol 2000, 95(3):596-604.
- 50. Utsunomiya J, Gocho H, Miyanaga T, Hamaguchi E, Kashimure A: Peutz-Jeghers syndrome: its natural course and management. *Johns Hopkins Med J* 1975, 136(2):71-82.
- 51. Fulcheri E, Baracchini P, Pagani A, Lapertosa G, Bussolati G: Significance of the smooth muscle cell component in Peutz-Jeghers and juvenile polyps. *Hum Pathol* 1991, 22(11):1136-1140.
- 52. Hemminki A: The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome. *Cell Mol Life Sci* 1999, 55(5):735-750.
- Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA: Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000, 119(6):1447-1453.
- 54. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W *et al*: Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* 2006, 12(10):3209-3215.
- 55. Hemminki A, Tomlinson I, Markie D, Jarvinen H, Sistonen P, Bjorkqvist AM, Knuutila S, Salovaara R, Bodmer W, Shibata D *et al*: Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat Genet* 1997, 15(1):87-90.
- 56. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P *et al*: A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998, 391(6663):184-187.
- 57. Rowan A, Churchman M, Jefferey R, Hanby A, Poulsom R, Tomlinson I: In situ analysis of LKB1/STK11 mRNA expression in human normal tissues and tumours. *J Pathol* 2000, 192(2):203-206.
- 58. Kufe DW, Bast RC, Jr., Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, 3rd: Cancer Medicine 7, 7th edn: B C Decker Inc; 2006.
- 59. Michelassi F, Mishlove LA, Stipa F, Block GE: Squamous-cell carcinoma of the colon. Experience at the University of Chicago, review of the literature, report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1988, 31(3):228-235.
- 60. Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Brawley OW: Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2010, 60(2):99-119.
- 61. Devesa JM, Morales V, Enriquez JM, Nuno J, Camunas J, Hernandez MJ, Avila C: Colorectal cancer. The bases for a comprehensive follow-up. *Dis Colon Rectum* 1988, 31(8):636-652.

- 62. Diaz-Cano SJ: General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology* 2008, 53(1):1-19.
- 63. Jass JR: Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control. *Surg Oncol* 2007, 16 Suppl 1:S7-9.
- 64. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998, 396(6712):643-649.
- 65. Trautmann K, Terdiman JP, French AJ, Roydasgupta R, Sein N, Kakar S, Fridlyand J, Snijders AM, Albertson DG, Thibodeau SN *et al*: Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12(21):6379-6385.
- 66. Rusan NM, Peifer M: Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J Cell Biol* 2008, 181(5):719-726.
- 67. Loeb LA: Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991, 51(12):3075-3079.
- 68. Imai K, Yamamoto H: Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008, 29(4):673-680.
- 69. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD *et al*: Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(15):8698-8702.
- 70. Haydon AM, Jass JR: Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol* 2002, 3(2):83-88.
- 71. Compton CC, Greene FL: The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004, 54(6):295-308.
- 72. Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathological Bacteriology* 1932, 35:323.
- 73. Astler VB, Coller FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954, 139(6):846-852.
- 74. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA: Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 2002, 51(1):65-69.
- 75. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edn. New York: John Wiley & Sons; 2009.
- Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM: Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 1986, 57(9):1866-1870.
- 77. Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS, Marcus PM: Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 1992, 84(20):1572-1575.
- 78. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP, Jr., Weiss NS: A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992, 326(10):653-657.

- 79. Prandi M, Lionetto R, Bini A, Francioni G, Accarpio G, Anfossi A, Ballario E, Becchi G, Bonilauri S, Carobbi A *et al*: Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial. *Ann Surg* 2002, 235(4):458-463.
- 80. Suresh MR: Classification of tumor markers. Anticancer Res 1996, 16(4B):2273-2277.
- 81. Johnson PJ, Lo YM: Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002, 48(8):1186-1193.
- 82. Magdelenat H: Tumour markers in oncology: past, present and future. *J Immunol Methods* 1992, 150(1-2):133-143.
- 83. Pokorny RM, Hunt L, Galandiuk S: What's new with tumor markers for colorectal cancer? *Dig Surg* 2000, 17(3):209-215.
- 84. Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK: Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications: AACC Press; 2002.
- Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H: Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 1999, 45(10):1695-1707.
- 86. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C: CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002, 22(4):2311-2316.
- 87. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C: CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumour Biol* 2004, 25(5-6):228-234.
- 88. Plemenos MF, Dimas C, Kotsios A, Gennatas K, Pafiti AK: Prognostic significance of the immunohistochemical localization and serological detection of CA19-9 tumor antigen in colon carcinoma. *J BUON* 2004, 9(1):73-76.
- 89. Raigoso P, Junco A, Andicoechea A, Gonzalez A, Garcia-Muniz JL, Allende MT, Garcia-Moran M, Vizoso F: Tissue-type plasminogen activator (tPA) content in colorectal cancer and in surrounding mucosa: relationship with clinicopathologic parameters and prognostic significance. *Int J Biol Markers* 2000, 15(1):44-50.
- 90. Amayo AA, Kuria JG: Clinical application of tumour markers: a review. *East African medical journal* 2009, 86(12 Suppl):S76-83.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003, 39(6):718-727.
- 92. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001, 19(6):1865-1878.
- 93. Sturgeon C: Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002, 48(8):1151-1159.
- 94. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C: Estimating the probability of cancer with several tumor markers in patients with colorectal disease. *Oncology* 2004, 66(4):296-302.

- 95. Gravalos C, Garcia-Escobar I, Garcia-Alfonso P, Cassinello J, Malon D, Carrato A: Adjuvant chemotherapy for stages II, III and IV of colon cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2009, 11(8):526-533.
- 96. Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS: Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet* 1986, 2(8514):996-999.
- 97. Wibe A, Rendedal PR, Svensson E, Norstein J, Eide TJ, Myrvold HE, Soreide O: Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. *The British journal of surgery* 2002, 89(3):327-334.
- 98. Heald RJ, Ryall RD: Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986, 1(8496):1479-1482.
- 99. Pahlman L: Neoadjuvant and adjuvant radio- and radio-chemotherapy of rectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2000, 15(1):1-8.
- 100. Beets-Tan RG, Beets GL: Rectal cancer: review with emphasis on MR imaging. *Radiology* 2004, 232(2):335-346.
- 101. Labianca R, Beretta GD, Mosconi S, Milesi L, Pessi MA: Colorectal cancer: screening. *Ann Oncol* 2005, 16 Suppl 2:ii127-132.
- 102. Leake R: The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Ann N Y Acad Sci* 1996, 784:252-262.
- 103. McDonald ER, 3rd, El-Deiry WS: Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int J Oncol* 2000, 16(5):871-886.
- 104. Wilkes GM: Pocket Guide to Colorectal Cancer: Drugs and Treatment, 2nd edn: Jones and Bartlett Publishers; 2008.
- 105. Skeel RT: Handbook of Cancer Chemotherapy, 7th edn: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- 106. Jarmula A: Antifolate inhibitors of thymidylate synthase as anticancer drugs. *Mini* reviews in medicinal chemistry 2010, 10(13):1211-1222.
- 107. Klubes P, Cerna I, Meldon MA: Effect of concurrent calcium leucovorin infusion on 5-fluorouracil cytotoxicity against murine L1210 leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1981, 6(2):121-125.
- 108. Wang X, Li M, Wang J, Yeung CM, Zhang H, Kung HF, Jiang B, Lin MC: The BH3only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *Biochemical pharmacology* 2006, 71(11):1540-1550.
- 109. Cerqueira NM, Fernandes PA, Ramos MJ: Understanding ribonucleotide reductase inactivation by gemcitabine. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2007, 13(30):8507-8515.
- 110. Hussain A, Brahmbhatt K, Priyani A, Ahmed M, Rizvi TA, Sharma C: Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 2011, 26(5):519-527.

- 111. Clarke SJ, Rivory LP: Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet* 1999, 36(2):99-114.
- 112. Berchem GJ, Bosseler M, Mine N, Avalosse B: Nanomolar range docetaxel treatment sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy induced apoptosis, induces G2M arrest and phosphorylates bcl-2. *Anticancer Res* 1999, 19(1A):535-540.
- 113. Escobar PF, Rose PG: Docetaxel in ovarian cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005, 6(15):2719-2726.
- 114. Pienta KJ: Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. *Semin Oncol* 2001, 28(4 Suppl 15):3-7.
- 115. Einhorn LH: Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol* 1990, 8(11):1777-1781.
- 116. Kraut H, Frey EK, Werle E: Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. *Hoppeseylers Z Physiol Chem* 1930, 189:97–106.
- 117. Werle E, Gotze W, Keppler A: Über die Wirkung des Kallikreins aus dem isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem J* 1937, 289:217– 233.
- 118. Clements JA: Current perspectives on the molecular biology of the renal tissue kallikrein gene and the related tissue kallikrein gene family. *Biological research* 1998, 31(3):151-159.
- 119. Riegman PH, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CB, Trapman J: Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics* 1992, 14(1):6-11.
- 120. Anisowicz A, Sotiropoulou G, Stenman G, Mok SC, Sager R: A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol Med* 1996, 2(5):624-636.
- 121. Liu XL, Wazer DE, Watanabe K, Band V: Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. *Cancer Res* 1996, 56(14):3371-3379.
- 122. Ullah MF, Aatif M: The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Cancer Treat Rev* 2009, 35(3):193-200.
- 123. Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP: Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2004, 2(5):257-280.
- 124. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T: A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2005, 124(1):198-203.
- 125. Yamasaki K, Schauber J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL: Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* 2006, 20(12):2068-2080.
- 126. Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Yamakoshi F, Simmer JP: How do enamelysin and kallikrein 4 process the 32-kDa enamelin? *Eur J Oral Sci* 2006, 114 Suppl 1:45-51; discussion 93-45, 379-380.
- 127. Bando Y, Ito S, Nagai Y, Terayama R, Kishibe M, Jiang YP, Mitrovic B, Takahashi T, Yoshida S: Implications of protease M/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination. *Neurosci Lett* 2006, 405(3):175-180.

- 128. Obiezu CV, Diamandis EP: Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett* 2005, 224(1):1-22.
- 129. Bernett MJ, Blaber SI, Scarisbrick IA, Dhanarajan P, Thompson SM, Blaber M: Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 2002, 277(27):24562-24570.
- 130. Laxmikanthan G, Blaber SI, Bernett MJ, Scarisbrick IA, Juliano MA, Blaber M: 1.70 A X-ray structure of human apo kallikrein 1: structural changes upon peptide inhibitor/substrate binding. *Proteins* 2005, 58(4):802-814.
- 131. Tan OL, Whitbread AK, Clements JA, Dong Y: Kallikrein-related peptidase (KLK) family mRNA variants and protein isoforms in hormone-related cancers: do they have a function? *Biol Chem* 2006, 387(6):697-705.
- 132. Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T: Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 1994, 269(30):19420-19426.
- 133. Brattsand M, Egelrud T: Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. J Biol Chem 1999, 274(42):30033-30040.
- 134. Denmeade SR, Lovgren J, Khan SR, Lilja H, Isaacs JT: Activation of latent protease function of pro-hK2, but not pro-PSA, involves autoprocessing. *Prostate* 2001, 48(2):122-126.
- 135. Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K: Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 2001, 40(50):15341-15348.
- 136. Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW, Johnson M, Dobbins JR, Wyrick T, Miller JR, MacKellar W *et al*: Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 1997, 272(40):25135-25142.
- 137. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett AT, Abrahamsson PA, Lilja H: Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* 1993, 150(1):100-105.
- 138. Christensson A, Lilja H: Complex formation between protein C inhibitor and prostatespecific antigen in vitro and in human semen. *Eur J Biochem* 1994, 220(1):45-53.
- 139. Stephan C, Jung K, Lein M, Sinha P, Schnorr D, Loening SA: Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9(11):1133-1147.
- 140. Amour A, Bird M, Chaudry L, Deadman J, Hayes D, Kay C: General considerations for proteolytic cascades. *Biochem Soc Trans* 2004, 32(Pt 1):15-16.
- 141. Yoon H, Laxmikanthan G, Lee J, Blaber SI, Rodriguez A, Kogot JM, Scarisbrick IA, Blaber M: Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 2007, 282(44):31852-31864.

- 142. Michael IP, Pampalakis G, Mikolajczyk SD, Malm J, Sotiropoulou G, Diamandis EP: Human tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression. *J Biol Chem* 2006, 281(18):12743-12750.
- 143. Deperthes D: Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity. *Biol Chem* 2002, 383(7-8):1107-1112.
- 144. Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA, Craik CS: Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(14):7754-7759.
- 145. Luo LY, Shan SJ, Elliott MB, Soosaipillai A, Diamandis EP: Purification and characterization of human kallikrein 11, a candidate prostate and ovarian cancer biomarker, from seminal plasma. *Clin Cancer Res* 2006, 12(3 Pt 1):742-750.
- 146. Debela M, Magdolen V, Schechter N, Valachova M, Lottspeich F, Craik CS, Choe Y, Bode W, Goettig P: Specificity profiling of seven human tissue kallikreins reveals individual subsite preferences. *J Biol Chem* 2006, 281(35):25678-25688.
- 147. Campbell DJ: The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001, 28(12):1060-1065.
- 148. Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Vergnolle N, Tea I, Diamandis EP, Hollenberg MD: Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. *Biol Chem* 2006, 387(6):677-685.
- 149. Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV: The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2000, 11(2):54-60.
- 150. Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paeper B, Wang K: Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 2000, 257(1):119-130.
- 151. Yousef GM, Diamandis EP: The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001, 22(2):184-204.
- 152. Yousef GM, Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP: Cloning of a kallikrein pseudogene. *Clin Biochem* 2004, 37(11):961-967.
- 153. Riegman PH, Vlietstra RJ, Klaassen P, van der Korput JA, Geurts van Kessel A, Romijn JC, Trapman J: The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein-1 gene are tandemly located on chromosome 19. *FEBS Lett* 1989, 247(1):123-126.
- 154. Richards RI, Holman K, Shen Y, Kozman H, Harley H, Brook D, Shaw D: Human glandular Kallikrein genes: genetic and physical mapping of the KLK1 locus using a highly polymorphic microsatellite PCR marker. *Genomics* 1991, 11(1):77-82.
- 155. 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, 276(1):53-61.
- 156. Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA: Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem* 2000, 275(48):37397-37406.

- 157. Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ *et al*: A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol Chem* 2006, 387(6):637-641.
- 158. Lundwall A, Brattsand M: Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(13):2019-2038.
- 159. Evans BA, Yun ZX, Close JA, Tregear GW, Kitamura N, Nakanishi S, Callen DF, Baker E, Hyland VJ, Sutherland GR *et al*: Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene. *Biochemistry* 1988, 27(9):3124-3129.
- 160. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K: Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992, 44(1):1-80.
- 161. Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP: Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett* 2007, 249(1):61-79.
- 162. Stephan C, Jung K, Nakamura T, Yousef GM, Kristiansen G, Diamandis EP: Serum human glandular kallikrein 2 (hK2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer. *Int J Urol* 2006, 13(3):238-243.
- 163. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergstrom R, Signorello LB, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D: Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90(12):911-915.
- 164. Steuber T, Vickers AJ, Serio AM, Vaisanen V, Haese A, Pettersson K, Eastham JA, Scardino PT, Huland H, Lilja H: Comparison of free and total forms of serum human kallikrein 2 and prostate-specific antigen for prediction of locally advanced and recurrent prostate cancer. *Clin Chem* 2007, 53(2):233-240.
- 165. Ulmert D, O'Brien MF, Bjartell AS, Lilja H: Prostate kallikrein markers in diagnosis, risk stratification and prognosis. *Nat Rev Urol* 2009, 6(7):384-391.
- 166. Raaijmakers R, de Vries SH, Blijenberg BG, Wildhagen MF, Postma R, Bangma CH, Darte C, Schroder FH: hK2 and free PSA, a prognostic combination in predicting minimal prostate cancer in screen-detected men within the PSA range 4-10 ng/ml. *Eur Urol* 2007, 52(5):1358-1364.
- 167. 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, 103(4):441-445.
- 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, 176(6 Pt 1):2383-2385.
- 169. Cramer SD, Chen Z, Peehl DM: Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol* 1996, 156(2 Pt 1):526-531.
- 170. Borgono CA, Diamandis EP: The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(11):876-890.
- 171. Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJ, Levesque MA, Roagna R, Ponzone R, Sismondi P: Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res* 1995, 55(10):2104-2110.
- 172. Kucera E, Kainz C, Tempfer C, Zeillinger R, Koelbl H, Sliutz G: Prostate specific antigen (PSA) in breast and ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997, 17(6D):4735-4737.

- 173. Day CH, Fanger GR, Retter MW, Hylander BL, Penetrante RB, Houghton RL, Zhang X, McNeill PD, Filho AM, Nolasco M *et al*: Characterization of KLK4 expression and detection of KLK4-specific antibody in prostate cancer patient sera. *Oncogene* 2002, 21(46):7114-7120.
- 174. Klokk TI, Kilander A, Xi Z, Waehre H, Risberg B, Danielsen HE, Saatcioglu F: Kallikrein 4 is a proliferative factor that is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 2007, 67(11):5221-5230.
- 175. Xi Z, Klokk TI, Korkmaz K, Kurys P, Elbi C, Risberg B, Danielsen H, Loda M, Saatcioglu F: Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 2004, 64(7):2365-2370.
- 176. Veveris-Lowe TL, Lawrence MG, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, Clements JA: Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2005, 12(3):631-643.
- 177. Gao J, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, Clements JA: Kallikrein 4 is a potential mediator of cellular interactions between cancer cells and osteoblasts in metastatic prostate cancer. *Prostate* 2007, 67(4):348-360.
- 178. Matsumura M, Bhatt AS, Andress D, Clegg N, Takayama TK, Craik CS, Nelson PS: Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *Prostate* 2005, 62(1):1-13.
- 179. Wang W, Mize GJ, Zhang X, Takayama TK: Kallikrein-related peptidase-4 initiates tumor-stroma interactions in prostate cancer through protease-activated receptor-1. *Int J Cancer* 2010, 126(3):599-610.
- 180. Avgeris M, Stravodimos K, Scorilas A: Kallikrein-related peptidase 4 gene (KLK4) in prostate tumors: quantitative expression analysis and evaluation of its clinical significance. *Prostate* 2011, 71(16):1780-1789.
- 181. Kontos CK, Chantzis D, Papadopoulos IN, Scorilas A: KLK4 mRNA expression in colon cancer: A novel biomarker with significant prognostic value. In: 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases: 2011; Rhodes, Greece; 2011.
- 182. Papachristopoulou G, Avgeris M, Scorilas A: Expression analysis and study of KLK4 in benign and malignant breast tumours. *Thromb Haemost* 2009, 101(2):381-387.
- 183. Obiezu CV, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, Rigault de la Longrais IA, Arisio R, Diamandis EP: Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001, 7(8):2380-2386.
- 184. Michael IP, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Magklara A, Ghosh M, Wasney G, Diamandis EP: Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression. *J Biol Chem* 2005, 280(15):14628-14635.
- 185. Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, Rendl L, Diamandis M, Ponzone R, Biglia N, Giai M, Roagna R, Sismondi P *et al*: Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin Chem* 2002, 48(8):1241-1250.

- 186. Li X, Liu J, Wang Y, Zhang L, Ning L, Feng Y: Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Sci* 2009, 100(4):601-607.
- 187. Kim H, Scorilas A, Katsaros D, Yousef GM, Massobrio M, Fracchioli S, Piccinno R, Gordini G, Diamandis EP: Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001, 84(5):643-650.
- 188. Dong Y, Kaushal A, Brattsand M, Nicklin J, Clements JA: Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clin Cancer Res* 2003, 9(5):1710-1720.
- 189. Diamandis EP, Borgono CA, Scorilas A, Yousef GM, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M: Immunofluorometric quantification of human kallikrein 5 expression in ovarian cancer cytosols and its association with unfavorable patient prognosis. *Tumour Biol* 2003, 24(6):299-309.
- 190. Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J: Association of KLK5 overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Sci* 2007, 98(7):1078-1086.
- 191. Oikonomopoulou K, Li L, Zheng Y, Simon I, Wolfert RL, Valik D, Nekulova M, Simickova M, Frgala T, Diamandis EP: Prediction of ovarian cancer prognosis and response to chemotherapy by a serum-based multiparametric biomarker panel. Br J Cancer 2008, 99(7):1103-1113.
- 192. Korbakis D, Gregorakis AK, Scorilas A: Quantitative analysis of human kallikrein 5 (KLK5) expression in prostate needle biopsies: an independent cancer biomarker. *Clin Chem* 2009, 55(5):904-913.
- 193. Yousef GM, Scorilas A, Chang A, Rendl L, Diamandis M, Jung K, Diamandis EP: Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues. *Prostate* 2002, 51(2):126-132.
- 194. Yousef GM, Obiezu CV, Jung K, Stephan C, Scorilas A, Diamandis EP: Differential expression of Kallikrein gene 5 in cancerous and normal testicular tissues. *Urology* 2002, 60(4):714-718.
- 195. Talieri M, Li L, Zheng Y, Alexopoulou DK, Soosaipillai A, Scorilas A, Xynopoulos D, Diamandis EP: The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009, 100(10):1659-1665.
- 196. Tanimoto H, Underwood LJ, Shigemasa K, Parmley TH, O'Brien TJ: Increased expression of protease M in ovarian tumors. *Tumour Biol* 2001, 22(1):11-18.
- 197. Kountourakis P, Psyrri A, Scorilas A, Camp R, Markakis S, Kowalski D, Diamandis EP, Dimopoulos MA: Prognostic value of kallikrein-related peptidase 6 protein expression levels in advanced ovarian cancer evaluated by automated quantitative analysis (AQUA). *Cancer Sci* 2008, 99(11):2224-2229.
- 198. 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, 101(7):1107-1113.
- 199. Diamandis EP, Scorilas A, Fracchioli S, Van Gramberen M, De Bruijn H, Henrik A, Soosaipillai A, Grass L, Yousef GM, Stenman UH *et al*: Human kallikrein 6 (hK6): a new potential serum biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2003, 21(6):1035-1043.

- 200. Hoffman BR, Katsaros D, Scorilas A, Diamandis P, Fracchioli S, Rigault de la Longrais IA, Colgan T, Puopolo M, Giardina G, Massobrio M *et al*: Immunofluorometric quantitation and histochemical localisation of kallikrein 6 protein in ovarian cancer tissue: a new independent unfavourable prognostic biomarker. *Br J Cancer* 2002, 87(7):763-771.
- 201. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, Murayama S, Mori M: Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11(8):2889-2893.
- 202. Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M: Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11(19 Pt 1):6800-6806.
- 203. Henkhaus RS, Gerner EW, Ignatenko NA: Kallikrein 6 is a mediator of K-RASdependent migration of colon carcinoma cells. *Biol Chem* 2008, 389(6):757-764.
- 204. Nathalie HV, Chris P, Serge G, Catherine C, Benjamin B, Claire B, Christelle P, Briollais L, Pascale R, Marie-Lise J *et al*: High kallikrein-related peptidase 6 in non-small cell lung cancer cells: an indicator of tumour proliferation and poor prognosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009, 13(9B):4014-4022.
- 205. Santin AD, Diamandis EP, Bellone S, Soosaipillai A, Cane S, Palmieri M, Burnett A, Roman JJ, Pecorelli S: Human kallikrein 6: a new potential serum biomarker for uterine serous papillary cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11(9):3320-3325.
- 206. Ruckert F, Hennig M, Petraki CD, Wehrum D, Distler M, Denz A, Schroder M, Dawelbait G, Kalthoff H, Saeger HD *et al*: Co-expression of KLK6 and KLK10 as prognostic factors for survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2008, 99(9):1484-1492.
- 207. Petraki CD, Gregorakis AK, Vaslamatzis MM, Papanastasiou PA, Yousef GM, Levesque MA, Diamandis EP: Prognostic implications of the immunohistochemical expression of human kallikreins 5, 6, 10 and 11 in renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2006, 27(1):1-7.
- 208. Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, Nukina N: Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet* 2003, 12(20):2625-2635.
- 209. Diamandis EP, Yousef GM, Petraki C, Soosaipillai AR: Human kallikrein 6 as a biomarker of alzheimer's disease. *Clin Biochem* 2000, 33(8):663-667.
- 210. Klucky B, Mueller R, Vogt I, Teurich S, Hartenstein B, Breuhahn K, Flechtenmacher C, Angel P, Hess J: Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer Res* 2007, 67(17):8198-8206.
- 211. Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioti T, Vlahou A, Zoumpourlis V, Sotiropoulou G: A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2009, 69(9):3779-3787.
- 212. Lundstrom A, Egelrud T: Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta Derm Venereol* 1991, 71(6):471-474.
- 213. Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Soosaipillai A, Diamandis EP: The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new
member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene* 2000, 254(1-2):119-128.

- 214. Talieri M, Diamandis EP, Gourgiotis D, Mathioudaki K, Scorilas A: Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost* 2004, 91(1):180-186.
- 215. Holzscheiter L, Biermann JC, Kotzsch M, Prezas P, Farthmann J, Baretton G, Luther T, Tjan-Heijnen VC, Talieri M, Schmitt M *et al*: Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full-length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of KLK7 mRNA expression in breast cancer. *Clin Chem* 2006, 52(6):1070-1079.
- 216. Kyriakopoulou LG, Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Fracchioli S, Diamandis EP: Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin Biochem* 2003, 36(2):135-143.
- 217. Prezas P, Scorilas A, Yfanti C, Viktorov P, Agnanti N, Diamandis E, Talieri M: The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem* 2006, 387(12):1607-1612.
- 218. Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS: Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer* 2007, 109(9):1811-1820.
- 219. Santin AD, Cane S, Bellone S, Bignotti E, Palmieri M, De Las Casas LE, Roman JJ, Anfossi S, O'Brien T, Pecorelli S: The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2004, 94(2):283-288.
- 220. Talieri M, Mathioudaki K, Prezas P, Alexopoulou DK, Diamandis EP, Xynopoulos D, Ardavanis A, Arnogiannaki N, Scorilas A: Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2009, 101(4):741-747.
- 221. Suzuki J, Yoshida S, Chen ZL, Momota Y, Kato K, Hirata A, Shiosaka S: Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci Res* 1995, 23(4):345-351.
- 222. Yoshida S, Taniguchi M, Hirata A, Shiosaka S: Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. *Gene* 1998, 213(1-2):9-16.
- 223. Magklara A, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, Danese S, Diamandis EP: The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7(4):806-811.
- 224. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Tanimoto H, Underwood LJ, O'Brien TJ, Ohama K: Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004, 11(6):1153-1159.
- 225. Sher YP, Chou CC, Chou RH, Wu HM, Wayne Chang WS, Chen CH, Yang PC, Wu CW, Yu CL, Peck K: Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. *Cancer Res* 2006, 66(24):11763-11770.
- 226. Yousef GM, Diamandis EP: The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member, KLK-L3 (KLK9). *Genomics* 2000, 65(2):184-194.

- 227. Shaw JL, Diamandis EP: Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 2007, 53(8):1423-1432.
- 228. Yousef GM, Scorilas A, Nakamura T, Ellatif MA, Ponzone R, Biglia N, Maggiorotto F, Roagna R, Sismondi P, Diamandis EP: The prognostic value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 78(2):149-158.
- 229. Yousef GM, Kyriakopoulou LG, Scorilas A, Fracchioli S, Ghiringhello B, Zarghooni M, Chang A, Diamandis M, Giardina G, Hartwick WJ *et al*: Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: a new independent and favorable prognostic marker. *Cancer Res* 2001, 61(21):7811-7818.
- 230. Dhar S, Bhargava R, Yunes M, Li B, Goyal J, Naber SP, Wazer DE, Band V: Analysis of normal epithelial cell specific-1 (NES1)/kallikrein 10 mRNA expression by in situ hybridization, a novel marker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7(11):3393-3398.
- 231. Yunes MJ, Neuschatz AC, Bornstein LE, Naber SP, Band V, Wazer DE: Loss of expression of the putative tumor suppressor NES1 gene in biopsy-proven ductal carcinoma in situ predicts for invasive carcinoma at definitive surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 56(3):653-657.
- 232. Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, Wazer DE, Band V: CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res* 2001, 61(21):8014-8021.
- 233. Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulias V, Lianidou ES: Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Ann Oncol* 2009, 20(6):1020-1025.
- 234. Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Piccinno R, Rigault de la Longrais IA, Howarth DJ, Diamandis EP: Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001, 7(8):2372-2379.
- 235. Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Bellino R, van Gramberen M, de Bruijn H, Henrik A, Stenman UH, Massobrio M *et al*: The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res* 2003, 63(4):807-811.
- 236. Bharaj BB, Luo LY, Jung K, Stephan C, Diamandis EP: Identification of single nucleotide polymorphisms in the human kallikrein 10 (KLK10) gene and their association with prostate, breast, testicular, and ovarian cancers. *Prostate* 2002, 51(1):35-41.
- 237. Luo LY, Rajpert-De Meyts ER, Jung K, Diamandis EP: Expression of the normal epithelial cell-specific 1 (NES1; KLK10) candidate tumour suppressor gene in normal and malignant testicular tissue. *Br J Cancer* 2001, 85(2):220-224.
- 238. Feng B, Xu WB, Zheng MH, Ma JJ, Cai Q, Zhang Y, Ji J, Lu AG, Qu Y, Li JW *et al*: Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2006, 21(10):1596-1603.
- 239. Yousef GM, Scorilas A, Diamandis EP: Genomic organization, mapping, tissue expression, and hormonal regulation of trypsin-like serine protease (TLSP PRSS20), a new member of the human kallikrein gene family. *Genomics* 2000, 63(1):88-96.

- 240. Shigemasa K, Gu L, Tanimoto H, O'Brien TJ, Ohama K: Human kallikrein gene 11 (KLK11) mRNA overexpression is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(8):2766-2770.
- 241. Borgono CA, Fracchioli S, Yousef GM, Rigault de la Longrais IA, Luo LY, Soosaipillai A, Puopolo M, Grass L, Scorilas A, Diamandis EP *et al*: Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2003, 106(4):605-610.
- 242. Nakamura T, Stephan C, Scorilas A, Yousef GM, Jung K, Diamandis EP: Quantitative analysis of hippostasin/KLK11 gene expression in cancerous and noncancerous prostatic tissues. *Urology* 2003, 61(5):1042-1046.
- 243. Yousef GM, Magklara A, Diamandis EP: KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family-differential expression in breast cancer. *Genomics* 2000, 69(3):331-341.
- 244. Planque C, Li L, Zheng Y, Soosaipillai A, Reckamp K, Chia D, Diamandis EP, Goodglick L: A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008, 14(5):1355-1362.
- 245. 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, 275(16):11891-11898.
- 246. Sotiropoulou G, Rogakos V, Tsetsenis T, Pampalakis G, Zafiropoulos N, Simillides G, Yiotakis A, Diamandis EP: Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer. *Oncol Res* 2003, 13(6-10):381-391.
- 247. Zheng Y, Katsaros D, Shan SJ, de la Longrais IR, Porpiglia M, Scorilas A, Kim NW, Wolfert RL, Simon I, Li L *et al*: A multiparametric panel for ovarian cancer diagnosis, prognosis, and response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007, 13(23):6984-6992.
- 248. Kapadia C, Ghosh MC, Grass L, Diamandis EP: Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 323(3):1084-1090.
- 249. 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, 389(6):781-786.
- 250. Borgono CA, Michael IP, Shaw JL, Luo LY, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP: Expression and functional characterization of the cancerrelated serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem* 2007, 282(4):2405-2422.
- 251. Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, Egelrud T: Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J Invest Dermatol* 2008, 128(1):18-25.
- 252. Yousef GM, Borgono CA, Scorilas A, Ponzone R, Biglia N, Iskander L, Polymeris ME, Roagna R, Sismondi P, Diamandis EP: Quantitative analysis of human kallikrein gene 14 expression in breast tumours indicates association with poor prognosis. *Br J Cancer* 2002, 87(11):1287-1293.

- 253. Yousef GM, Stephan C, Scorilas A, Ellatif MA, Jung K, Kristiansen G, Jung M, Polymeris ME, Diamandis EP: Differential expression of the human kallikrein gene 14 (KLK14) in normal and cancerous prostatic tissues. *Prostate* 2003, 56(4):287-292.
- 254. Yousef GM, Fracchioli S, Scorilas A, Borgono CA, Iskander L, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP, Katsaros D: Steroid hormone regulation and prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer. *Am J Clin Pathol* 2003, 119(3):346-355.
- 255. Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Bharaj BS, Nakamura T, Loening SA *et al*: Quantitative analysis of kallikrein 15 gene expression in prostate tissue. *J Urol* 2003, 169(1):361-364.
- 256. 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, 40(6):1679-1687.
- 257. 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, 21(16):3119-3126.
- 258. Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Memari N, Ponzone 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, 87(11):1294-1300.
- 259. 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, 1755(1):1-14.
- 260. Michael IP, Kurlender L, Memari N, Yousef GM, Du D, Grass L, Stephan C, Jung K, Diamandis EP: Intron retention: a common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem* 2005, 51(3):506-515.
- 261. Dong Y, Bui LT, Odorico DM, Tan OL, Myers SA, Samaratunga H, Gardiner RA, Clements JA: Compartmentalized expression of kallikrein 4 (KLK4/hK4) isoforms in prostate cancer: nuclear, cytoplasmic and secreted forms. *Endocr Relat Cancer* 2005, 12(4):875-889.
- 262. Heuze N, Olayat S, Gutman N, Zani ML, Courty Y: Molecular cloning and expression of an alternative hKLK3 transcript coding for a variant protein of prostate-specific antigen. *Cancer Res* 1999, 59(12):2820-2824.
- 263. Paliouras M, Diamandis EP: Coordinated steroid hormone-dependent and independent expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2007, 102(1):7-18.
- 264. Pampalakis G, Sotiropoulou G: Multiple mechanisms underlie the aberrant expression of the human kallikrein 6 gene in breast cancer. *Biol Chem* 2006, 387(6):773-782.
- 265. Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J: Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 1996, 271(11):6379-6388.
- 266. Schuur ER, Henderson GA, Kmetec LA, Miller JD, Lamparski HG, Henderson DR: Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J Biol Chem* 1996, 271(12):7043-7051.

- 267. Oettgen P, Finger E, Sun Z, Akbarali Y, Thamrongsak U, Boltax J, Grall F, Dube A, Weiss A, Brown L *et al*: PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* 2000, 275(2):1216-1225.
- 268. Wang C, Yeung F, Liu PC, Attar RM, Geng J, Chung LW, Gottardis M, Kao C: Identification of a novel transcription factor, GAGATA-binding protein, involved in androgen-mediated expression of prostate-specific antigen. *J Biol Chem* 2003, 278(34):32423-32430.
- 269. Luo LY, Grass L, Diamandis EP: Steroid hormone regulation of the human kallikrein 10 (KLK10) gene in cancer cell lines and functional characterization of the KLK10 gene promoter. *Clin Chim Acta* 2003, 337(1-2):115-126.
- 270. Luo L, Herbrick JA, Scherer SW, Beatty B, Squire J, Diamandis EP: Structural characterization and mapping of the normal epithelial cell-specific 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247(3):580-586.
- 271. Palmer HG, Sanchez-Carbayo M, Ordonez-Moran P, Larriba MJ, Cordon-Cardo C, Munoz A: Genetic signatures of differentiation induced by 1alpha,25dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003, 63(22):7799-7806.
- 272. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A: The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004, 18(2):362-365.
- 273. Sidiropoulos M, Pampalakis G, Sotiropoulou G, Katsaros D, Diamandis EP: Downregulation of human kallikrein 10 (KLK10/NES1) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. *Tumour Biol* 2005, 26(6):324-336.
- 274. Huang W, Zhong J, Wu LY, Yu LF, Tian XL, Zhang YF, Li B: Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer. *Cancer Lett* 2007, 251(1):78-85.
- 275. Lundwall A, Clauss A, Olsson AY: Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biol Chem* 2006, 387(3):243-249.
- 276. Clements J, Hooper J, Dong Y, Harvey T: The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol Chem* 2001, 382(1):5-14.
- 277. Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinas R, Hood L, Wang K: Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(6):3114-3119.
- 278. Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis EP, Kruger A, Magdolen V: Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 2006, 387(6):807-811.
- 279. Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL: Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38(3):333-357.

- 280. Giusti B, Serrati S, Margheri F, Papucci L, Rossi L, Poggi F, Magi A, Del Rosso A, Cinelli M, Guiducci S *et al*: The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2005, 52(11):3618-3628.
- 281. Whitbread AK, Veveris-Lowe TL, Lawrence MG, Nicol DL, Clements JA: The role of kallikrein-related peptidases in prostate cancer: potential involvement in an epithelial to mesenchymal transition. *Biol Chem* 2006, 387(6):707-714.
- 282. Dallas SL, Zhao S, Cramer SD, Chen Z, Peehl DM, Bonewald LF: Preferential production of latent transforming growth factor beta-2 by primary prostatic epithelial cells and its activation by prostate-specific antigen. *J Cell Physiol* 2005, 202(2):361-370.
- 283. Goya M, Ishii G, Miyamoto S, Hasebe T, Nagai K, Yonou H, Hatano T, Ogawa Y, Ochiai A: Prostate-specific antigen induces apoptosis of osteoclast precursors: potential role in osteoblastic bone metastases of prostate cancer. *Prostate* 2006, 66(15):1573-1584.
- 284. Komatsu N, Suga Y, Saijoh K, Liu AC, Khan S, Mizuno Y, Ikeda S, Wu HK, Jayakumar A, Clayman GL *et al*: Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes. *J Invest Dermatol* 2006, 126(10):2338-2342.
- 285. Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Ohka R, Amano O, Takehara K, Saijoh K: Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J Invest Dermatol* 2002, 118(3):436-443.
- 286. Egelrud T, Brattsand M, Kreutzmann P, Walden M, Vitzithum K, Marx UC, Forssmann WG, Magert HJ: hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br J Dermatol* 2005, 153(6):1200-1203.
- 287. Descargues P, Deraison C, Bonnart C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Elias P, Barrandon Y, Zambruno G, Sonnenberg A *et al*: Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet* 2005, 37(1):56-65.
- 288. Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP: Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta* 2003, 329(1-2):1-8.
- 289. Diamandis EP, Scorilas A, Kishi T, Blennow K, Luo LY, Soosaipillai A, Rademaker AW, Sjogren M: Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Clin Biochem* 2004, 37(3):230-237.
- 290. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP: Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2008, 54(12):1951-1960.
- 291. Cloutier SM, Kundig C, Felber LM, Fattah OM, Chagas JR, Gygi CM, Jichlinski P, Leisinger HJ, Deperthes D: Development of recombinant inhibitors specific to human kallikrein 2 using phage-display selected substrates. *Eur J Biochem* 2004, 271(3):607-613.
- 292. Felber LM, Kundig C, Borgono CA, Chagas JR, Tasinato A, Jichlinski P, Gygi CM, Leisinger HJ, Diamandis EP, Deperthes D *et al*: Mutant recombinant serpins as highly specific inhibitors of human kallikrein 14. *FEBS J* 2006, 273(11):2505-2514.

- 293. Johnson KL, Vaillant F, Lawen A: Protein tyrosine kinase inhibitors prevent didemnin B-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett* 1996, 383(1-2):1-5.
- 294. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994, 73(8):2013-2026.
- 295. Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC: The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997, 25(1):82-88.
- 296. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26(4):239-257.
- 297. Jacobson MD, Weil M, Raff MC: Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997, 88(3):347-354.
- 298. Melino G: The Sirens' song. Nature 2001, 412(6842):23.
- 299. Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001, 411(6835):342-348.
- 300. Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer. J Clin Oncol 1999, 17(9):2941-2953.
- 301. Reed JC: Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 2000, 157(5):1415-1430.
- 302. Reed JC: Apoptosis-based therapies. Nat Rev Drug Discov 2002, 1(2):111-121.
- 303. Reed JC: Apoptosis-targeted therapies for cancer. Cancer Cell 2003, 3(1):17-22.
- 304. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996, 87(2):171.
- 305. Cryns V, Yuan J: Proteases to die for. Genes Dev 1998, 12(11):1551-1570.
- 306. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998, 281(5381):1312-1316.
- 307. Salvesen GS, Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997, 91(4):443-446.
- 308. Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Janicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R, Marti A: Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 2000, 60(16):4386-4390.
- 309. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ: Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000, 6(5):529-535.
- 310. Takita J, Yang HW, Chen YY, Hanada R, Yamamoto K, Teitz T, Kidd V, Hayashi Y: Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene* 2001, 20(32):4424-4432.
- 311. Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M: Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999, 59(12):2995-3002.
- 312. Motyka B, Korbutt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF *et al*: Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000, 103(3):491-500.

- 313. Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, Fitzgerald P, Tan EM, Bokoch GM, Greenberg AH *et al*: The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J* 1996, 15(10):2407-2416.
- 314. Quan LT, Caputo A, Bleackley RC, Pickup DJ, Salvesen GS: Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J Biol Chem* 1995, 270(18):10377-10379.
- 315. Zhou Q, Krebs JF, Snipas SJ, Price A, Alnemri ES, Tomaselli KJ, Salvesen GS: Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 1998, 37(30):10757-10765.
- 316. Sun J, Ooms L, Bird CH, Sutton VR, Trapani JA, Bird PI: A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). J Biol Chem 1997, 272(24):15434-15441.
- 317. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104(4):487-501.
- 318. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP: Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999, 17:331-367.
- 319. Yuan J: Transducing signals of life and death. Curr Opin Cell Biol 1997, 9(2):247-251.
- 320. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281(5381):1309-1312.
- 321. Reed JC: Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* 1997, 91(5):559-562.
- 322. Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, Shore GC: p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1997, 139(2):327-338.
- 323. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999, 274(2):1156-1163.
- 324. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998, 94(4):491-501.
- 325. Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC: BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(6):2597-2602.
- 326. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(6):2239-2244.
- 327. Kroemer G, Reed JC: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000, 6(5):513-519.
- 328. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281(5381):1322-1326.

- 329. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW: Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1644(2-3):83-94.
- 330. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993, 74(4):597-608.
- 331. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999, 13(15):1899-1911.
- 332. Korsmeyer SJ: BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999, 59(7 Suppl):1693s-1700s.
- 333. Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J, Wagner G: Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 1999, 96(5):615-624.
- 334. Schendel SL, Montal M, Reed JC: Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* 1998, 5(5):372-380.
- 335. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D: Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 1999, 96(5):625-634.
- 336. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL *et al*: X-ray and NMR structure of human BclxL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996, 381(6580):335-341.
- 337. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990, 348(6299):334-336.
- 338. Gibson L, Holmgreen SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S: bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 1996, 13(4):665-675.
- 339. Ke N, Godzik A, Reed JC: Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 2001, 276(16):12481-12484.
- 340. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW: Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997, 89(2):630-643.
- 341. Lin EY, Orlofsky A, Berger MS, Prystowsky MB: Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 1993, 151(4):1979-1988.
- 342. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993, 74(4):609-619.
- 343. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC: Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995, 374(6524):733-736.
- 344. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ: Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(23):12401-12406.

- 345. Minn AJ, Boise LH, Thompson CB: Bcl-x(S) anatagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J Biol Chem* 1996, 271(11):6306-6312.
- 346. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ: Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(21):11357-11362.
- 347. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(10):5113-5118.
- 348. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G *et al*: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997, 277(5324):370-372.
- 349. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB: Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997, 385(6614):353-357.
- 350. Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC: Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 1999, 274(31):21932-21936.
- 351. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC: Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993, 53(19):4701-4714.
- 352. de Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB, Kluin PM: Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 1994, 54(1):256-260.
- 353. Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballestero R, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB, Nunez G: bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* 1994, 120(10):3033-3042.
- 354. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995, 80(2):285-291.
- 355. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ *et al*: Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 1995, 11(9):1921-1928.
- 356. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ: BID: a novel BH3 domainonly death agonist. *Genes Dev* 1996, 10(22):2859-2869.
- 357. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G: harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 1997, 16(7):1686-1694.
- 358. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC: Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998, 17(2):384-395.

- 359. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A: Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001, 293(5536):1829-1832.
- 360. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000, 288(5468):1053-1058.
- 361. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001, 7(3):673-682.
- 362. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G: Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 1994, 79(2):341-351.
- 363. Aouacheria A, Brunet F, Gouy M: Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 2005, 22(12):2395-2416.
- 364. Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ: Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999, 18(9):2330-2341.
- 365. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S: Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003, 112(4):481-490.
- 366. Martinou JC, Youle RJ: Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 2006, 13(8):1291-1295.
- 367. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 2006, 13(8):1396-1402.
- 368. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P *et al*: Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007, 315(5813):856-859.
- 369. Kelekar A, Thompson CB: Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998, 8(8):324-330.
- 370. Huang DC, Strasser A: BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000, 103(6):839-842.
- 371. Youle RJ: Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science* 2007, 315(5813):776-777.
- 372. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC: Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999, 144(5):891-901.
- 373. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD: Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002, 111(3):331-342.
- 374. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH: Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000, 7(12):1166-1173.

- 375. Youle RJ, Strasser A: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9(1):47-59.
- 376. Reed JC: Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 1996(97):72-100.
- 377. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985, 228(4706):1440-1443.
- 378. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987, 317(19):1185-1189.
- 379. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime-Sempe C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M: BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996, 60(1):23-32.
- 380. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997, 275(5302):967-969.
- 381. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T: Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997, 385(6617):637-640.
- 382. Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995, 80(2):293-299.
- 383. Thomadaki H, Scorilas A: BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006, 43(1):1-67.
- 384. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Vallot F, Verdebout JM *et al*: Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2003, 89(1):55-64.
- 385. Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F, Bevilacqua G: Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in nonsmall-cell lung cancer. Br J Cancer 1995, 71(5):1003-1007.
- 386. Laudanski J, Chyczewski L, Niklinska WE, Kretowska M, Furman M, Sawicki B, Niklinski J: Expression of bcl-2 protein in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathology and patient survival. *Neoplasma* 1999, 46(1):25-30.
- 387. Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA: Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999, 4(2):153-164.
- 388. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC: Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1996, 56(10):2422-2427.
- 389. Tsuji M, Murakami Y, Kanayama H, Sano T, Kagawa S: Immunohistochemical analysis of Ki-67 antigen and Bcl-2 protein expression in prostate cancer: effect of neoadjuvant hormonal therapy. *Br J Urol* 1998, 81(1):116-121.
- 390. Flohil CC, Janssen PA, Bosman FT: Expression of Bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon. *J Pathol* 1996, 178(4):393-397.

- 391. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D: High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993, 81(11):3091-3096.
- 392. Karakas T, Maurer U, Weidmann E, Miething CC, Hoelzer D, Bergmann L: High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol* 1998, 9(2):159-165.
- 393. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH, McNinch L, Evans WE, Raimondi SC, Behm FG, Arico M, Campana D: Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996, 87(3):1140-1146.
- 394. Sun SY, Yue P, Zhou JY, Wang Y, Choi Kim HR, Lotan R, Wu GS: Overexpression of BCL2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 280(3):788-797.
- 395. Reed JC: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994, 124(1-2):1-6.
- 396. Reed JC: Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer. *J Clin Invest* 1996, 97(11):2403-2404.
- 397. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, Bommert K, Wagener C, Kallinich B, Royer HD, Dorken B: Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer* 1995, 60(6):854-859.
- 398. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC: Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995, 55(19):4471-4478.
- 399. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Willsher P, McClelland RA, Hoyle HB, Kyme SR, Finlay P, Blamey RW, Nicholson RI: Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994, 59(5):619-628.
- 400. Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K: Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995, 177(1):49-55.
- 401. Tothova E, Fricova M, Stecova N, Kafkova A, Elbertova A: High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma* 2002, 49(3):141-144.
- 402. Miyashita T, Reed JC: bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992, 52(19):5407-5411.
- 403. Miyashita T, Reed JC: Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993, 81(1):151-157.
- 404. Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, Tanizawa A, Pommier Y, Cossman J: bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 1993, 53(18):4251-4256.

- 405. Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E: Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 1999, 5(10):2860-2866.
- 406. Reed JC, Kitada S, Takayama S, Miyashita T: Regulation of chemoresistance by the bcl-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Ann Oncol* 1994, 5 Suppl 1:61-65.
- 407. Lu Y, Yagi T: Apoptosis of human tumor cells by chemotherapeutic anthracyclines is enhanced by Bax overexpression. *J Radiat Res (Tokyo)* 1999, 40(3):263-272.
- 408. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65(1-2):55-63.
- 409. Ruben RL: Advances in Cell Culture, vol. 6. New York: Academic; 1988.
- 410. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162(1):156-159.
- 411. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239(4839):487-491.
- 412. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L *et al*: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 2006, 27(2-3):95-125.
- 413. Schmittgen TD, Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008, 3(6):1101-1108.
- 414. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL: X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. *Clin Cancer Res* 2004, 10(21):7252-7259.
- 415. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M: Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86(11):829-835.
- 416. Cox DR: Regression models and life tables. R Stat Soc B 1972, 34:187-202.
- 417. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric observation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958, 53:457-481.
- 418. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology* 1978, 31(6):507-520.
- 419. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
- 420. Luo LY, Grass L, Howarth DJ, Thibault P, Ong H, Diamandis EP: Immunofluorometric assay of human kallikrein 10 and its identification in biological fluids and tissues. *Clin Chem* 2001, 47(2):237-246.
- 421. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76(9):4350-4354.
- 422. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227(5259):680-685.

- 423. Kyhse-Andersen J: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984, 10(3-4):203-209.
- 424. Batteiger B, Newhall WJt, Jones RB: The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Methods* 1982, 55(3):297-307.
- 425. 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, 25(4):402-408.
- 426. Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005, 23(3):609-618.
- 427. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R *et al*: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(10):1626-1634.
- 428. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S *et al*: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008, 359(17):1757-1765.
- 429. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR: Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med 1994, 331(4):213-221.
- 430. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr.: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24(33):5313-5327.
- 431. Giaginis C, Giagini A, Theocharis S: Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1): a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of human neoplasia. *Histology and histopathology* 2009, 24(6):761-776.
- 432. Tsourouflis G, Theocharis SE, Sampani A, Giagini A, Kostakis A, Kouraklis G: Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in colon cancer. *Dig Dis Sci* 2008, 53(5):1289-1296.
- 433. Kontos CK, Papadopoulos IN, Fragoulis EG, Scorilas A: Quantitative expression analysis and prognostic significance of L-DOPA decarboxylase in colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2010, 102(9):1384-1390.
- 434. Papagiorgis PC, Zizi AE, Tseleni S, Oikonomakis IN, Sofras L, Patsouris E, Nikiteas NI: Disparate clinicopathological correlations of p53 and Bcl-2 in colorectal cancer. *Molecular medicine reports* 2012, 5(2):377-382.
- 435. Kontos CK, Papadopoulos IN, Scorilas A: Quantitative expression analysis and prognostic significance of the novel apoptosis-related gene BCL2L12 in colon cancer. *Biol Chem* 2008, 389(12):1467-1475.
- 436. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H: Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000, 119(4):921-928.
- 437. Ohrling K, Edler D, Hallstrom M, Ragnhammar P: Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Acta Oncol* 2010, 49(6):797-804.

- 438. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A: Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol Chem* 2010, 391(5):505-511.
- 439. Kontos CK, Chantzis D, Papadopoulos IN, Scorilas A: Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA predicts short-term relapse in colorectal adenocarcinoma patients. *Cancer Lett* 2013, 330(1):106-112.
- 440. Mavridis K, Scorilas A: Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol* 2010, 6(2):269-285.
- 441. Luo LY, Bunting P, Scorilas A, Diamandis EP: Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma? *Clin Chim Acta* 2001, 306(1-2):111-118.
- 442. Shvartsman HS, Lu KH, Lee J, Lillie J, Deavers MT, Clifford S, Wolf JK, Mills GB, Bast RC, Jr., Gershenson DM *et al*: Overexpression of kallikrein 10 in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003, 90(1):44-50.
- 443. Yousef GM, Polymeris ME, Yacoub GM, Scorilas A, Soosaipillai A, Popalis C, Fracchioli S, Katsaros D, Diamandis EP: Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer. *Cancer Res* 2003, 63(9):2223-2227.
- 444. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, Hellstrom I, Mok SC, Liu J, Bast RC, Jr.: Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005, 99(2):267-277.
- 445. Yousef GM, Borgono CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A, Diamandis EP: In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. *Anticancer Res* 2004, 24(1):43-51.
- 446. Goyal J, Smith KM, Cowan JM, Wazer DE, Lee SW, Band V: The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res* 1998, 58(21):4782-4786.
- 447. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A: Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem* 2012, 393(5):301-317.
- 448. Luo LY, Yousef G, Diamandis EP: Human tissue kallikreins and testicular cancer. *APMIS* : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 2003, 111(1):225-232; discussion 232-223.
- 449. Ewan King L, Li X, Cheikh Saad Bouh K, Pedneault M, Chu CW: Human kallikrein 10 ELISA development and validation in breast cancer sera. *Clin Biochem* 2007, 40(13-14):1057-1062.
- 450. Vaux DL, Korsmeyer SJ: Cell death in development. Cell 1999, 96(2):245-254.
- 451. Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW: Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J* 1996, 15(16):4130-4141.
- 452. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ: Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(8):3668-3672.
- 453. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ: Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998, 17(14):3878-3885.

- 454. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999, 3(3):287-296.
- 455. Conradt B, Horvitz HR: The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998, 93(4):519-529.
- 456. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB: CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995, 3(1):87-98.
- 457. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW: MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(8):3516-3520.
- 458. Grumont RJ, I.J. Rourke, and S. Gerondakis.: Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes & Dev* 1999, 13:400-411.
- 459. Zong WX, L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas.: The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kB that blocks TNFa-induced apoptosis. *Genes & Dev* 1999, 13:382-387.
- 460. von Freeden-Jeffry U, Solvason N, Howard M, Murray R: The earliest T lineagecommitted cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 1997, 7(1):147-154.
- 461. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G: Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2002, 21(57):8786-8803.
- 462. Reed JC: Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 2008, 111(7):3322-3330.
- 463. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G: bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989, 320(16):1047-1054.
- 464. Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S: Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J Clin Oncol* 1994, 12(1):149-154.
- 465. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J *et al*: Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996, 87(1):265-272.
- 466. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D *et al*: Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996, 88(3):1046-1051.
- 467. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC: Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996, 148(5):1567-1576.

- 468. Krajewska M, Kitada S, Winter JN, Variakojis D, Lichtenstein A, Zhai D, Cuddy M, Huang X, Luciano F, Baker CH *et al*: Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clin Cancer Res* 2008, 14(10):3011-3021.
- 469. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC *et al*: Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997, 90(1):244-251.
- 470. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, Kipps TJ, Choi YS, Bennett F, Reed JC: Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002, 100(5):1795-1801.
- 471. Dolezalova D, Mraz M, Barta T, Plevova K, Vinarsky V, Holubcova Z, Jaros J, Dvorak P, Pospisilova S, Hampl A: MicroRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2012, 30(7):1362-1372.
- 472. Almond JB, Cohen GM: The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002, 16(4):433-443.
- 473. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS: Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 2006, 244(2):164-171.
- 474. Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U: A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000, 60(11):2805-2809.
- 475. Innocenti F, Cox NJ, Dolan ME: The use of genomic information to optimize cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 2011, 38(2):186-195.
- 476. Welsh M, Mangravite L, Medina MW, Tantisira K, Zhang W, Huang RS, McLeod H, Dolan ME: Pharmacogenomic discovery using cell-based models. *Pharmacol Rev* 2009, 61(4):413-429.
- 477. Thomadaki H, Scorilas A: Breast cancer cells response to the antineoplastic agents cisplatin, carboplatin, and doxorubicin at the mRNA expression levels of distinct apoptosis-related genes, including the new member, BCL2L12. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1095:35-44.
- 478. Thomadaki H, Scorilas A: Molecular profile of breast versus ovarian cancer cells in response to treatment with the anticancer drugs cisplatin, carboplatin, doxorubicin, etoposide and taxol. *Biol Chem* 2008, 389(11):1427-1434.
- 479. Thomadaki H, Scorilas A: Molecular profile of the BCL2 family of the apoptosis related genes in breast cancer cells after treatment with cytotoxic/cytostatic drugs. *Connect Tissue Res* 2008, 49(3):261-264.
- 480. Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A: Treatment of MCF-7 cells with taxol and etoposide induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BCL2L12, BAX, CASPASE-9 and FAS. *Biol Chem* 2006, 387(8):1081-1086.
- 481. Korbakis D, Scorilas A: Treatment of gastric cancer cells with 5fluorouracil/leucovorin and irinotecan induces distinct alterations in the mRNA expression of the apoptosis-related genes, including the novel gene BCL2L12. *Tumour Biol* 2009, 30(2):100-107.

- 482. Floros KV, Talieri M, Scorilas A: Topotecan and methotrexate alter expression of the apoptosis-related genes BCL2, FAS and BCL2L12 in leukemic HL-60 cells. *Biol Chem* 2006, 387(12):1629-1633.
- 483. Floros KV, Thomadaki H, Florou D, Talieri M, Scorilas A: Alterations in mRNA expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, FAS, caspase-3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1090:89-97.
- 484. Floros KV, Thomadaki H, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A: mRNA expression analysis of a variety of apoptosis-related genes, including the novel gene of the BCL2-family, BCL2L12, in HL-60 leukemia cells after treatment with carboplatin and doxorubicin. *Biol Chem* 2004, 385(11):1099-1103.
- 485. Floros KV, Thomadaki H, Lallas G, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A: Cisplatininduced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 1010:153-158.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Α. ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- Spyridon Christodoulou, Dimitra K. Alexopoulou, Christos K. Kontos, Andreas Scorilas, Iordanis N. Papadopoulos. Kallikrein-related peptidase-6 (KLK6) mRNA expression is an independent prognostic tissue biomarker of poor disease-free and overall survival in colorectal adenocarcinoma. Tumour Biol. 2014 Jan 16. DOI 10.1007/s13277-014-1612-y.
- Alexopoulou DK, Papadopoulos IN, Scorilas A. Clinical significance of kallikreinrelated peptidase (KLK10) mRNA expression in colorectal cancer. *Clin Biochem*; 46(15):1453-61, 2013.
- Talieri M, Alexopoulou DK, Scorilas A, Kypraios D, Arnogiannaki N, Devetzi M, Patsavela M, and Xynopoulos D. Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (*KLK10*) in colorectal cancer. Tumour Biol; 32(4):737-44, 2011.
- Talieri M, Li L, Zheng Y, Alexopoulou DK, Soosaipillai A, Scorilas A, Xynopoulos D, and Diamandis EP. The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. *Br J Cancer*; 100(10):1659-65, 2009.
- Talieri M, Mathioudaki K, Prezas P, Alexopoulou DK, Diamandis EP, Xynopoulos D, Ardavanis A, Arnogiannaki N, Scorilas A. Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. *Thromb Haemost;* 101(4):741-7, 2009.

Β. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- Alexopoulou DK, Christodoulou S, Papadopoulos IN, Scorilas A. Quantitative expression analysis of *KLK10* and evaluation of its clinical significance in colorectal cancer. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases, Rhodes, Greece, 2011.
- Alexopoulou DK, Zheng Y, Li L, Diamandis EP, Soosapillai A, Talieri M. Multiple tissue kallikrein-related peptidases in colorectal cancer. 59th Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Athens, Greece, 2007.
- Alexopoulou DK, Scorilas A, Talieri. The human kallikrein-related peptidase 6 and 10 genes and their clinical significance in colorectal cancer. 59th Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Conference, Athens, Greece, 2007.
- Alexopoulou DK, Zheng Y, Li L, Diamandis EP, Soosapillai A, Scorilas A, Xynopoulos D, Talieri M. Multiple tissue kallikrein-related peptidases in colorectal cancer. 2nd International Symposium on Kallikreins & Kallikrein-related peptidases, Santorini, Greece, 2007.
- Alexopoulou DK, Scorilas A, Talieri M. Clinical Significance of human *KLK10* gene expression in colorectal cancer. 2nd International Symposium on Kallikreins & Kallikreinrelated peptidases, Santorini, Greece, 2007.
- Alexopoulou DK, Scorilas A, Talieri M. Expression and clinican evaluation of Kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) gene in colon cancer. *American Association for Cancer Research (AACR) 98th Annual Meeting*, Los Angeles, CA, United States, 2007.
- 7. Αλεξοπούλου ΔΚ, Μαθιουδάκη Κ, Σκορίλας Α, Ξυνόπουλος Δ, Αρνογιαννάκη Ν, Ταλιέρη Μ. Ο ρόλος του γονιδίου της Καλλικρεΐνης 10 (KLK10) στον καρκίνο του παχέος εντέρου. 3° Πανελλήνιο Διεταιρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα, 2007.

Contents lists available at ScienceDirect







journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem

Clinical significance of kallikrein-related peptidase (*KLK10*) mRNA expression in colorectal cancer

Dimitra K. Alexopoulou^a, Iordanis N. Papadopoulos^b, Andreas Scorilas^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Athens GR-15701, Greece

^b Fourth Surgery Department, Medical School, University General Hospital "Attikon", 1 Rimini Street, Athens GR-12462, Greece

ARTICLE INFO

Article history: Received 18 December 2012 Received in revised form 22 February 2013 Accepted 3 March 2013 Available online 13 March 2013

Keywords: Colon cancer Tissue kallikreins KLKs Cancer biomarkers Real-time PCR

ABSTRACT

Objectives: Colorectal cancer (CRC) is one of the three most common cancers in both genders. Even though several biomarkers are in use in diagnosis and prognosis of the disease, they are marred by limited specificity and sensitivity. The human kallikrein-related peptidase 10 (*KLK10*) gene is a member of the human tissue kallikrein family. Because prostate specific antigen (PSA), the best biomarker for detecting and monitoring prostate cancer, is a member of this family, many other members, including KLK10, have been widely examined as novel biomarkers for different cancer types. In previous studies, KLK10 has been proposed as a diagnostic biomarker for ovarian carcinoma, while its methylation on exon 3 has been proposed as a prognostic marker for early-stage breast cancer patients. The purpose of this study was to analyse *KLK10* mRNA expression and examine its prognostic value and potential clinical application as a novel molecular tissue biomarker in CRC.

Design and methods: The study group consisted of 190 colorectal samples. Total RNA was extracted from pulverised tissues and cDNA was prepared by reverse transcription. *KLK10* was amplified by real-time PCR. *B2M* was used as a reference gene and HT-29 cells as positive control.

Results: *KLK10* expression was significantly higher in cancer tissues (P < 0.001). Tumours of advanced TNM and Dukes' stage showed high *KLK10* expression status (P = 0.036; P = 0.025). Patients with high *KLK10* expression had a shorter disease-free and overall survival rates (P = 0.014; P = 0.020).

Conclusion: Our results suggest that *KLK10* may serve as a new marker of unfavourable prognosis of colorectal cancer.

© 2013 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in both men and women. Incidence rates have been decreasing for the best part of the last two decades. The decline has largely been attributed to increases in the use of CRC screening tests that allow the detection and removal of colorectal polyps before their progress to cancer. In contrast to the overall declining rates, among adults younger than 50 years and in average risk, for which screening is not recommended, CRC incidence rates have been increasing by about 2% per year since 1994, in both men and women. During the same period, mortality rates have declined in both genders. The declining overall incidence and mortality rates reflect improvements in early detection and treatment of CRC [1].

The usual diagnostic procedure is endoscopy and biopsy of the tumour. Current preoperative staging procedures include a full medical history review and physical examination, blood counts, complete biochemistry profile and serum markers, abdominal and pelvic computed tomography (CT) scans, and a plain chest X-ray [2]. The number of the lymph nodes that are surgically removed is used for the staging of CRC and is correlated with patient survival [3].

Several prognostic and predictive markers have been identified, although very few of them are currently used in clinical practice. Microsatellite instability (MSI) is one prognostic factor in use for cancer recurrence and prediction of overall survival in stage II and III patients [4]. Mutations in KRAS are clinically used as a predictor for poor response to treatment with anti-EGFR antibodies in patients with metastatic CRC [5,6]. Other identified prognostic markers, which however are not currently used in clinical practice, include loss of heterozygosity of 18q [7], cancer antigens such as CEA, CA19-9 [8], and RCAS1 [9], enzymes such as thymidylate synthetase [10] and L-DOPA decarboxylase [11], apoptosis-related genes, e.g. BCL2 [12] and BCL2L12 [13]; however, these molecules are not currently used in clinical practice. No predictive marker for response to adjuvant therapy has yet reached clinical use, although some studies show that MSI tumours are resistant to treatment with fluorouracil [14,15]. CRC is a complex disease and the serum-based tumour markers already in use only play a limited role, due to a lack of specificity and sensitivity. There is an

0009-9120/\$ – see front matter © 2013 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.002

^{*} Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, 15701 Athens, Greece. Fax: + 30 210 727 4158.

E-mail address: ascorilas@biol.uoa.gr (A. Scorilas).

urgent need for identification of new biomarkers if a more effective diagnosis, prognosis and response to treatment is to be achieved.

Human tissue kallikrein-related peptidases (KLKs) constitute the largest contiguous cluster of protease genes with no intervention from other genes. They are located in the chromosomal region 19q13.3-q13.4 and they encode for 15 highly conserved trypsin- or chymotrypsin-like serine proteases [16]. Tissue KLKs were first divided into "classical" and "non-classical" members. The term "classical" refers to the three members that were first identified: KLK1, KLK2 and KLK3 (also known as PSA). The remaining 12 members of the family that were discovered last, namely KLK4-KLK15, are mentioned as "non-classical" [17]. Due to another classification that was adopted later on, only KLK1 still holds the "kallikrein" name, whereas the rest of the KLKs (KLK2-KLK15) are characterised as kallikrein-related peptidases [18]. The KLK family is an attractive field of study because one of its "classical" members, the famous PSA/KLK3, is the most acceptable and broadly used cancer biomarker until today [19]. Moreover, several KLKs have been shown to possess prognostic and/or predictive value in CRC, including KLK4 [20] and KLK7 mRNA [21], as well as KLK5, KLK7, and KLK11 proteins [22].

The human kallikrein-related peptidase 10 (*KLK10*) gene was cloned by using subtractive hybridisation between normal mammary epithelium cells strain and its radiation-transformed carcinogenic derivative. It was first named *NES1* (Normal Epithelial cell-Specific 1 gene), because of its selective expression in normal mammary epithelial cells [23]. The *KLK10* gene is about 5.5 kb in length and consists of six exons (one non-coding and five coding exons). Owing to alternative splicing, which is common in all human *KLKs* and many other genes located on the genomic locus 19q13.3–q13.4 [24], the *KLK10* gene is transcribed into three distinct splice variants: splice variant 1 (SV1), splice variant 2 (SV2), and splice variant 3 (SV3). All variants have a different first noncoding exon, whereas all five coding exons are identical, with the exception of a 3-bp 5'-extension in the first coding exon of SV1 [25].

The *KLK10* gene codes for a 30-kDa secreted serine protease of 276 amino acids. The residues that form the catalytic triad give KLK10 a trypsin-like enzymatic activity [26]. *KLK10* gene expression has been detected in many tissues, such as the salivary gland, skin, colon, fallopian tube, prostate, testis and more, and is detected in various biological fluids, such as the milk of lactating women, seminal plasma, amniotic fluid, male and female serum, and CSF [27]. The immunohistochemical expression pattern of KLK10 has been found to be cytoplasmic and not organ-specific [28,29].

Several studies have been performed in order to evaluate the potential role of KLK10 as a cancer biomarker [30]. Due to its higher levels in the tumour tissue and serum of ovarian cancer patients, the KLK10 has been proposed as a useful serological diagnostic and prognostic marker for ovarian cancer, in combination with CA125, for increased diagnostic sensitivity [31–35]. *KLK10* mRNA expression was also found to be upregulated in colorectal and pancreatic cancer by an *in silico* analysis of EST and SAGE libraries [36]. This analysis was confirmed by another study in which elevated levels of *KLK10* mRNA expression detected in tissue samples by semi-quantitative PCR were associated with CRC progression and unfavourable prognosis [37]. Higher levels of the KLK10 protein have also been observed in CRC tissue extracts, in comparison with normal colorectal samples [22].

In contrast, KLK10 expression has been found to be downregulated in breast and prostate cancer cell lines and in breast tumours [38,39], as well as in testicular cancers [40]. Transfection of KLK10 into a highly aggressive KLK10-negative breast cancer cell line resulted in suppression of the carcinogenic phenotype in nude mice [38]. These results suggested that KLK10 may function as a tumour suppressor [41]. However, when KLK10 levels were measured in serum from women bearing malignant or benign breast tumours as well as from healthy controls, no significant difference was observed [42]. This finding was not surprising, since KLK10 is a secreted protein that is expressed in many tissues. Thus, serum levels would count for the total KLK10 excretion from multiple tissues and it seems difficult to detect a difference caused by the tumour. Nevertheless, such a difference was observed in the serum of ovarian cancer patients [32].

Other research groups have tried to analyse the mechanism of KLK10 loss of expression in some tumours. The results suggested that the hypermethylation of the gene is probably the cause of its silencing; neither a deletion nor a rearrangement of the *KLK10* gene accounted for this downregulation of expression. Since the promoter region is defined to be poor in CpG islands and most cancer cell lines are able to support full or partial transcription from the *KLK10* promoter, another *cis*-acting mechanism was considered responsible for KLK10 loss of expression. Finally, the methylation sites were discovered within CpG-rich exons 2–4, especially in exon 3 [43–45].

In the present study, we have analysed the expression of *KLK10* mRNA in CRC specimens using a highly sensitive and accurate quantitative real-time PCR (qRT-PCR) methodology based on the SYBR Green chemistry, and we demonstrated its prognostic potential and clinical utility as a novel tissue biomarker in CRC.

Materials and methods

Colon tissue samples

The study group consisted of 136 patients who underwent surgery for primary CRC at the Fourth Surgery Department, University General Hospital "Attikon", Athens, Greece, between 2000 and 2009. For 54 of them, normal adjacent tissue was also available. All tissue specimens were frozen in liquid nitrogen immediately after surgery, until pulverised and dissolved in TRI Reagent (Ambion (Europe) Ltd., Huntingdon, UK).

Tumour tissues were histologically characterised by a pathologist and a database containing clinicopathological data of patients was built for statistical analysis. Informed consent was obtained from patients participating in the study. The study was approved by the institutional review board of the University General Hospital "Attikon" (Athens, Greece) and conducted in accordance with the ethical standards of the World Medical Association Declaration of Helsinki (version: 2008).

Patient age varied between 35.0 and 93.0 years with a mean \pm SE of 66.5 \pm 1.1, and tumour size from 1.00 up to 14.00 cm with a mean \pm SE of 4.75 \pm 0.19. Follow-up information was available for 121 patients and included disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) status along with the dates of recurrence and death, as well as cause of death.

Cell line

The colon adenocarcinoma grade II cell line HT-29, used in this study as a calibrator in real-time PCR, was cultured in McCoy's 5A medium (PAA Laboratories GmbH) supplemented with 10% foetal bovine serum (South America Origin), at 37 °C, 5% CO₂, according to ATCC instructions. Cells were grown at a confluence up to 80%, and then harvested with the proteolytic enzyme trypsin. After a short mild centrifugation, the cell pellet was diluted in TRI Reagent (Ambion) for RNA isolation.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from HT-29 cells and colon tissue specimens using TRI Reagent, following the manufacturer's instruction. For the safe storage of RNA at -80 °C until use, total RNA samples were diluted in an RNA Storage Solution (Ambion (Europe) Ltd.). RNA concentration and its purity were determined spectrophotometrically. 2 µg of total RNA was reverse-transcribed into first-strand cDNA using the SuperscriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo-dT as primer, following the manufacturer's instructions. The final reaction volume was 20 µL.

35

32

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed using the SYBR Green chemistry in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The beta-2-microglobulin (B2M) gene was used as an endogenous control for normalisation of all PCRs for the amount of RNA added in the reverse transcription reactions. The choice of the appropriate housekeeping gene for the normalisation of the RT-PCR results is very important. It is a very sensitive technique highly depended on the amount and quality of the input mRNA. In order to avoid false interpretation of the RT-PCR results due to this drawback, we make the assumption that there is a gene whose expression level does not change from sample to sample and is called housekeeping gene. The idea of some "gold standards" as housekeeping genes for all tissue types, developmental stages and cancer types has been abandoned and replaced by the notion of finding the suitable housekeeping gene for a specific tissue, pathology, or experimental design. Based on this idea, previous researches drove as to B2M as the most appropriate normalizing gene for the specific technique, tissue type and pathology [46,47]. Furthermore, the HT-29 cancer cell line was used as a calibrator, thus allowing comparison of results from the PCR reactions that were run separately.

Based on KLK10 and B2M mRNA sequences and on the instructions for achieving better sensitivity and specificity on the method, one pair of gene-specific primers for each gene of interest was designed. The sequences of KLK10 primers were 5'-TCTACCCTGGCGTGGTCACC-3' and 5'-GCAGAGCCACAGGGGTAAACAC-3', generating a 148-bp PCR amplicon, and the B2M primers were 5'-ACTGAATTCACCCCACTGA-3' and 5'-AAGC AAGCAAGCAGAATTTGGA-3', producing a 167-bp PCR amplicon. The reaction volume was 10 µL and the mixture contained 20 ng of cDNA, 5 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix (2 \times) (Applied Biosystems), and 2 µL of gene-specific primers at a final concentration of 75 nM for B2M and 100 nM for KLK10. The cycling conditions consisted of a denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. Dissociation curves of the PCR products were generated after PCR amplification, as previously described [48], to distinguish between the main PCR products and primer-dimers or other non-specific products. Each reaction was performed in triplicate, in order to evaluate the reproducibility of the acquired data.

Calculations and validation of the comparative CT $(2 - \Delta\Delta CT)$ method for relative KLK10 mRNA quantification

The comparative $C_T (2^{-\Delta\Delta CT})$ method was used for the calculations. ΔC_T is the difference between the threshold cycle (C_T) of the target gene (*KLK10*) and the C_T of the endogenous reference gene (*B2M*) of the same sample. $\Delta\Delta C_T$ represents the difference between the mean ΔC_T value of a colon sample and the mean ΔC_T of the calibrator, both calculated after the same PCR run.

The application of the aforementioned method is based on the assumptions that the PCR amplification efficiencies of the target and the reference genes are similar to each other and close to 1 [49]. In order for this to be checked, we ran a validation experiment, where *KLK10* and *B2M* C_T values were measured in serial dilutions of the calibrator over a 1000-fold range, and the Δ C_T was plotted versus the log cDNA dilution (Fig. 1). Real-time PCR efficiency (*E*) for the amplification of each cDNA was calculated as previously described [50]. As illustrated in Fig. 1, the slopes of *KLK10* and *B2M* amplification plots are very similar (-3.350 and -3.403, respectively), which clearly indicates similar efficiencies for the corresponding amplicons (98.8% and 96.7%, respectively).

Normalised results were expressed as relative quantification (RQ) units, which stand for the ratio of *KLK10* mRNA copies to *B2M* mRNA copies, calculated for each colorectal tissue specimen, in relation to the same ratio, calculated for the calibrator [51]. The normalised $(2^{-\Delta\Delta CT})$ amounts of each sample *KLK10* mRNA levels were then



C_T vs cDNA dilution

Fig. 1. Validation of the comparative $C_T (2^{-\Delta\Delta C_1})$ method to assess the efficiency of PCR amplification of *KLK10* and *B2M* cDNA. C_T was calculated for each gene and each cDNA dilution and plotted against log cDNA dilution. All data were fitted using least-squares linear regression analysis.

multiplied with the average ratio of *KLK10* mRNA copies to *B2M* mRNA copies of HT-29 cells $(2^{-6.502})$, which was calculated from the intercept of the regression line. These calculations made our results from different runs comparable and independent of the *KLK10* mRNA expression levels of HT-29 cells. Finally, these results were multiplied by 1000, thus yielding c/Kc (*KLK10* mRNA copies per 1000 *KLK10* mRNA copies). Each real-time PCR reaction was performed in triplicate to evaluate the reproducibility of data.

Statistical analysis

To our knowledge, this is the largest study of *KLK10* mRNA expression in CRC patients. Since the distributions of *KLK10* and *B2M* expression levels in CRC patients were not Gaussian, the analysis of the differences between cohorts of cancerous and non-cancerous specimens was carried out with the non-parametric Mann–Whitney *U* test. Furthermore, KLK10 mRNA expression was compared in the pairs of cancerous and non-cancerous specimens with the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. Finally, the significance of any differences between distinct patient subgroups was evaluated using either the Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis test, where appropriate.

Categorisation of continuous variables in order to stratify patients into high versus low categories is very common in laboratory medicine. Numerous methods are used to determine a cutpoint, including biological determination, splitting at the median, and determination of the cutpoint which maximises effect difference between groups. If the latter approach ("optimal P-value" method) is used, then a dramatic inflation of type-I error rates may result [52]. A recently developed algorithm, X-tile, allows determination of an optimal cutpoint while correcting for the use of minimum P-value statistics [53]. Since there are no established cutpoints available for KLK10 expression in CRC, the X-tile algorithm was used to generate an optimal cutpoint for categorisation of KLK10 expression levels. This process produced an optimal cutoff of 3.51 RQ, which is equal to the median (50th percentile) of KLK10 mRNA expression levels. Based on this optimal cutoff, KLK10 mRNA expression was classified as either positive or negative. The chi-square (χ^2) or Fisher's exact test, where appropriate, was used to analyse the potential associations between KLK10 mRNA expression status and other categorical clinicopathological variables.

In order to assess the diagnostic value of *KLK10* mRNA expression in CRC, receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed for *KLK10* mRNA expression levels and the areas under the ROC curves (AUC) were analysed by the Hanley and McNeil method.

The Cox proportional hazard regression model was applied to evaluate the prognostic potential of *KLK10* mRNA expression regarding

– B2M • KLK10 disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of the CRC patients. The analysis was performed at both univariate and multivariate levels. Multivariate Cox regression analysis included only patients for whom the status of all clinicopathological variables was known. The multivariate models were adjusted for nodal status and tumour size as well as for disease stage and histological grade. Finally, Kaplan–Meier survival curves were also constructed for the DFS and OS of CRC patients, and the long-rank (Mantel–Cox) test was used to evaluate the differences between them. The level of significance was defined at a probability value of less than 0.05 (P < 0.05). All statistical analyses were performed using the SPSS software (version 18).

Results

KLK10 mRNA expression in colorectal tissues

KLK10 mRNA expression in 136 CRC tissues ranged from 0.001 up to 336.12 RQ units with a mean \pm SE of 19.22 \pm 4.42, whereas the expression levels of the non-cancerous colorectal mucosa varied between 0.001 and 16.76 RQ units with a mean \pm SE of 0.58 \pm 0.33 (Table 1). *KLK10* mRNA expression was found to be, on average, 33-foldhigher in cancerous tissue specimens than in non-cancerous samples (*P* < 0.001) (Fig. 2). The analysis of the *KLK10* mRNA expression in 54 pairs of primary cancerous and non-cancerous colorectal tissue specimens demonstrated that *KLK10* mRNA expression was significantly upregulated in the vast majority (94.4%) of CRC tissues (*P* < 0.001) (Table 2 and Fig. 3).

Discriminatory value KLK10 mRNA expression in CRC

In order to evaluate the discriminatory potential of *KLK10* mRNA expression in CRC, we performed ROC analysis. As illustrated by the ROC curve in Fig. 4, *KLK10* mRNA expression status was shown to efficiently distinguish CRC from normal counterparts (area under the curve [AUC] = 0.889, 95% confidence interval [95%CI] = 0.849–0.951, P < 0.001).

Associations of KLK10 mRNA expression status and clinicopathological variables

KLK10 mRNA expression was significantly elevated in advancedstage CRC, namely in colorectal tumours of advanced stage (Dukes' stage C or D; P = 0.036; Fig. 5A) and/or low differentiation (grade III; P = 0.025; Fig. 5B), as well as in CRC patients with positive regional lymph nodes (P = 0.046; Fig. 5C) and/or distant metastasis (P = 0.027; Fig. 5D).

Table 1

Distribution of numerical variables of the study in CRC patients.

			Percentile		
			25th	50th	75th
Variable	$\text{Mean} \pm \text{S.E.}^{\text{b}}$	Range	Median		
<i>KLK10</i> in tumours (RQ units ^a ; $N = 136$)	19.22 ± 4.42	0.001-336.12	0.88	3.51	12.59
<i>KLK10</i> in non-cancerous tissues (RQ units ^a ; N = 54)	0.58 ± 0.33	0.001-16.76	0.013	0.046	0.17
Patient age (years; N = 132)	66.5 ± 1.1	35.0-93.0	58.5	68.0	75.0
Tumour size (cm; $N = 128$)	4.73 ± 0.19	1.00-14.00	3.05	4.20	5.50
Follow-up time (months; $N = 121$)	48.8 ± 3.5	1.0-135.0	17.0	49.0	77.5

^a Relative quantification units (KLK10 mRNA copies/10³ B2M mRNA copies).

^b Standard error of the mean.



Fig. 2. Distribution of *KLK10* mRNA expression in the cohorts of normal and cancerous colorectal tissue specimens. The line bars represent the median value (50th percentile). *KLK10* mRNA expression levels were higher in cancerous tissues than in normal mucosa. The *P*-values were calculated using the Mann–Whitney *U* test.

KLK10 mRNA expression was next classified as positive or negative, based on the optimal cutoff point that was created as described in the Materials and methods section. From a total of 136 CRC patients, 68 were classified as positive and 68 as negative. As presented in Table 3, *KLK10* mRNA status was found to be statistically significantly associated with Dukes' stage (P = 0.012) and tumour grade (P = 0.023). The significance of the association between *KLK10* mRNA status and patients' nodal status was marginal (P = 0.05).

KLK10 and CRC patients' survival

Follow-up information was available for 121 patients, 37 of whom had relapsed (30.6%) and 22 had died (18.2%). The relationship between each clinicopathological parameter and DFS as well as OS was revealed by the univariate Cox regression analysis. In particular, Dukes' stage, tumour histological grade, and nodal status were shown to constitute significant predictors of patients' survival. Furthermore, *KLK10* gene expression at the mRNA level is a significant predictor of DFS (P = 0.017) and OS (P = 0.025), since *KLK10* mRNA-positive patients had a higher risk of relapse and death (Table 4). The Kaplan–Meier survival curves confirmed the unfavourable prognostic value of *KLK10* mRNA expression status, as CRC patients with *KLK10* mRNA-positive tumours had significantly shorter DFS (P = 0.014; Fig. 6A) and OS (P = 0.020; Fig. 6B) than those bearing a *KLK10* mRNA-negative malignant neoplasm.

In the multivariate survival analysis (Table 4), *KLK10* mRNA expression was not found to add any prognostic power in the developed

Table 2

KLK10 mRNA expression in 54 pairs of primary cancerous and non-cancerous colorectal tissues.

Variable	Number of patients (%)	P-value		
KLK10 mRNA expression in cancerous				
vs. non-cancerous tissues (N = 54)				
Higher	51 (94.4)	$< 0.001^{a}$		
Lower	1 (1.8)			
Approximately equal	2 (3.7)			

^a Calculated using the Wilcoxon signed-rank test.



Fig. 3. *KLK10* mRNA expression in paired cancerous and adjacent non-cancerous colorectal tissues. The *KLK10* mRNA levels were elevated more often in CRC specimens (\blacksquare H) than in adjacent non-malignant tissues (\square Ca). The *P* value was calculated using the Wilcoxon signed-rank test.

Cox regression model when adjusted for tumour histological grade and Dukes' stage. However, when patients' nodal status and tumour size were included in the Cox regression model, *KLK10* mRNA expression remained a statistically significant predictor of both DFS and OS in CRC, as patients with *KLK10* mRNA-positive colorectal tumours were more prone to relapse and/or die (P = 0.040 and P = 0.021, respectively).

Discussion

Colorectal cancer is one of the three most common malignancies diagnosed in both men and women. The use of CRC screening tests can detect the malignancy early and prevent its development with the removal of precancerous polyps. Despite that, only 59.1% of the



Fig. 4. Receiver operating characteristic (ROC) analysis for *KLK10* mRNA expression. *KLK10* mRNA expression (----) was found to distinguish successfully CRC tissues from normal mucosa. AUC: area under the ROC curve.

population older than 50 years receives screening tests and only 39% of CRC patients are diagnosed at an early stage, when treatment can lead to significantly higher survival rates. The most common treatment for early-stage CRC patients (stages I and II) is the surgical removal of the tumour and nearby lymph nodes. Patients who are diagnosed at a late stage of the disease are given chemotherapy alone, or in combination with radiation therapy, before or after the surgery. The survival rates are dependent on the stage of the diagnosis. When the malignancy is detected at an early stage, there is a 90.1% 5-year survival rate. However, if the disease is diagnosed at a later stage involving adjacent organs or lymph nodes, the 5-year survival rates decline to 69.2%. If the metastasis occurs in distant organs, the 5-year survival rate drops down to 11.7%. Apart from that, the survival rates for CRC patients decline almost 30% in 10-year survival in comparison with 1-year survival [54]. Taking into account the aforementioned information, the importance of the identification of new cancer biomarkers with greater sensitivity and specificity than the ones currently used for the diagnosis and prognosis of CRC is paramount.

In 1996, when the KLK10 gene was originally cloned, it was characterised as a putative tumour-suppressor gene because of the loss of its expression in a breast cancer cell line [23]. Another study on breast tissue samples analysing KLK10 mRNA expression by in situ hybridisation gave additional support to those results by showing that all normal samples were positive for KLK10 expression, while most cancer tissues were negative [41]. It has been proposed that this loss of expression is taking place via the methylation of the third exon of the gene, which in consequence deactivates its tumour-suppressor properties [43]. This phenomenon has been reported in another study, in which methylation of the third exon of the KLK10 gene was shown to possess important prognostic value in early breast cancer patients, since it was associated with shorter DFS and OS [55]. The prognostic value of the methylation of the third exon of this gene, with regards to DFS, was demonstrated also in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia [56]. The same experiments would be very interesting to be performed in colorectal tissue samples in order to understand whether this overexpression of KLK10



Fig. 5. Boxplots showing the distribution of *KLK10* mRNA expression in CRC patients' subgroups. *KLK10* mRNA was significantly upregulated in colorectal tumours of advanced stage (A) and/or low differentiation (B), as well as in CRC patients with positive regional lymph nodes (C) and/or distant metastasis (D). The bold line bars represent the median value (50th percentile). The *P*-values were calculated using the Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis test, where appropriate.

Table 3 Relationships between KLK10 mRNA expression status and CRC patients' clinicopathological variables.

		Number of patients (%)			
Variable	Total	KLK10-negative ^a	KLK10-positive ^a	P-value	
Nodal status					
Negative	74	42 (56.8)	32 (43.2)	0.05 ^d	
Positive	55	21 (38.2)	34 (61.8)		
Х	7				
Stage ^b					
A	19	14 (73.7)	5 (26.3)	0.012 ^e	
В	54	28 (51.9)	26 (48.1)		
C/D	54	19 (35.2)	35 (64.8)		
Х	9				
Grade ^c					
I/II	106	55 (51.9)	51 (48.1)	0.023 ^d	
III	18	4 (22.2)	14 (77.8)		
Х	12				

X: Status is unknown.

^a Cutoff point: 3.51 RQ units, equal to the median (50th percentile).

^b Modified Dukes' staging system.

^c Cooper's grading system.

^d Calculated using Fisher's exact test.

 $^{e}\,$ Calculated using Pearson's chi-square (χ^{2}) test.

in cancer tissues is due to demethylation of CpG islands. Current studies have focussed only on exon 3 hypermethylation, whereas exons 2 and 4 are also CpG-rich. Future studies examining methylation of all CpG-rich exons will help to the understanding of *KLK10* hypermethylation and tumour-specific loss of expression.

The results from these previous studies link CpG island hypermethylation with the downregulation of KLK10 mRNA and protein expression, but they cannot explain the pattern of expression of KLK10 gene in all tissues [57]. Taking into consideration that previous studies have found that KLK10 is upregulated by steroid hormones through binding to their own receptors and that the promoter of KLK10 probably lacks hormone-response elements (HREs), it is likely to assume that these exons might contain HREs, as well as other transcription factor binding sites. Since the function of steroid hormone receptors is modulated by steroid hormone receptor coactivators/corepressors, that act as bridging molecules to turn-on or suppress transcription, it is also likely to assume that different amounts of coactivators/corepressors could play an important role in the differential regulation of KLK10 by steroid hormones [58]. With this hypothesis, the overexpression of KLK10 in ovarian cancer may be easily explained due to a possible disruption of DNA methylation mechanisms followed by sex hormone imbalance. It seems that when interpreting KLK10 expression levels in steroid hormone-related diseases, a more complicated explanation among the KLK10 gene, steroid hormone receptors, and other epigenetic changes should be taken into consideration. DNA methylation of KLK10 as a

Table 4

KLK10 mRNA expression status and survival of CRC patients.

	Disease-free survival			Overall survival		
	HR ^a	95% CI ^b	P-value	HR ^a	95% CI ^b	P-value
Variable	Univariate analysis					
KLK10						
Negative	1.00			1.00		
Positive	2.35	1.16-4.77	0.017	2.43	1.12-5.28	0.025
Size (cm)	1.03	0.89-1.19	0.68	0.98	0.84-1.15	0.84
Positive lymph nodes	2.35	1.28-4.31	0.006	1.94	1.01-3.71	0.045
Stage (ordinal)	3.11	2.03-34.77	< 0.001	2.70	1.75-4.17	< 0.001
Histological grade (ordinal)	3.82	2.01-7.32	< 0.001	3.87	1.91–7.83	< 0.001
Multivariate analysis						
KLK10 ^c						
Negative	1.00			1.00		
Positive	2.36	1.09-5.08	0.040	2.75	1.16-6.52	0.021
KLK10 ^d						
Negative	1.00			1.00		
Positive	1.41	0.63-3.16	0.48	1.72	0.71-4.19	0.23

^a Hazard ratio (HR), estimated from Cox proportional hazard regression model.

^b Confidence interval of the estimated HR.

^c Multivariate models were adjusted for patients' nodal status and tumour size.

^d Multivariate models were adjusted for tumour histological grade and Dukes' stage.

tumour suppressor gene can be seen as one hit in the well-known Knudson's model for tumourigenesis in other types of cancer, but its upregulation in colorectal cancer clearly opens a new angle to the discussion on its function in cancer.

As already mentioned, in ovarian cancer, *KLK10* has been proposed as an unfavourable prognostic biomarker, due to high concentrations of *KLK10* in ovarian cancer tissue extracts compared to normal ones. These elevated levels of *KLK10* have been associated with advanced disease stage, tumour size, shorter DFS and OS [32,59]. In a later study, *KLK10* has been proposed as a valuable prognostic marker in ovarian cancer patients in combination with the currently used biomarkers [60]. A similar expression pattern was found in gastrointestinal tumours; higher *KLK10* mRNA levels were observed in cancer tissues and were associated with tumour invasion and advanced clinical stages [61].

Taking into consideration that KLK10 physiological substrates have not been described and its implication in cancer initiation or metastasis has not been proven yet, several hypotheses have been made regarding the possible role of KLK10 and the kallikrein family in general. Given the fact that kallikreins are serine proteases, one such hypothesis is based on their established implication in colorectal carcinogenesis by their ability to degrade extracellular matrix proteins thus allowing the progress of tumour cell proliferation, invasion and metastasis [62]. Recent studies have shown that KLK4 is aberrantly expressed in colon cancer and capable of inducing PAR1 signaling in cancer cells, suggesting a novel pathway in colon tumourigenesis [63]. Apart from KLK4, KLK14 in another study was shown to act via PAR-2, representing an autocrine/paracrine regulator of colon tumourigenesis. Thus, KLK14 and its receptor, PAR-2, were found to represent therapeutic targets for colon tumourigenesis [64,65]. Another hypothesis is based on the fact that KLK2 and KLK4 are able to activate the single-chain form of the serine protease uPA (urokinase type plasminogen activator) in vitro, which promotes cancer invasion and metastasis by converting plasminogen into plasmin leading to the degradation of the extracellular matrix and activation of other proteases and growth factors; a similar possible role has been attributed previously to KLK10 regarding its involvement in the promotion of metastasis, directly (by degradation of the basement membrane and extracellular matrix) or indirectly (by activation of pro-uPA) [53,62,66,67]. A recent study on the activation of KLK10 matches its profile with that of KLK1, in that, once they are activated they appear unlikely to feed back into activating any further KLK cascade [68]. As with KLK1, which hydrolyses the bioactive kinins, KLK10 may recognise separate bioactive



Fig. 6. Kaplan–Meier survival analysis. Kaplan–Meier curves for disease-free survival (DFS) (A) and overall survival (OS) (B) of patients with *KLK10* mRNA-positive and mRNA-negative colorectal tumours. *KLK10* mRNA was found to have an unfavourable prognostic value in CRC, as patients with *KLK10*-positive mRNA expression status have significantly shorter DFS (P = 0.014) and OS (P = 0.020).

peptide substrates distinct from any other pro-KLK family member. Finally, KLK10 is unique among the KLK family in that it contains a Ser residue at position 193 which probably results in a significant reduction in overall catalytic activity (Liu et al., 1996); KLK10 has thus been described as an essentially inactive protease or as a serine protease with an as yet unidentified substrate [68], which is of high importance to be identified in order to understand whether KLK10 is implicated in colon carcinogenesis or metastasis.

The present study focussed on elucidating the prognostic potential of *KLK10* in cancer, by analysing the mRNA expression in CRC and normal adjacent tissues and by assessing the prognostic significance of *KLK10* mRNA, based on a large cohort of CRC patients. We examined the mRNA expression levels of *KLK10* gene in CRC tissues and their normal counterparts by real-time PCR using the SYBR Green chemistry. Our results indicate that *KLK10* mRNA expression is upregulated in CRC tissue samples compared to normal colonic mucosa, which is in agreement with the findings of previous studies [37,61] performed in a larger study group and with a more precise technique. When evaluating the discriminating value of our method by performing the ROC curve, *KLK10* mRNA expression status proved to efficiently distinguish CRC from normal counterparts.

Higher mRNA expression of *KLK10* was found to be associated with various clinicopathological parameters, including tumour stage

and grade as well as nodal status. *KLK10*-positive CRC tissues of advanced Dukes' stage (C/D), high grade (II/III), and positive nodal status had statistically significantly higher mRNA expression, in comparison with early-stage (A/B), low grade (I) tumours, and negative nodal status (P = 0.036, P = 0.025, P = 0.046, respectively). Cox univariate regression analysis showed that high *KLK10* mRNA expression in CRC patients predicts an increased risk of relapse and death, and Kaplan-Meier survival analysis demonstrated significantly lower DFS and OS rates for *KLK10* mRNA-positive patients. In Cox regression analysis, Dukes' stage, tumour histological grade, and nodal status were shown to constitute significant predictors of patients' survival. However, when the multivariate Cox regression analysis was performed, the unfavourable prognostic value of *KLK10* in terms of DFS and OS was shown to be independent of the Dukes' stage and histological grade of CRC patients.

Overall, our study assigns once more an unfavourable prognostic role for the KLK10 gene in CRC. As already mentioned, it is not the first study associating a member of the KLK family with cancer or KLK10 with CRC. What is of great interest in the specific gene are its opposite alterations in different cancer types. Is it a tumour suppressor class II gene involved in carcinogenesis? Is it a serine protease that is implicated in metastasis through a direct or an indirect cascade and could it serve as a biomarker in the prognosis of cancer patients? Despite the different profiles that have been attributed to the gene, what is common in all studies is its unfavourable prognostic value and on that characteristic our efforts are based. Our lab plans on collecting a larger study group and performing a follow-up study later on that would be essential in establishing KLK10 as novel prognostic biomarker in CRC. Furthermore, serum samples of CRC patients and healthy controls are currently collected in order to evaluate the diagnostic role of KLK10 in the disease. In conclusion, despite the fact that additional studies are required to find the substrates of KLK10, our study suggests that KLK10 mRNA expression status can be used as an unfavourable prognostic biomarker in CRC, either by itself or with other cancer biomarkers.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Commission of the European Community through the INsPiRE project (EU-FP7-REGPOT-2011-1, proposal 284460).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.002.

References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69–90.
- [2] Carrato A. Adjuvant treatment of colorectal cancer. Gastrointest Cancer Res 2008;2:S42-6.
- [3] Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. J Clin Oncol 2003;21:2912–9.
- [4] Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol 2005;23:609–18.
- [5] Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. | Clin Oncol 2008;26:1626–34.
- [6] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 2008;359:1757–65.
- [7] Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med 1994;331:213–21.

- [8] Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. | Clin Oncol 2006;24:5313–27.
- [9] Giaginis C, Giagini A, Theocharis S. Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1): a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of human neoplasia. Histol Histopathol 2009;24:761–76.
- [10] Tsourouflis G, Theocharis SE, Sampani A, Giagini A, Kostakis A, Kouraklis G. Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in colon cancer. Dig Dis Sci 2008;53:1289–96.
- [11] Kontos CK, Papadopoulos IN, Fragoulis EG, Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of L-DOPA decarboxylase in colorectal adenocarcinoma. Br J Cancer 2010;102:1384–90.
- [12] Papagiorgis PC, Zizi AE, Tseleni S, Oikonomakis IN, Sofras L, Patsouris E, et al. Disparate clinicopathological correlations of p53 and Bcl-2 in colorectal cancer. Mol Med Rep 2012;5:377–82.
- [13] Kontos CK, Papadopoulos IN, Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the novel apoptosis-related gene BCL2L12 in colon cancer. Biol Chem 2008;389:1467–75.
- [14] Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. Gastroenterology 2000;119:921–8.
- [15] Ohrling K, Edler D, Hallstrom M, Ragnhammar P. Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. Acta Oncol 2010;49:797–804.
- [16] Kontos CK, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. Clin Chem Lab Med 2012;50:1877–91.
- [17] Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. Nat Rev Cancer 2004;4:876–90.
- [18] Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, et al. A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. Biol Chem 2006;387:637–41.
- [19] Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. Biol Chem 2010;391:505–11.
- [20] Kontos CK, Chantzis D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA predicts short-term relapse in colorectal adenocarcinoma patients. Cancer Lett 2013;330:106–12.
- [21] Talieri M, Mathioudaki K, Prezas P, Alexopoulou DK, Diamandis EP, Xynopoulos D, et al. Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. Thromb Haemost 2009;101:741–7.
- [22] Talieri M, Li L, Zheng Y, Alexopoulou DK, Soosaipillai A, Scorilas A, et al. The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. Br J Cancer 2009;100:1659–65.
- [23] Liu XL, Wazer DE, Watanabe K, Band V. Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. Cancer Res 1996;56:3371–9.
- [24] Kontos CK, Scorilas A. Molecular cloning of novel alternatively spliced variants of BCL2L12, a new member of the BCL2 gene family, and their expression analysis in cancer cells. Gene 2012;505:153–66.
- [25] Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, et al. A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. Biochim Biophys Acta 2005;1755:1–14.
- [26] Luo L, Herbrick JA, Scherer SW, Beatty B, Squire J, Diamandis EP. Structural characterization and mapping of the normal epithelial cell-specific 1 gene. Biochem Biophys Res Commun 1998;247:580–6.
- [27] Luo LY, Grass L, Howarth DJ, Thibault P, Ong H, Diamandis EP. Immunofluorometric assay of human kallikrein 10 and its identification in biological fluids and tissues. Clin Chem 2001;47:237–46.
- [28] Petraki CD, Karavana VN, Luo LY, Diamandis EP. Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2002;50:1247–61.
- [29] Petraki CD, Karavana VN, Revelos KI, Luo LY, Diamandis EP. Immunohistochemical localization of human kallikreins 6 and 10 in pancreatic islets. Histochem J 2002;34: 313–22.
- [30] Mavridis K, Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. Future Oncol 2010;6:269–85.
- [31] Luo LY, Bunting P, Scorilas A, Diamandis EP. Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma? Clin Chim Acta 2001;306:111–8.
- [32] Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Bellino R, van Gramberen M, et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. Cancer Res 2003;63:807–11.
- [33] Shvartsman HS, Lu KH, Lee J, Lillie J, Deavers MT, Clifford S, et al. Overexpression of kallikrein 10 in epithelial ovarian carcinomas. Gynecol Oncol 2003;90:44–50.
- [34] Yousef GM, Polymeris ME, Yacoub GM, Scorilas A, Soosaipillai A, Popalis C, et al. Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer. Cancer Res 2003;63:2223–7.
- [35] Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2005;99:267–77.
- [36] Yousef GM, Borgono CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A, et al. In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. Anticancer Res 2004;24:43–51.
- [37] Talieri M, Alexopoulou DK, Scorilas A, Kypraios D, Arnogiannaki N, Devetzi M, et al. Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. Tumour Biol 2011;32:737–44.
- [38] Goyal J, Smith KM, Cowan JM, Wazer DE, Lee SW, Band V. The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. Cancer Res 1998;58:4782–6.

- [39] Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. Biol Chem 2012;393: 301–17.
- [40] Luo LY, Yousef G, Diamandis EP. Human tissue kallikreins and testicular cancer. APMIS 2003;111:225–32 [discussion 32–3].
- [41] Dhar S, Bhargava R, Yunes M, Li B, Goyal J, Naber SP, et al. Analysis of normal epithelial cell specific-1 (NES1)/kallikrein 10 mRNA expression by in situ hybridization, a novel marker for breast cancer. Clin Cancer Res 2001;7:3393–8.
- [42] Ewan King L, Li X, Cheikh Saad Bouh K, Pedneault M, Chu CW. Human kallikrein 10 ELISA development and validation in breast cancer sera. Clin Biochem 2007;40:1057–62.
- [43] Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, et al. CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression. Cancer Res 2001;61: 8014–21.
- [44] Sidiropoulos M, Pampalakis G, Sotiropoulou G, Katsaros D, Diamandis EP. Downregulation of human kallikrein 10 (KLK10/NES1) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. Tumour Biol 2005;26:324–36.
- [45] Huang W, Zhong J, Wu LY, Yu LF, Tian XL, Zhang YF, et al. Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer. Cancer Lett 2007;251:78–85.
- [46] Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu JF. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290: G1067–74.
- [47] Kheirelseid EA, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. BMC Mol Biol 2010;11:12.
- [48] Fendri A, Kontos CK, Khabir A, Mokdad-Gargouri R, Scorilas A. BCL2L12 is a novel biomarker for the prediction of short-term relapse in nasopharyngeal carcinoma. Mol Med 2011;17:163–71.
- [49] 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;25:402–8.
- [50] Papageorgiou SG, Kontos CK, Pappa V, Thomadaki H, Kontsioti F, Dervenoulas J, et al. The novel member of the BCL2 gene family, BCL2L12, is substantially elevated in chronic lymphocytic leukemia patients, supporting its value as a significant biomarker. Oncologist 2011;16:1280–91.
- [51] Geomela PA, Kontos CK, Yiotakis I, Scorilas A. Quantitative expression analysis of the apoptosis-related gene, BCL2L12, in head and neck squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2013;42:154–61.
- [52] Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. J Natl Cancer Inst 1994;86: 829–35.
- [53] Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. Clin Cancer Res 2004;10:7252–9.

- [54] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012;62:220–41.
- [55] Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulias V, Lianidou ES. Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. Ann Oncol 2009;20:1020–5.
- [56] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, et al. The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3–4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2004;18:362–5.
- [57] Kontos CK, Mavridis K, Talieri M, A.S. Kallikrein-related peptidases (KLKs) in gastrointestinal cancer: mechanistic and clinical aspects. Thromb Haemost 2013;109, http://dx.doi.org/10.1160/TH12-11-0791.
- [58] Luo LY, Grass L, Diamandis EP. Steroid hormone regulation of the human kallikrein 10 (KLK10) gene in cancer cell lines and functional characterization of the KLK10 gene promoter. Clin Chim Acta 2003;337:115–26.
- [59] Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Piccinno R, Rigault de la Longrais IA, et al. Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 2001;7:2372–9.
- [60] Oikonomopoulou K, Li L, Zheng Y, Simon I, Wolfert RL, Valik D, et al. Prediction of ovarian cancer prognosis and response to chemotherapy by a serum-based multiparametric biomarker panel. Br J Cancer 2008;99:1103–13.
- [61] Feng B, Xu WB, Zheng MH, Ma JJ, Cai Q, Zhang Y, et al. Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol 2006;21:1596–603.
- [62] Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. World J Surg 2002;26:767–71.
- [63] Gratio V, Beaufort N, Seiz L, Maier J, Virca GD, Debela M, et al. Kallikrein-related peptidase 4: a new activator of the aberrantly expressed protease-activated receptor 1 in colon cancer cells. Am J Pathol 2010;176:1452–61.
- [64] Gratio V, Loriot C, Virca GD, Oikonomopoulou K, Walker F, Diamandis EP, et al. Kallikrein-related peptidase 14 acts on proteinase-activated receptor 2 to induce signaling pathway in colon cancer cells. Am J Pathol 2011;179:2625–36.
- [65] Chung H, Hamza M, Oikonomopoulou K, Gratio V, Saifeddine M, Virca GD, et al. Kallikrein-related peptidase signaling in colon carcinoma cells: targeting proteinase-activated receptors. Biol Chem 2012;393:413–20.
- [66] Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY. Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. Int J Cancer 1997;71:897–9.
- [67] Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K. Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. Biochemistry 2001;40:15341–8.
- [68] Yoon H, Blaber SI, Debela M, Goettig P, Scarisbrick IA, Blaber M. A completed KLK activome profile: investigation of activation profiles of KLK9, 10, and 15. Biol Chem 2009;390:373–7.

RESEARCH ARTICLE

Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (*KLK10*) in colorectal cancer

Maroulio Talieri · Dimitra K. Alexopoulou · Andreas Scorilas · Dimitris Kypraios · Niki Arnogiannaki · Marina Devetzi · Matina Patsavela · Dimitris Xynopoulos

Received: 16 March 2011 / Accepted: 31 March 2011 / Published online: 12 April 2011 © International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2011

Abstract Kallikrein-related peptidases (KLKs) represent a serine protease family having 15 members. KLK10 is a secreted protease with a trypsin-like activity. The function of KLK10 is poorly understood, although it has been suggested that KLK10 may function as a tumor suppressor gene. In human cancer, *KLK10* gene shows organ-specific up- or down-regulation. Since KLKs are promising tumor biomarkers, the examination of *KLK10* mRNA expression and its association with colorectal cancer (CRC) progression was studied using semi-quantitative PCR. One hundred and nineteen primary CRC specimens were examined for which follow-up information was available for a median period of 29 months (range, 1–104 months).

M. Talieri (⊠) • D. K. Alexopoulou • M. Devetzi
Department of Cellular Physiology, "G. Papanicolaou" Research
Center of Oncology, "Saint Savvas" Cancer Hospital,
171, Alexandras Avenue,
Athens 11522, Greece
e-mail: talieri@agsavvas-hosp.gr

M. Talieri e-mail: litsa.talieri@yahoo.com

A. Scorilas Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15701, Greece

D. Kypraios · M. Patsavela · D. Xynopoulos
Department of Gastroenterology, "Saint Savvas" Hospital,
171 Alexandras Ave.,
Athens 11522, Greece

N. Arnogiannaki Department of Pathology, "Saint Savvas" Hospital, 171 Alexandras Ave., Athens 11522, Greece *KLK10* expression was found to be significantly associated with TNM stage (p=0.028). Cox proportional hazard regression model using univariate analysis revealed for the first time that high status *KLK10* expression is a significant factor for disease-free survival (DFS; p=0.002) and overall survival (OS; p=0.026) of patients. Kaplan–Meier survival curves demonstrated that *KLK10* expression of low status is significantly associated with longer DFS (p=0.001) as well as OS (p=0.021), suggesting that *KLK10* gene expression may be used as a marker of unfavorable prognosis for CRC. As the epigenetics of cancer are unraveled, KLK10 may represent not only a novel biomarker, but also a promising future therapeutic target for the disease.

Keywords Cell lines \cdot Colorectal cancer \cdot Kallikrein-related peptidase $10 \cdot KLK10 \cdot$ Tumor markers

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of malignancy in the western countries and constitutes the second leading cause of death from cancer worldwide [1]. CRC is a complex disease and the serum-based tumor markers used for the diagnosis of CRC have a limited role due to lack of specificity and sensitivity. As a consequence, new biomarkers are needed and the family of proteases provides good candidates, since proteases have long been associated with cancer progression because of their ability to degrade extracellular matrices facilitating invasion and metastasis.

Serine proteases have several functions in tumor development, including cell growth regulation, invasion and angiogenesis. Among all serine proteases within the human

genome, the kallikrein-related peptidases (KLKs) cluster is the largest [2, 3]. This cluster includes 15 genes located on chromosome 19q13.4. KLKs play important roles in different physiologic processes such as regulation of cell growth, and differentiation, tissue remodeling, angiogenesis, skin desquamation, human semen liquefaction, dental enamel formation, neuro-degeneration, inflammation, induction of apoptosis, cervico-vaginal physiology, and vascularization [4]. Furthermore, KLKs help in the infiltration of immune cells through the skin and bloodbrain barrier, by catalyzing the production of antimicrobial peptides by proteolytic activation [5]. KLK genes and tissue co-expression patterns led to the hypothesis that the encoded proteins could participate in proteolytic cascades [4]. Abnormal regulation of KLKs interferes with different stages of cancer growth, including tumor differentiation, angiogenesis, and metastasis.

KLKs have been widely examined as cancer biomarkers, mostly in steroid-hormone-regulated cancers, since steroid hormones play an important role in the regulation of kallikrein transcription [3, 6]. However, recent studies indicate that other mechanisms probably cooperate in KLK regulation, including the use of alternative promoters [7], the production of multiple splice variants [8] or epigenetic alterations, like DNA methylation and histone modification [9]. Kallikrein-related peptidases may also be involved in cancer pathogenesis by degrading extracellular matrix proteins or promoting angiogenesis [2]. It has been shown that KLKs, like KLK2, degrade insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in vitro. IGFBP-3 forms complexes with IGFs, preventing them from binding to their receptors and stimulating cell proliferation and survival [10]. KLK family members have been reported to be promising diagnostic/prognostic biomarkers for several cancer types, including breast, ovarian, prostate, and testicular carcinomas [2]. Additionally, studies in nonhormone-regulated cancers have been conducted concerning gastric, lung, pancreatic, head and neck, renal and hepatocellular carcinoma as well as leukemia and their relation with KLKs [11]. Furthermore, we have shown previously, the use of a multiparametric KLKs panel for colorectal cancer at the protein level [12], as well as the over-expression of KLK7 in brain tumors [13].

The human kallikrein-related peptidase 10 gene (KLK10; also known as normal epithelial cell-specific 1 gene) was cloned by subtractive hybridization between normal human mammary epithelial cells and their radiation-transformed tumorigenic derivatives. Down-regulation of KLK10 mRNA expression in radiation-transformed cells led to the isolation of that gene [14]. KLK10 is expressed in many tissues such as colon, fallopian tube, prostate, testis, epididymis, pituitary, endometrium, ovary, breast, lung, kidney, salivary gland,

skin, and in various biological fluids including cerebrospinal fluid, milk of lactating women, seminal plasma, and amniotic fluid [15].

KLK10 gene contains six exons and five introns and codes for a secreted protein. Alternative splicing of this gene results in multiple transcript variants, encoding the same protein. Three of those splice variants are experimentally verified and seven more were predicted by Yousef et al. [16]. KLK10 has been shown to function as a tumor suppressor gene in breast cancer since its over-expression in nude mice was shown to suppress tumor formation. Moreover, stable expression of *KLK10* in the KLK10-negative MDA-MB-231 breast cancer cell line suppressed its oncogenicity [17].

The expression of KLK10 is regulated by steroid hormones, which implies that KLK10 plays an important role in the initiation and progression of endocrine-related cancers [18]. KLK10 was identified as a target of methylation and silencing in a significant number of tumors, suggesting that inactivation of this gene is a frequent event in the process of tumorigenesis [19]. Methylation sites occur within exons 2-4, especially in exon 3, that are CpG rich and not in the promoter region, which is CpG poor. Furthermore, it was shown that most tumor cell lines are able to support full or partial transcription from KLK10 promoter, suggesting that another *cis*-acting mechanism is responsible for KLK10 loss of expression. Additionally, KLK10 exon 3 methylation has been shown to provide prognostic information in early breast cancer [20]. Genomewide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allowed identification of epigenetically repressed molecular pathways and among the genes identified as aberrantly methylated was KLK10 [21].

KLK10 is down-regulated in breast, prostate, testicular, non-small cell lung cancer, renal cell carcinoma and over-expressed in ovarian cancer, uterine papillary serous carcinoma, and pancreatic ductal adenocarcinoma, as well as oral squamous cell carcinoma [19].

So far, KLK10 has been examined in gastric and colorectal carcinomas [22] and was found to be upregulated leading to prediction of poorer prognosis of patients, nevertheless follow-up information was not available in this study. In the present study, the expression of KLK10 mRNA was determined by semi-quantitative RT-PCR in a series of five human colon cancer cell lines. We also analyzed the expression of KLK10 mRNA in a cohort of 119 colorectal tumors (for 63 of which paired normal colon mucosa was also examined) and associated it with other clinical and pathological parameters. In addition, we analyzed the expression of KLK10 in 10 adenomas. Follow-up information revealed experimentally for the first time that KLK10 mRNA expression is associated with poor prognosis of CRC patients.

Materials and methods

Cell lines and culture conditions

Human colon cancer cell lines DLD1, HT29, LS180, HCT116 (cultured in RPMI 1640), and Caco-2 (cultured in DMEM) used in this study, were obtained from American Tissue Culture Collection. The culture media were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and supplemented with 10% fetal bovine serum as well as 40 mg/L Gentamicin sulfate. Cells were grown to 80% confluence and harvested for total RNA extraction.

Study group

Tumor specimens of our study were acquired from 119 patients who underwent surgery for primary colon cancer at "Saint Savvas" Oncologic Hospital of Athens. For 63 out of the 119 patients, their paired normal colon mucosa, sufficiently separated from the tumors (at least 10 cm), were also available as control. Cancerous and normal tissues were evaluated by eosin-hematoxylin staining of paraffin sections. All cases under study came from total surgical removal. No chemotherapy or radiotherapy was administered before surgery. Informed consent was obtained from all patients. The samples were followed by an updated database containing clinical and histological information about the tumor (tumor size, grade, stage, etc.) that was used for the statistical analysis of the results. Patients' age ranged from 31 to 92 years with a mean of 67.45±1.08 years. Follow-up information (median followup period, 29 months; range, 1-104 months), which was available for 99 patients, showed that 39 (39.4%) of them had relapsed and 30 (30.3%) had died. Twelve adenomas of colon mucosa (six of which had severe dysplasia) were also studied for KLK10 mRNA expression, but were not included in the survival analysis. The staging was performed according to the TNM staging system, as introduced by the American Joint Committee on Cancer. Two time-to-event outcomes after surgery were recorded: disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). DFS in each case was defined as the time interval between the date of surgical removal of the primary cancer and the date of the first documented evidence of relapse. OS was defined as the time interval between the date of surgery and the date of death, or the date of last follow-up for those who were alive at the end of the study.

RNA isolation-semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from CRC tissue and cell lines, using Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Tissue and

cancer cell line RNA integrity were tested by PCR amplification of *GAPDH* housekeeping gene.

Two micrograms of total RNA were reverse-transcribed into first-strand cDNA using SuperscriptTM preamplification system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. In order to optimize PCR conditions, different quantities of cDNA (0.007–2 μ l) from DLD1 cell line were amplified under exponential, non-saturating conditions, for 27, 31, 34, and 37 cycles to confirm that amplification was in the linear range and determine the appropriate cycle number for semiquantitative PCR, as we described previously [23].

For the amplification of KLK10, a pair of gene-specific primers spanning four coding exons to avoid contamination by genomic DNA was used. The forward primer anneals to exon 3 and the reverse primer anneals to exon 6 [forward 5'-TGG CAG GTC TCG CTC TTC AAC-3'; reverse 5'-AAC ACC CCA CGA GAG GAT GCC-3' (567 bp)], detecting the full-length KLK10 mRNA, corresponding to all three experimentally verified by Yousef et al. splice variants. For the amplification of GAPDH, the primers used were: forward 5'-CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT-3'; reverse 5'-TGA CAA GCT TCC CGT TCT CA-3' (223 bp). After optimization, PCR was carried out in a 20-µl reaction mixture containing 500 ng of cDNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl2, 0.5 µM each deoxynucleoside triphosphates, 0.25 µM of each primer, and 2 units of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) on a thermal cycler (MJ, Research, USA). The cycling conditions for KLK10 were: a denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 34 cycles of 94°C for 30 s, 63°C for 45 s and 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 7 min. The cycling conditions for GAPDH were: a denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 28 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 8 min. Equal amounts of PCR products for KLK10 and GAPDH genes were electrophoresed on 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining (Fig. 1).

Following densitometric measurements of the band intensities using Gel Logic 100 Imaging System and 1D Image Analysis Software, version 3.6 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA), the ratio of *KLK10/GAPDH* band intensity was calculated. Based on this ratio, *KLK10* expression was characterized as low or high compared with the ratio for non-cancer samples. A cut-off value of the mean ratio for non-cancer samples +2SD was calculated. *KLK10* expression in samples with ratios higher than this value was considered as high, whereas *KLK10* expression in samples with ratio samples with ratio less than or equal to this value, was characterized as low, as we described previously [23]. Expression analysis was performed twice for each sample. The identity of the

Fig. 1 a Ethidium bromidestained agarose gel of the RT-PCR for KLK10 and GAPDH (as an internal control) of colon cancer cell lines HT29, LS180, HCT116, DLD1, Caco-2 (NC negative control, M molecular weight marker). b Ethidium bromide-stained agarose gel of the RT-PCR for KLK10 and GAPDH (as an internal control) of representative colon cancer tissue samples (Ca) and their corresponding normal colon mucosa (N; NC negative control, M molecular weight marker, DLD1 cell line positive control)



PCR products was verified by sequencing, with an automated DNA sequencer.

Ethics

Agreement of the Institute's Ethics Committee for the scientific analysis of the tumor tissues had been obtained as well as patients' written informed consent.

Statistical analysis

Associations between *KLK10* status and qualitative variables were analyzed using the chi-square (χ^2) test or the Fisher's exact test, where appropriate. A Cox proportional hazard regression model was developed to evaluate the association (i.e., hazard ratio and its confidence interval) between the potential prognostic marker and DFS or OS. This analysis was conducted at both univariate and multivariate levels. Survival analysis was performed by constructing Kaplan–Meier DFS and OS curves for patients with *KLK10* status low or high whereas the Wilcoxon signed ranks test was used to compare survival between subgroups of patients. DFS is defined as the time interval between the date of surgery and the date of identification of recurrent or metastatic disease. OS is defined as the time interval between the date of surgery and the date of death.

Results

Expression of KLK10 in cell lines

Five established human colon cancer cell lines were tested for *KLK10* mRNA expression. Interestingly, four human

colorectal cancer cell lines that were tested, namely HT29, LS180, HCT116, and DLD1, seem to express high levels of *KLK10* and the fifth (Caco-2) does not. Human colon cell line DLD1 was used as positive control for the study.

Tissue KLK10 expression analysis

The results of KLK10 expression in colon cancer cell lines and a representative group of samples are shown in Fig 1a, b. GAPDH (which was used as an internal control) showed a consistent pattern of expression in all samples, indicating the integrity of RNA, as well as equal loading. KLK10 PCR product from DLD1 cell line and one highly expressing cancer tissue sample, were sequenced and KLK10 sequences were shown to be identical to those reported previously [14]. Table 1 shows patient and tumor characteristics of the study. Fifty out of 119 cancer (42%) and ten out of 63 non-cancer tissues (15.9%) were characterized as KLK10 status high. Seven out of 12 adenomas (58.3%) showed high KLK10 expression. Chisquare test showed that high status KLK10 expression frequency is significantly higher in cancerous than in normal tissues (p < 0.001; Table 2).

Association of *KLK10* expression status with clinical and pathological variables

Statistical analysis of the results obtained, using χ^2 and Fisher's exact tests, indicated that *KLK10* expression is statistically significantly associated with TNM stage (p= 0.028; Table 3), meaning that high *KLK10* expression is significantly more often found in advanced and less differentiated CRCs. However, using the Spearman's non-parametric analysis, no significant association was
Table 1Distribution ofnumerical variables of thestudy (patient and tumorcharacteristics)

Variable	Mean±SE	Range	Quartiles (median)			
			25	50	75	
Patient's age (years; $n=107$)	67.54±1.08	31–92	60.0	70.0	76.0	
Tumor size (cm; $n=105$)	4.49 ± 0.17	1.80-12.00	3.50	4.20	5.10	
DFS (months; $n=102$)	23.39±2.04	1.0-101.0	12.0	24.5	33.0	
OS (months; $n=102$)	$30.8 {\pm} 1.90$	1.0-104.0	21.0	29.0	35.0	

found between *KLK10* expression and other clinical parameters, such as nodal status, tumor grade or Duke's stage (Table 3).

Association of KLK10 status with DFS and OS of patients

Follow-up information (median follow-up period, 29 months; range, 1-104 months) was available for 96 patients and included survival status (alive or deceased) and disease status (disease-free or recurrence/metastasis), along with the dates of the events and cause of death, if known. During respective follow-up period, 39 patients (39.4%) had relapsed and 30 patients (30.3%) had died. Univariate analyses of KLK10 expression with regard to DFS and OS, using the Cox proportional hazard regression model, revealed that high status KLK10 expression is a significant prognostic factor for DFS (HR=2.78, p= 0.002) as well as OS (HR=2.34, p=0.026). Multivariate analysis of KLK10 expression, adjusted for Duke's stage and tumor grade, showed significant association with DFS, although with low potential (p=0.045). The same multivariate analysis revealed that patients having status high KLK10 gene expression showed 2.46 times higher probability (HR=2.46; 95% CI=1.01-6.09) to relapse (Table 4). Survival curves determined by the Kaplan-Meier method for DFS and OS, demonstrated that KLK10 expression of low status is significantly associated with longer DFS (p < 0.001; Fig. 2) as well as OS (p = 0.021; Fig. 3).

 Table 2 Associations between KLK10 expression status and colon tissue status

Variable	Total	No. of patients	p value ^a		
		<i>KLK10</i> status (low)	<i>KLK10</i> status (high)		
Non-cancer	63	53 (84.1)	10 (15.9)		
Adenomas Cancer	12 119	5 (41.7) 69 (58.0)	7 (58.3) 50 (42.0)	< 0.001	

^a Chi-square test

Discussion

In Europe and the USA, the number of new colorectal cancer cases approximates 500,000 on a yearly basis. Almost half of those patients will develop metastatic colorectal cancer disease [24]. For early stage, CRC patients the estimated 5-year survival rate is 91%, compared with only 6% for late stage disease. These data highlight the need for new biomarkers of CRC incidence, progression, and recurrence.

Kallikrein-related peptidases have been implicated in cancer progression and have been proposed as promising cancer biomarkers. KLK10 is a member of the human kallikrein gene family and encodes for a secreted serine protease with trypsin-like enzymatic activity. Feng et al. [22] analyzed the expression of KLK10 in a relatively small number of colorectal samples (63) and found that it is upregulated, but they did not correlate the expression to disease outcome. In the present work, we studied the mRNA expression of the full-length transcript of KLK10 and its association with CRC progression for 119 patients (for 63 of which paired normal colon mucosa was also

 Table 3 Associations between KLK10 expression status and other clinical and pathological variables

Variable	Total	Fotal No. of patients (%)			
		<i>KLK10</i> status (low)	<i>KLK10</i> status (high)		
Nodal status					
Negative	40	24 (60.0)	16 (40.0)	0.31	
Positive	57	28 (49.1)	29 (50.9)		
Tumor grade	e				
I/II	40	24 (60.0)	16 (40.0)	0.30	
III/IV	56	27 (48.2)	29 (51.8)		
TNM stage					
I/II	45	32 (71.1)	13 (28.9)	0.028	
III/IV	41	19 (46.3)	22 (53.7)		
Duke's stage	e				
A/B	36	25 (69.4)	11 (30.6)	0.08	
C/D	48	24 (50.0)	24 (50.0)		

^a Fisher's exact test

Table 4 Associations between <i>KLK10</i> and disease-free and overall survival	Variable (KLK10)	Disease	e-free survival		Overall survival			
		HR ^a	95% CI ^b	p value	HR ^a	95% CI ^b	p value	
	Univariate analysis (<i>n</i> =96)							
	Status (low)	1.00			1.00			
	Status (high)	2.78	1.44-5.37	0.002	2.34	1.11-4.98	0.026	
	Duke's stage (ordinal)	2.68	1.57-4.56	< 0.001	2.31	1.29-4.13	0.004	
"Hazard ratio (HR) estimated	Grade (ordinal)	3.14	1.82-5.42	< 0.001	2.33	1.30-4.18	0.005	
regression model	Multivariate analysis ^c $(n=62)$							
^b Confidence interval of the	Status (low)	1.00			1.00			
estimated HR	Status (high)	2.46	1.01-6.09	0.045	1.78	0.67-4.74	0.24	
^c Multivariate models were	Duke's stage (ordinal)	1.57	0.54-4.59	0.41	1.69	0.58-4.91	0.33	
adjusted for patient stage and tumor grade	Grade (ordinal)	1.62	0.53-4.92	0.39	1.24	0.39–3.88	0.71	

available). The percentage of cancer samples expressing status high levels of KLK10 was higher than that of their matching normal colorectal mucosa (p < 0.001). The discrepancy noticed for the adenomas showing slightly higher percentage of KLK10 status high expression than the percentage of cancerous tissues, may be attributed to limited number of adenoma samples. Furthermore, six out of 12 adenomas examined, were tubulovillous with foci of severe dysplasia of the epithelium (carcinoma in situ), without invasion of the stalk and 4 had moderate dysplasia. In our study, small percentage (15.9%) of normal colon mucosa samples showed KLK10 expression status high, in contrast to previous studies showing negative (both in the protein and mRNA level) [25] or moderate KLK10 expression [26], but each of the previous studies examined only one normal colon mucosa sample. Nevertheless, the present work is in line with

Petraki et al. [27], showing positive KLK10 immunostaining in the mucosa of the different regions of normal colon. Current work relating *KLK10* expression in CRC to unfavorable prognosis complements and extends the study by Feng et al. [22] showing up-regulation of *KLK10* in CRC.

The evidence presented here, showing that *KLK10* is differentially expressed during progression of colorectal cancer, is in accordance with previous findings regarding cancer progression in non-steroid-hormone-regulated tissues [6] and suggests that, since colon is a steroid-hormone-independent tissue, there may be an alternative regulation mechanism for this gene. One mechanism of this kind may be the use of alternative promoters, harboring tissue-specific elements, directing their expression for production of tissue or disease-specific transcripts, as proposed by Dong et al. [28]. Another possible mechanism is DNA



Fig. 2 Kaplan–Meier curve for DFS of patients with *KLK10* status low and *KLK10* status high CRC tumors



Fig. 3 Kaplan–Meier curve for OS of patients with *KLK10* status low and *KLK10* status high CRC tumors

methylation. Cancer cells display two distinct patterns of DNA methylation:hypermethylation, occurring frequently in specific promoter regions, and global hypomethylation. Both play important roles in tumorigenesis. Indeed, early studies pointed to an overall decrease in the 5methylcytosine content of cancer genomes. The hypermethylation consistently observed in CpG islands represents a change in 5-methylcytosine distribution across the genome rather than an overall increase in the total amount of methylation [29]. KLK10 functions as a tumor suppressor in breast cancer [17] and its low expression is regulated by DNA methylation [30]. KLK10 is proven to be downregulated by CpG island hypermethylation in hepatocellular carcinoma, non-small cell lung cancer, breast, prostate, testicular, ovarian cancer, and acute lymphoblastic leukemia [19]. Kioulafa et al. [20], showed that KLK10 silencing, due to exon 3 methylation, deactivates its tumor suppressor role and thus contributes possibly to shorter survival of breast cancer patients. However, KLK10 was found to be upregulated in colon cancer, ovarian cancer, uterine papillary serous carcinoma, pancreatic ductal adenocarcinoma, and oral squamous cell carcinoma, suggesting that KLK10 has distinct expression patterns and serves various physiological functions in tumorigenesis [19].

In conclusion, the present data suggest that *KLK10* gene expression may be used as a marker of unfavorable prognosis for colon cancer patients. Studies on the physiological function of KLK10 in normal colon will shed more light into the role of this enzyme in cancer and other diseases. KLK10 may represent not only a novel biomarker, but also a promising future therapeutic target for the disease.

Conflicts of interest None

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2008;58:71–96.
- 2. Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human kallikreins in cancer. Nat Rev Cancer. 2004;4:876–90.
- 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;31:407–46.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP. Funcional roles of human kallikrein-related peptidases. J Biol Chem. 2009;284:32989– 94.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G. Kallikrein-related peptidases: bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. Biol Chem. 2010;391:321–31.
- 6. Paliouras M, Borgono C, Diamandis E. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. Cancer Lett. 2007;249:61–79.
- 7. Christophi GP, Isackson PJ, Blaber S, Blaber M, Rodriquez M, Scarisbrick IA. Distinct promoters regulate tissue-specific and

differential expression of kallikrein 6 in CNS demyelinating disease. J Neurochem. 2004;91:1439–49.

- Pampalakis G, Diamandis E, Sotiropoulou G. The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers. Biol Chem. 2006;387:795–9.
- Emami N, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: a road under construction. Clin Chim Acta. 2007;381:78–84.
- Hekim C, Riipi T, Weisell J, Narvanen A, Koistinen R, Stenman U-H, et al. Identification of IGFBP-3 fragments generated by KLK2 and prevention of fragmentation by KLK2-inhibiting peptides. Biol Chem. 2010;391:475–9.
- Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. Biol Chem. 2010;391(5):505–11.
- Talieri M, Li L, Zheng Y, Alexopoulou DK, Soosaipillai A, Scorilas A, et al. A multiparametric tissue kallikrein-related peptidase panel for colorectal cancer. Br J Cancer. 2009;100:1659–65.
- Prezas P, Scorilas A, Yfanti Ch, Viktorov P, Agnanti N, Diamandis EP, et al. Human tissue kallikreins 7 and 8 gene expression in intracranial tumors: a clinical study in Greece. Biol Chem. 2006;387:613–8.
- Luo L, Herbrick JA, Scherer SW, Beatty B, Squire J, Diamandis EP. Structural characterization and mapping of the normal epithelial cellspecific 1 gene. Biochem Biophys Res Commun. 1998;247:580–6.
- Luo LY, Grass L, Howarth DJC, Thibault P, Ong H, Diamandis EP. Immunofluorometric assay of human kallikrein 10 and its identification in biological fluids and tissues. Clin Chem. 2001;47:237–46.
- Yousef GM, White NM, Michael IP, Cho JC, Robb JD, Kurlender L, et al. Identification of new splice variants and differential expression of the human kallikrein 10 gene, a candidate cancer biomarker. Tumour Biol. 2005;26:227–35.
- Goyal J, Smith KM, Cowan JM, Wazer DE, Lee SW, Band V. The Role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. Cancer Res. 1998;58:4782–6.
- Luo LY, Grass L, Diamandis EP. Steroid hormone regulation of the human kallikrein 10 (KLK10) gene in cancer cell lines and functional characterization of the KLK10 gene promoter. Clin Chim Acta. 2003;337:115–26.
- Zhang Y, Song H, Miao Y, Wang R, Chen L. Frequent transcriptional inactivation of kallikrein 10 gene by CpG island hypermethylation in non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 2010;101:934–40.
- Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulias V. Lianidou ES (2009) kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. Ann Oncol. 2009;20:1020–5.
- Tong WG, Wierda WG, LinE KS-Q, Bekele N, Estov Z, Wei Y, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. Epigenetics. 2010;5:499–508.
- 22. Feng B, Xu WB, Zheng MH, Ma JJ, Cai Q, Zhang Y, et al. Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21:1596–603.
- Talieri M, Mathioudaki K, Prezas P, Alexopoulou DK, Diamandis EP, Xynopoulos D, et al. Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. Thromb Haemost. 2009;101(4):741–7.
- Benson III AB, Desch CE, Flynn PJ, et al. Update of American Society of Clinical Oncology colorectal cancer surveillance guidelines. J Clin Oncol. 2000;18:3586–8.
- 25. Shaw J, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. Clin Chem. 2007;53:1423–32.

- Liu X-L, Wazer DE, Watanabe K, Band V. Identification of a novel serine protease-like gene, the expression of which is down-regulated during breast cancer progression. Cancer Res. 1996;56:3371–9.
- Petraki CD, Karavana VN, Luo L-Y, Diamandis EP. Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. J Histochem Cytochem. 2002;50:1247–61.
- 28. Dong Y, Matigian N, Harvey TJ, Samaratunga H, Hooper JD, Clements JA. Tissue-specific promoter utilisation of the

kallikrein-related peptidase genes, KLK5 and KLK7, and cellular localisation of the encoded proteins suggest roles in exocrine pancreatic function. Biol Chem. 2008;389:99–109.

- 29. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007;128:683–92.
- 30. Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, et al. CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/ kallikrein 10 expression. Cancer Res. 2001;61:8014–21.

www.bjcancer.com

The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer

M Talieri^{*,1}, L Li², Y Zheng², DK Alexopoulou¹, A Soosaipillai³, A Scorilas⁴, D Xynopoulos⁵ and EP Diamandis³

¹Department of Cellular Physiology, 'G. Papanicolaou' Research Center of Oncology, 'Saint Savvas' Hospital, 171 Alexandras Avenue, Athens 11522, Greece; ²Department of Biostatistics and Biomathematics, Fred Hutchinson Cancer Research Center, North Seattle WA 98109-1024, USA; ³Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital and University of Toronto, 60 Murray Street, 6th Floor, Room L6-2001, Toronto, ON, Canada M5T 3L9; ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis, Athens 15701, Greece; ⁵Department of Gastroenterology, 'Saint Savvas' Hospital, 171 Alexandras Avenue, Athens 11522, Greece

Several members of the human tissue kallikrein-related peptidase (KLK) family are emerging cancer biomarkers. The aim of this study was to analyse the expression of a panel of KLKs in colorectal cancer and to find out if the multiparametric combination of them can increase the accuracy of prediction of patients survival beyond the traditional clinical information. Nine KLKs (KLK5-8, KLK10, KLK11, KLK13-15) were measured using ELISA assays in cytosolic extracts of 122 colon cancer tissues and their nearby normal mucosa, obtained during surgery. The mean levels of almost all KLKs in tumour tissues were significantly different from their counterparts of normal tissue (P < 0.0001). KLK 5, 6, 7, 13, 14 were significantly associated with overall survival in univariate analysis, but after adjusting for age, TNM and differentiation stage, only KLK5 (HR: 1.24 (95% Cl: 1.05 - 1.47)), KLK7 (HR: 1.57 (95% Cl: 1.04 - 2.37)) and KLK14 (HR: 1.43 (95% Cl: 1.05 - 1.94)) remained significant. Addition of a panel of selected KLK markers to clinical parameters gave an increment in AUC of 0.86 beyond the clinical factors at year 1, showing that it can increase the accuracy of prediction of overall survival beyond the traditional clinical information, particularly the short-term (1 year) survival after surgery. *British Journal of Cancer* (2009) **100**, 1659–1665. doi:10.1038/sj.bjc.6605033 www.bjcancer.com

Keywords: colorectal cancer; ELISA; kallikrein-related peptidases; KLKs; tumour markers

Colorectal cancer (CRC) is the cause of half a million deaths worldwide every year. There are also about 1 million new cases diagnosed annually, making it the third most common type of cancer in the world, despite the fact that it mostly affects populations of western lifestyle (American Cancer Society, 2005; McCracken et al, 2007). The variation in cancer survival within the same countries depends on the socio-economic level of the people affected (Coleman et al, 2008). In the past few years, the death rate caused by CRC has been reduced, mainly because of increased screening based on serum markers, such as carcinoembryonic antigen (Sturgeon, 2002), endoscopic technology and improved treatment of the disease (Duffy et al, 2003). Tissue-based markers have been proposed as possible prognostic markers and predictors of response to treatment. Such markers include thymidilate synthase, the transcription factor p53, the oncogene K-ras and the adenomatous polyposis coli gene. Nevertheless, there are remarkable contradictions in the literature with regard to the relation between common CRC genes and prognosis (Anwar et al, 2004). Therefore, extensive research is needed to blend current endoscopic and surgical technology with specific molecular markers that will discriminate subgroups of patients for prognosis or specific targeted therapies.

Proteases may represent good diagnostic/prognostic biomarkers, as they are involved in cancer progression (Duffy, 1996). Human tissue kallikrein-related peptidases (KLKs) are a family of 15 serine proteases with diverse physiological functions. KLKs play important roles in different physiologic processes such as regulation of cell growth and differentiation, tissue remodelling, angiogenesis (Borgono and Diamandis, 2004), skin desquamation, human semen liquefaction (Pampalakis and Sotiropoulou, 2007), dental enamel formation (Lu et al, 2008), neuro-degeneration (Scarisbrick et al, 2008), inflammation (Oikonomopoulou et al, 2007), cervico-vaginal physiology (Shaw and Diamandis, 2008), and vascularisation (Smith et al, 2008). So far, KLKs have been widely examined as cancer biomarkers, mostly in steroidhormone-regulated cancers (Emami and Diamandis, 2007), because steroid hormones play an important role in the regulation of kallikrein transcription (Paliouras et al, 2007). Many members of the kallikrein family have been reported to be promising diagnostic/prognostic biomarkers for several cancer types, including breast, ovarian, prostate and testicular carcinomas (Borgono and Diamandis, 2004). However, recent studies indicate that other mechanisms probably cooperate in KLK regulation, including the use of alternative promoters (Christophi et al, 2004), the production of multiple splice variants (Pampalakis et al, 2006) or epigenetic alterations, like DNA methylation and histone modification (Pampalakis et al, 2004; Emami and Diamandis, 2007). Kallikrein-related peptidases may also be involved in cancer pathogenesis by degrading extracellular matrix proteins or promoting angiogenesis (Borgono and Diamandis, 2004). Few

^{*}Correspondence: Dr M Talieri; E-mail: talieri@agsavvas-hosp.gr Received 19 December 2008; revised 18 March 2009; accepted 19 March 2009; published online 14 April 2009



1660

studies in non-hormone regulated cancers have been conducted so far concerning lung (Petraki *et al*, 2006; Planque *et al*, 2008), pancreatic (Yousef *et al*, 2004; Dong *et al*, 2008), head and neck (Chung *et al*, 2004) and brain (Prezas *et al*, 2006b) cancers and leukaemia (Roman-Gomez *et al*, 2004) and their relation with KLKs. Until now, only KLK6 and KLK10 have been examined as biomarkers in CRC by Ogawa *et al* (2005) and Feng *et al* (2006) using real time PCR and by Yousef *et al* (2004) using *in silico* analysis. The aim of this study was to evaluate whether human tissue KLKs, alone or in combination with established clinical and pathological variables in a multiparametric model, can be used as potential prognostic markers for CRC patients.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples

Primary colorectal cancer specimens from 122 patients, collected at the Oncologic Hospital of Athens 'Saint Savvas', were staged according to Dukes' operative staging system. Paired normal colon mucosa, sufficiently separated from the tumours, was available for all cancer samples. Both cancer and normal samples were histologically confirmed by eosin-haematoxylin staining. Investigations were carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Histologic diagnoses and grading of tumours were made based on the revised World Health Organization (WHO) classification for colon tumours. All cases under study came from complete surgical excision of the tumour. No chemotherapy or radiotherapy was administered before surgery. Clinical and pathological characteristics such as age, tumour size, TNM stage, tumour grade and differentiation, were available for all patients. Two time-to-event outcomes after surgery were recorded: Disease-Free Survival (DFS) and Overall Survival (OS). DFS in each case was defined as the time interval between the date of surgical removal of the primary cancer and the date of the first documented evidence of relapse. OS was defined as the time interval between the date of surgery and the date of death, or the date of last follow up for those who were alive at the end of the study.

Ethics

Agreement of the Institute's Ethics Committee for the scientific analysis of tumour tissues, as well as patients' written informed consent had been obtained.

Preparation of colon tissue extracts

Upon collection, colon tissues were snap frozen in liquid nitrogen and subsequently transferred to -80° C until extraction. Frozen samples (0.2 g) were pulverised using a Mikro-Dismembrator – U (Sartorius, Goettingen, Germany) and processed as described earlier (Shaw and Diamandis, 2007). Protein concentration of the extracts was determined (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA).

Immunofluorometric ELISA measurement of kallikreins in colorectal cytosolic extracts

Concentration of KLKs was measured with a non-competitive immunoassay, described earlier (Shaw and Diamandis, 2007; Planque *et al*, 2008). Two types of configurations of ELISA were used in this study, using either monoclonal-monoclonal (KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK13) or monoclonal-polyclonal (KLK11, KLK12, KLK14) combinations. All ELISAs were tested negative for cross-reactivity against other KLKs.

Statistical methods

Marker measurements were logarithmically transformed due to skewness in the distributions. The differentiation in marker expression in paired tumour and normal tissues was evaluated by the paired *t*-test on the transformed values. The relationships between biomarkers and tumour and patient characteristics were examined with the Kruskal-Wallis test. Spearman's rank correlation coefficient was used to assess the correlations among biomarkers (Supplementary Table S1 along with hierarchical clustering based on Spearman's correlation). Cox regression model was applied to evaluate the hazard ratios (HR) of biomarkers on DFS or OS applying univariate or multivariate analyses. Clinical variables, including age, tumour size, TNM stage, grade and tumour differentiation were adjusted in multivariate Cox proportional hazards models. Both HRs and 95% confidence interval (95% CI) were calculated on log-transformed biomarkers and were represented with two-sided P-values. In this study, to further evaluate the prognostic usefulness of the markers, we used a receiver operating characteristic (ROC) curve (Heagerty et al, 2000). ROC analysis was first conducted on individual markers and then on their combination to explore the possibility of a marker panel to lead to improved performance. We used an algorithm that gives a single composite score in the sense that the ROC curve is maximised at every threshold value. To get a prognostic index we built marker panels at year 1 and 5 after the surgery using a weighted logistic regression that is appropriate for censored failure time (Zheng et al, 2006) with the stepwise selection. The predictive accuracy of composite scores was evaluated based on a re-sampling algorithm to correct for potential overfitting when deriving the combinatory rule (Supplementary Figure S1). Specifically, we randomly split data into a training set and a validation set. The training set included two thirds of the observations, and the validation set included one third of the observations. Using the training set, we first operated a model selection from which the final selected model gave rise to the linear combination rule. We then, calculated two ROC curves for the linear score: one with using data from the training set and the other using the validation set. The vertical differences between the two ROC curves gave the overestimation of the sensitivities at a given specification. The whole procedure was repeated 100 times, and these differences were averaged to yield an estimate of the expected overestimation. We present both the original ROC curves and the ROC curves that are corrected for overestimation. All analyses were done using Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and S-plus 7.0 software (Insightful Corp., Palo Alto, CA, USA).

RESULTS

Distribution of kallikreins between colon cancer and its paired normal tissues

To determine the clinical utility of the kallikrein family as potential tumour markers for colorectal cancer, the expression profile of several members of the family was examined by immuno-fluorometric ELISA assays, previously developed and validated (Dorn *et al*, 2007; Shaw and Diamandis, 2007; Planque *et al*, 2008). The detection limit was $0.05 \text{ mg}l^{-1}$ for KLK5, KLK6, KLK10, KLK13, KLK14 and KLK15, but only $0.2 \text{ mg}l^{-1}$ for KLK7, KLK8 and KLK11. Table 1 shows the distribution of numerical variables of the study. The differential expression of KLK5-8, KLK10, KLK11 and KLK13-15 was evaluated by the paired *t*-test on log-transformed values. As shown in Table 2, the means of kallikrein concentrations between cancer and normal samples were significantly different for all KLKs (P < 0.001), with the exception of KLK5 (P = 0.92) and KLK14 (P = 0.87).

Cox regression models were used to examine the association between OS and kallikreins, and clinical and pathological parameters (Table 3). In univariate analysis the clinical and pathological parameters, age, grade, TNM stage and tumour differentiation, are significantly associated with OS (P = 0.001, P = 0.014, P < 0.001 and P = 0.004, respectively), whereas in multivariate analysis only age, TNM stage and tumour differentiation remained significant (P = 0.005, P = 0.004 and P = 0.036, respectively). Kallikrein markers KLK5, KLK6, KLK7, KLK13, and KLK14 were significantly associated with OS ($P \leq 0.05$) in univariate analysis, but after adjusting for the significant clinical factors, age, TNM stage and differentiation, only KLK5 (HR: 1.24 (95% CI: 1.05-1.47)), KLK7 (HR: 1.57 (95% CI: 1.04-2.37)) and KLK14 (HR: 1.43 (95% CI: 1.05-1.94)) remained significant (Table 3). Whereas, when using the forward selection with a *P*-value of 0.1 as entry criterion in the Cox regression, only KLK14 and KLK7 were selected in the multi-marker model. The fitted Cox model is: $0.054 \times \text{Age} + 1.629 \times \text{TNM}$ (Stage III/IV) $+ 0.703 \times$ Differentiation (poor) + $0.300 \times \log KLK14 + 0.364 \times \log KLK7$.

The clinical usefulness of kallikreins for prediction of OS status at 1 year and 5 years after operation for CRC was evaluated by ROC curve analysis. For OS, age and TNM stage alone were very predictive with an area under the curve (AUC) of 0.79 at both year 1 and year 5 under the time-dependent ROC curve. However, the addition of a panel of selected KLK markers (KLK14) at year 1 by

Table I Distribution of numerical variables of the study

			Quartiles		es
			25	50	75
Variable	$\mathbf{Mean} \pm \mathbf{s.e.}$	Range	(n)	
Patient age (years)	68.7 ± 0.8	31.0-91.0	61.7	70.0	76.0
Follow-up (months; $n = 122$)	4.7 ± 0.1 37.2 ± 2.5	0.2-12.0 1.0-132.0	3.5 10.0	4.5 35.5	5.5 54.7
DFS (months; $n = 122$) OS (months; $n = 122$)	31.3 ± 2.7 37.1 ± 2.5	0.0-132.0 1.0-132.0	4.2 10.0	24.0 35.5	54.0 54.7

DFS = disease-free survival; OS = overall survival.

stepwise selection in weighted logistic regression, gave an increment in AUC from 0.79 to 0.86, but much less at year 5 (Figure 1).

Association of kallikrein markers with disease-free survival of colon cancer patients

Cox regression model results for colorectal cancer DFS are listed in Table 4. Among all clinical and pathological parameters, only TNM stage had a significant (P=0.04) hazard ratio in multivariate analysis. Kallikrein markers KLK5, KLK6, KLK7, KLK10, KLK13, and KLK14 were significantly associated with DFS ($P \leq 0.05$) in univariate analysis, but after adjusting for TNM stage only KLK14 (HR: 1.33 (95% CI: 1.05-1.68)) remained significant and no other marker entered into the multivariate Cox model using the forward selection with a P-value of 0.1 as entry criterion. The fitted Cox model is: $1.404 \times \text{TNM}$ (Stage III/IV) + $0.283 \times \log \text{KLK14}$. The clinical usefulness of kallikreins for the prediction of DFS status at 1 year and 5 years after operation for colorectal cancer was also evaluated by ROC curve analysis. The addition of a panel of selected KLK markers by stepwise selection in weighted logistic regression hardly gave any increment values at both year 1 and year 5 (Figure 2).

DISCUSSION

Tissue or serum levels of KLKs have been examined either individually or in panels as diagnostic or prognostic factors in different types of cancer (Borgono and Diamandis, 2004; Dorn et al, 2007; Paliouras et al, 2007; Zheng et al, 2007; Planque et al, 2008). With the development of technology and automation and the promising concept of individualised therapy, it is tempting to examine concurrently, in panels, many different parameters as cancer biomarkers. In this study, we analysed the cytosolic extracts of 122 pairs of cancer/normal colon mucosa for the expression of nine KLKs on the protein level, to evaluate the clinical utility of this gene family as prognostic markers for colorectal cancer. Using a sensitive and specific immunofluorometric assay developed at Professor Diamandis's laboratory (University of Toronto, Ontario, Canada), we studied the alterations in the expression between cancer and paired normal colorectal tissue for nine KLKs. In addition, we used extensive statistical analysis to examine whether

 Table 2
 Marker distribution in 122 paired tumour (1) and normal tissues (0) and the distribution of the expression ratios of tumour to normal

Marker	CA/normal	Median (Ist, 3rd quartile)	Mean ratio ^a (s.e.)	95% CI	P-value**
KLK5	I	0.005 (0.004, 0.008)	0.985 (0.146)	0.736-1.318	0.9198
	0	0.006 (0.005, 0.01)			
KLK6	I	0.4485 (0.104, 1.684)	15.548 (2.47)	11.388-21.228	< 0.0001
	0	0.0315 (0.01, 0.06)			
KLK7	I	0.29 (0.171, 0.51)	2.323 (0.235)	1.905-2.832	< 0.000
	0	0.13 (0.078, 0.217)			
KLK8	I	0.009 (0.005, 0.023)	2.001 (0.221)	1.611-2.485	< 0.0001
	0	0.0055 (0.004, 0.008)			
KLK10	I	0.464 (0.071, 2.206)	33.307 (6.398)	22.857-48.535	< 0.000
	0	0.008 (0.005, 0.029)			
KLKII	I	0.817 (0.291, 1.98)	3.131 (0.435)	2.385-4.11	< 0.000
	0	0.266 (0.15, 0.568)			
KLK13	I	0.009 (0.005, 0.016)	1.518 (0.148)	1.254-1.838	< 0.000
	0	0.005 (0.004, 0.008)			
KLK14	I	0.035 (0.019, 0.061)	0.98 (0.123)	0.767-1.253	0.8738
	0	0.043 (0.032, 0.064)			
KLK15	I	0.132 (0.063, 0.256)	3.263 (0.512)	2.4-4.438	< 0.000 I
	0	0.0365 (0.006, 0.14)			

CI = confidence interval; KLK = kallikrein-related peptidase. ^aBack-transformed mean log ratios of cancer to normal expressions. ***P*-values from the paired *t*-test on log-transformed values.

Human tissue kallikreins as colorectal cancer markers

M Talieri et al

Table 3 The univariate and multivariate Cox regression analysis for the overall survival

			Univariate			Multivariate			
Clinical variable	N (%)	HR	CI	P *	HR	СІ	P-value**		
Age (years) Tumour size	23 16	1.06 1.01	(1.02, 1.09) (0.84, 1.22)	0.001 0.911	1.07 1.07	(1.02, 1.12) (0.73, 1.56)	0.004 0.721		
Grade			х <i>У</i>						
lorll	65 (68)	I			1				
III or IV	30 (32)	2.4	(1.19, 4.82)	0.014	0.57	(0.17, 1.88)	0.356		
TNM stage									
lorll	59 (51)	I			I.				
III or IV	56 (49)	4.39	(2.08, 9.26)	< 0.00 I	4.71	(1.62, 13.66)	0.004		
Differentiation									
Well-moderate	99 (86)	I			I				
Poor	16 (14)	2.92	(1.41, 6.02)	0.004	3.7	(1.09, 12.6)	0.036		
Markers									
KLK5	126	1.25	(1.1, 1.42)	0.001	1.24	(1.05, 1.47)	0.012		
KLK6	127	1.26	(1.03, 1.54)	0.026	1.09	(0.85, 1.39)	0.493		
KLK7	127	1.78	(1.32, 2.4)	< 0.00	1.57	(1.04, 2.37)	0.032		
KLK8	127	1.1	(0.91, 1.34)	0.335	1.01	(0.78, 1.32)	0.914		
KLK10	127	1.15	(1, 1.33)	0.051	1.12	(0.94, 1.34)	0.193		
KLKII	126	1.2	(0.99, 1.46)	0.057	1.16	(0.91, 1.49)	0.236		
KLK13	127	1.31	(1.03, 1.68)	0.028	1.36	(, .87)	0.053		
KLK14	127	1.32	(1.1, 1.6)	0.003	1.43	(1.05, 1.94)	0.022		
KLK15	127	1.01	(0.78, 1.32)	0.934	1.02	(0.77, 1.36)	0.891		

CI = confidence interval; KLK = kallikrein-related peptidase. *P-values from univariate Cox regression. **P-values for clinical variables are from multivairate Cox regression after adjusting for each other. P-values for markers are from multiviariate Cox regression with significant clinical variables from above and the marker of interest.



Figure I ROC curves for I- and 5-year overall survival for 'Clinical': age and TNM stage; and 'Clinical + Markers': age, TNM stage, and selected marker panels of KLK(s). The marker panel at year I is: KLK14. The marker panel at year 5 is: KLK8, KLK10, KLK14, and KLK15.

the use of those KLKs, as a panel, has to offer more information to the prognosis of colorectal cancer patients than the already existent clinical and pathological parameters.

Almost all KLKs, except KLKs 5 and 14, effectively separate cancer from paired normal tissue in a statistically significant manner. This is in agreement with our unpublished data showing overexpression of several kallikreins (*KLK6*, *KLK7*, *KLK10*) on the mRNA level of cancer samples as compared with their paired normal colon mucosa. Similar studies using the same method with us and examining the expression patterns of several kallikreins either in ovarian cytosolic extracts (Dorn *et al*, 2007; Zheng *et al*, 2007) or serum samples from lung cancer patients (Planque *et al*, 2008), have revealed unique patterns.

The present report confirms the *in silico* study by Yousef *et al*, 2004, showing an overexpression of KLK6, KLK8 and KLK10 in CRC. It is also in agreement with Ogawa *et al* (2005), reporting that *KLK6* mRNA overexpression in CRC correlates with poor prognosis of CRC patients. Furthermore, we are in line with Feng *et al* (2006), reporting upregulation of *KLK10* in CRC. We underline as important the difference noticed between the upregulation of KLK10 in CRC shown in this work and its downregulation shown in previous studies and attributing it to CpG island hypermethylation, examining other cancer tissue types, like breast, prostate or ovarian (Sidiropoulos *et al*, 2005), gastric (Huang *et al*, 2007), head and neck (Worsham *et al*, 2006), testicular (Luo *et al*, 2001) and lung (Planque *et al*, 2008). However, contradictory results have

Table 4 The univariate and multivariate Cox regression analysis for the disease-free survival

			Univariate			Multivariate			
Clinical variable	N (%)	HR	СІ	P *	HR	СІ	P-value**		
Age (years) Tumour size	24 6	1.04 1.01	(1.01, 1.07) (0.84, 1.21)	0.013 0.951	1.03 0.94	(0.99, 1.08) (0.68, 1.31)	0.101 0.721		
Grade or or V	65 (68) 31 (32)	3.04	(1.55, 5.97)	0.001	1.33	(0.45, 3.95)	0.605		
TNM stage or II or IV	59 (51) 57 (49)	4.1	(2.01, 8.39)	0.000	2.86	(1.05, 7.79)	0.040		
Differentiation Well-moderate Poor	99 (85) 17 (15)	2.78	(1.42, 5.43)	0.003	2.04	(0.72, 5.81)	0.182		
Markers	107		(1.07.1.07)			(0.00, 1.07)	0.075		
KLKS KLK6 KLK7 KLK8 KLK10 KLK11 KLK13 KLK14 K1 K15	127 128 128 128 128 128 127 128 128 128	1.21 1.23 1.47 1.09 1.15 1.18 1.32 1.28 1.07	(1.07, 1.37) (1.03, 1.48) (1.14, 1,9) (0.91, 1.31) (1.01, 1.31) (0.99, 1.41) (1.04, 1.67) (1.06, 1.54) (0.84, 1.37)	0.024 0.023 0.349 0.040 0.068 0.025 0.011 0.584	1.16 1.09 1.28 1.07 1.12 1.29 1.33 1.12	$\begin{array}{c} (0.99, 1.37) \\ (0.9, 1.33) \\ (0.96, 1.72) \\ (0.8, 1.26) \\ (0.92, 1.23) \\ (0.9, 1.39) \\ (0.98, 1.71) \\ (1.05, 1.68) \\ (0.85, 1.46) \end{array}$	0.084 0.384 0.095 0.972 0.387 0.298 0.074 0.018 0.425		

CI = confidence interval; KLK = kallikrein-related peptidase. *P-values from univariate Cox regression. **P-values for clinical variables are from multivairate Cox regression after adjusting for each other. P-values for markers are from multiviariate Cox regression with clinical variable TNM stage and the marker of interest.



Figure 2 ROC curves for I- and 5-year disease-free survival for 'Clinical': age and TNM stage; and 'Clinical + Markers': age, TNM stage, and selected marker panels of KLK(s). The marker panel at year I is: KLK10 and KLK14. The marker panel at year 5 is: KLK5, KLK6, KLK8, KLK10, KLK13, KLK14, and KLK15.

been reported in other studies, claiming that KLK10 is upregulated in cancers, as breast (Luo *et al*, 2002), ovarian (Luo *et al*, 2003), gastric (Feng *et al*, 2006) and head and neck (Dasgupta *et al*, 2006).

All members of the KLK family have been examined as biomarkers for different types of cancer and reviewed recently by Paliouras *et al*, 2007. Current results showing an overexpression of KLK6 in CRC may be explained by the fact that KLK6 acts as a mediator of K-Ras-dependent migration of CRC cells, as reported by Henkhaus *et al* (2008a) and that K-RAS mutations are common in CRC, occurring in approximately 50% of cases. We have recently demonstrated that ovarian cancer cells of epithelial origin like colon cells, stably transfected to express KLKs 4, 5, 6 and 7 were significantly more invasive *in vitro* and formed larger tumours in mice (Prezas *et al*, 2006a). Furthermore, Klucky *et al*, 2007 trying to explain the function of KLK6 in cancer, provided evidence that KLK6 induces E-cadherin shedding and thus, promotes cell proliferation, migration, and invasion. In addition, recent data presented by Henkhaus *et al* (2008b) indicate a central role for caveolin-1, the main structural protein of caveolae in both KLK6 gene expression and protein secretion of colon cancer cell line HCT116.

Cytosolic KLK7 protein in this study and KLK7 transcripts from the same samples used in an earlier study conducted in our lab (Talieri *et al*, 2009), seem to follow the same pattern of upregulation. As reported recently by Ramani and Haun (2008), overexpression of KLK7 in tumour cells may play an important

role in tumour invasion through proteolysis of extracellular matrix components, such as fibronectin. Our lab has shown in the past that KLK7 may serve as a potential biomarker for breast cancer patients (Talieri et al, 2004) and that its overexpression in intracranial tumours reveals a less favourable outcome (Prezas et al, 2006b). Moreover, we have shown that U-251-MG glioblastoma cells transfected with KLK7 showed increased invasive potential in an in vitro Matrigel assay (Prezas et al, 2006b). Present work shows upregulation of KLK8, although it is not associated either with OS or DFS. This is in line with our previous work (Prezas et al, 2006b) in brain cancer, where we did not find any association of KLK8 with DFS or OS. In addition, in the same study, glioblastoma U-251-MG cells stably transfected by the KLK8 gene did not show invasion in the Matrigel assay. Although the expression of KLK14 of CRC samples does not seam to be significantly different from their normal counterparts, it is the marker that remained statistically significant in association with the survival outcomes: DFS and OS in the Cox regression univariate and multivariate analysis showing unfavourable prognosis for the patients. KLK14 is involved in extracellular matrix degradation (Borgono et al, 2007) and the present finding may be associated with response to treatment.

As most members of the KLK family display differential expression in CRC, it is very tempting to speculate on their potential role in CRC initiation and progression. Studies on the physiological function of KLKs in normal colon will shed more

REFERENCES

- American Cancer Society (2005) Cancer Facts and Figures, 2005. American Cancer Society: Atlanta
- Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL (2004) Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. Brit J Surg 91: 1275-1291
- Borgono CA, Diamandis EP (2004) The emerging roles of human kallikreins in cancer. Nat Rev Cancer 4: 876-890
- Borgono CA, Michael IP, Show JLV, Luo L-Y, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP (2007) Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. J Biol Chem 282: 2405-2422
- Christophi GP, Isackson PJ, Blaber S, Blaber M, Rodriquez M, Scarisbrick IA (2004) Distinct promoters regulate tissue-specific and differential expression of kallikrein 6 in CNS demyelinating disease. *J Neurochem* **91**: 1439-1449
- Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley WW, Weissler MC, Dressler LG, Shores CG, Yarbrough WG, Perou CM (2004) Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 5: 489-500
- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz J-M, De Angelis R, and the CONCORD Working Group (2008) Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study(CONCORD). Lancet Oncol 9: 730-756
- Dasgupta S, Tripathi PK, Qin H, Bhattacharya-Chatterjee M, Valentino J, Chatterjee SK (2006) Identifiction of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **42:** 306-316
- Dong Y, Matigian N, Harvey TJ, Samaratunga H, Hooper JD, Clements JA (2008) Tissue-specific promoter utilisation of the kallikrein-related peptidase genes, KLK5 and KLK7, and cellular localisation of the encoded proteins suggest roles in exocrine pancreatic function. *Biol Chem* **389**: 99-109
- Dorn J, Schmitt M, Kates R, Schmalfeldt B, Kiechle M, Scorilas A, Diamandis EP, Harbeck N (2007) Primary tumor levels of human tissue kallikreins affect surgical success and survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **13**: 1742-1748
- Duffy MJ (1996) Proteases as prognostic markers of cancer. *Clin Cancer Res* 2: 613-618
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O (2003) Clinical utility of biochemical

light into the roles of these enzymes in colon cancer and other diseases of colon and rectum. In addition, these enzymes may represent promising future therapeutic targets.

We need to point out that even though a combination of selected clinical factors and KLKs panel showed an increase in OS prediction at 1 year after the surgery with AUC of 0.86 under the timedependent ROC curve, after correction for possible overfitting from the model selection process estimated by cross-validation, the corrected AUC was only at 0.69 and it was no better than the prediction of age and TNM stage alone (Supplementary Figure S1). Therefore, the performance of this selected KLK marker panel and the combination rule defined in this particular data need to be further evaluated in an independent validation study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the General Secretariat for Research and Technology of Greece (GSRT.109- γ) EPAN (Measure 4.3, Action 4.3.6.1 γ) within the framework of the 'Bilateral & Multilateral RTD Cooperation'. The fund comes from (70%) the European Fund of Regional Development (EFRD) and from (30%) National resources.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (http://www.nature.com/bjc)

markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* **39**: 718–727

- Emami N, Diamandis EP (2007) Human tissue kallikreins: a road under construction. Clin Chim Acta 381: 78-84
- Feng B, Xu WB, Zheng MH, Ma JJ, Cai Q, Zhang Y, Ji J, Lu AG, Qu Y, Li JW, Wang ML, Hu WG, Liu BY, Zhu ZG (2006) Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1596–1603
- Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS (2000) Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics* 56: 337-344
- Henkhaus RS, Gerner EW, Ignatenko NA (2008a) Kallikrein 6 is a mediator of K-RAS-dependent migration of colon carcinoma cells. *Biol Chem* **389:** 757-764
- Henkhaus R, Roy UKB, Cavallo-Medved D, Sloane BF, Gerner EW, Ignatenko NA (2008b) Caveolin-1-Mediated Expression and Secretion of kallikrein 6 in colon cancer cells. *Neoplasia* **10**: 140–148
- Huang W, Zhong J, Wu L-Y, Yu L-F, Tian X-l, Zhang Y-F, Li B (2007) Downregulation and CpG island hypermethylation of *NES1/hK10* gene in the pathogenesis of human gastric cancer. *Cancer Lett* **251**: 78-85
- Klucky B, Mueller R, Vogt I, Teurich S, Hartenstein B, Breuhahn K, Flechtenmacher Ch, Angel P, Hess J (2007) Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer Res* 67: 8198-8206
- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JCC, Bartlett JD, Simmer JP (2008) Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* **389:** 695-700
- Luo LY, Diamandis EP, Look MP, Soosaipillai AP, Foekens JA (2002) Higher expression of human kallikrein 10 in breast cancer tissue predicts tamoxifen resistance. *Br J Cancer* **86**: 1790–1796
- Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, Fracchioli S, Bellino R, van Gramberen M, de Bruijn H, Henrik A, Stenman UH, Massobrio M, van der Zee AG, Vergote I, Diamandis EP (2003) The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res* 63: 807–811
- Luo LY, Rajpert De Meyts ER, Jung K, Diamandis EP (2001) Expression of the normal epithelial cell-specific I (*NES1; KLK10*) candidate tumor suppressor gene in normal and malignant testicular tissue. Br J Cancer 85: 220-224
- McCracken M, Olsen M, Chen MS, Jemal A, Thun M, Cokkinides V, Deapen D, Ward E (2007) Cancer incidence, mortality, and associated risk factors

npg



- Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, Mori M (2005) Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 2889–2893
- Oikonomopoulou K, Hansen KK, Chapman K, Vergnolle N, Diamandis EP, Hollenberg MD (2007) Kallikrein-mediated activation of PARs in inflammation and nociception. *Inflamm Res* 56(Suppl 3): S499-S502
- Paliouras M, Borgono C, Diamandis E (2007) Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett* 249: 61-79
- Pampalakis G, Diamandis E, Sotiropoulou G (2006) The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers. *Biol Chem* **387:** 795-799
- Pampalakis G, Kurlender L, Diamandis EP, Sotiropoulou G (2004) Cloning and chracterization of novel isoforms of the human kallikrein 6 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **320:** 54-61
- Pampalakis G, Sotiropoulou G (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1776: 22-31
- Petraki CD, Papanastasiou PA, Karavana VN, Diamandis EP (2006) Cellular distribution of human tissue kallikreins: immunohistochemical localization. *Biol Chem* **387**: 653–663
- Planque Ch, Li L, Zheng Y, Soosaipillai A, Reckamp K, Chia D, Diamandis EP, Goodglick L (2008) A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 14: 1355-1362
- Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis EP, Krüger A, Magdolen V (2006a) Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6 and 7 increased the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 387: 807–811
- Prezas P, Scorilas A, Yfanti C, Viktorov P, Agnanti N, Diamandis EP, Talieri M (2006b) Human tissue Kallikreins 7 and 8 gene expression in intracranial tumors: a clinical study in Greece. *Biol Chem* 387: 613-618
- Ramani VC, Haun RS (2008) The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. Biochem Biophys Res Commun 369: 1169–1173
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agerre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2004) The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 362-365

- Scarisbrick IA, Limbo R, Vandell AG, Keegan M, Blaber SI, Blaber M, Sneve D, Lucchinetti CF, Rodriguez M, Diamandis EP (2008) Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegenaration. *Biol Chem* 389: 739-746
- Shaw JL, Diamandis EP (2007) Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* **53**: 1423-1432
- Shaw JL, Diamandis EP (2008) A potential role for tissue kallikrein-related peptidases in human cervico-vaginal physiology. *Biol Chem* 389: 681-688
- Sidiropoulos M, Pampalakis G, Sotiropoulou G, Katsaros D, Diamandis EP (2005) Downregulation of human kallikrein 10 (*KLK10/NES1*) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. *Tumor Biol* **26:** 324-336
- Smith Jr RS, Gao L, Chao L, Chao J (2008) Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularizatio in limb ischemia. *Biol Chem* 389: 725-730
- Sturgeon C (2002) Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. Clin Chem 48: 1151-1159
- Talieri M, Diamandis EP, Gourgiotis D, Mathioudaki K, Scorilas A (2004) Expression analysis of the human kallikrein 7 (*KLK7*) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost* **91:** 180–186
- Talieri M, Prezas P, Alexopoulou DK, Mathioudaki K, Diamandis EP, Xynopoulos D, Ardavanis A, Arnogiannaki N, Scorilas A (2009) Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (*KLK7*) in colorectal cancer. *Thromb Haemost* (in press)
- Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, Nygren AOH, Frrami A, Schouten JP, Benninger M (2006) Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 668-677
- Yousef GM, Borgono CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A, Diamandis EP (2004) In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. *Anticancer Res* 24: 43-51
- Zheng Y, Cai T, Feng Z (2006) Application of the time-dependent ROC curves for prognostic accuracy with multiple biomarkers. *Biometrics* 62: 279-287
- Zheng Y, Katsaros D, Shan SJ, de la Longrais IR, Porpiglia M, Scorilas A, Kim NW, Wolfert RL, Simon I, Li L, Feng Z, Diamandis EP (2007) A multiparametric panel for ovarian cancer diagnosis, prognosis, and response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* **13**: 6984–6992

Supplementary Data

Table S1. Spearman correlation coefficients between KLK markers and hierarchical clustering based on Spearman's correlation.

	KLK5	KLK6	KLK7	KLK8	KLK10	KLK11	KLK13	KLK14	KLK15
KLK5	1	0.203	0.377	0.363	0.228	0.195	0.386	0.411	0.071
KLK6		1	0.428	0.616	0.688	0.291	0.201	0.275	0.092
KLK7			1	0.511	0.488	0.201	0.541	0.348	0.259
KLK8				1	0.535	0.437	0.369	0.359	0.128
KLK10					1	0.386	0.289	0.338	0.184
KLK11						1	0.38	0.355	0.327
KLK13							1	0.526	0.501
KLK14								1	0.186
KLK15									1



Figure S1. Time-dependent ROC curve at year one for overall survival. The performance of the combination of the selected clinical factors and marker panel is corrected for overfitting.



ROC (1st year)

False Positive Fraction

'Clinical': age, TNM stage and differentiation;

'Clinical + Markers': age, TNM stage, and KLK14;

'Corrected': the performance of 'Clinical+Markers' is corrected for over-fitting, which was estimated by cross-validation technique (2/3 of the observations as training, and remaining 1/3 as testing) randomly repeated 100 times.