



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ 7 ΚΑΙ 14 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

ΜΑΡΙΝΑ Ν. ΔΕΒΕΤΖΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Ν. 5343/32, Παρ.2, Άρθρο 202).

**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336, 7294
FAX: (26510) 07064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή
e-mail: grambet@cc.uoi.gr

Ιωάννινα, 25 Νοεμβρίου 2014
Αριθμ. Πρωτ. : 195

Την Τρίτη 25 Νοεμβρίου 2014 και ώρα 15.30, στην αίθουσα 4, 1^{ος} όροφος, Μεταβατικό Κτίριο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, έγινε σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μετά τον διορισμό της, στην συνεδρίαση υπ' αρ. **217/09-07-2014** της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών για τη διαδικασία αξιολόγησης και κρίσης της Διδακτορικής Διατριβής της κας Μαρίνας Δεβετζή.

Παρόντα ήταν τα Μέλη :

1. **Θεώνη Τράγκα**, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπουσα
2. **Μαρουλιώ Ταλιέρη**, Ερευνήτρια του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου», Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας», μέλος 3-μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
3. **Δημήτριος Στεφάνου**, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος 3-μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
4. **Ευάγγελος Μπριασούλης**, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος 7-μελούς Εξεταστικής Επιτροπής
5. **Μαρία-Ελένη Λέκκα**, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων μέλος 7-μελούς Εξεταστικής Επιτροπής
6. **Άννα Μπατιστάτου**, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος 7-μελούς Εξεταστικής Επιτροπής
7. **Άννα Γούσια**, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος 7-μελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Αφού διαπιστώθηκε απαρτία, σύμφωνα με τα οριζόμενα από το Νόμο 2083/92, προσήλθε η κα Μαρίνα Δεβετζή, η οποία υποστήριξε στην Επιτροπή τη Διδακτορική της Διατριβή, με τίτλο «Μελέτη του ρόλου των Ιστικών Καλλικρεϊνών 7 και 14 στον καρκίνο του παχέος εντέρου». Της έγιναν ερωτήσεις από την Επιτροπή, απαντήθηκαν και απεχώρησε. Στη συνέχεια, η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της Διδακτορικής Διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια της υποψηφίου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της.

Ακολούθησε ψηφοφορία, όπου εγκρίθηκε η Διδακτορική Διατριβή και αποφασίστηκε ομόφωνα να της απονεμηθεί το Διδακτορικό Δίπλωμα με βαθμό «**Άριστα**».

Η Επιβλέπουσα



Θεώνη Τράγκα

Αν. Καθ. Τμήματος ΒΕΤ

Τα Μέλη



Μαρουλιώ Ταλιέρη,
Ερευνήτρια του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας «Γ.
Παπανικολάου»,



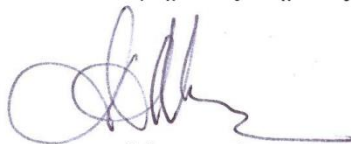
Δημήτριος Στεφάνου
Καθ. Τμήματος Ιατρικής



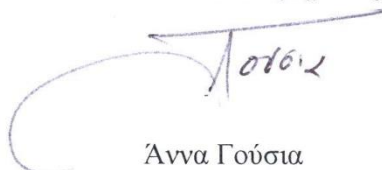
Ευάγγελος Μπριάσουλης
Καθ. Τμήματος Ιατρικής



Μαρία-Ελένη Λέκκα
Καθ. Τμήματος Χημείας



Άννα Μπατιστάτου
Καθ. Τμήματος Ιατρικής



Άννα Γούσια
Αν. Καθ. Τμήματος Ιατρικής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής Φυσιολογίας του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου» του Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας» υπό την επίβλεψη της Δρ. Μαρουλιώς Ταλιέρη, Συντονίστριας του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου» και στο Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», υπό την επίβλεψη του Δρ. Γιώργου Παναγιώτου, Διευθυντή του Ινστιτούτου Μοριακής Ογκολογίας, με την υποστήριξη της υποτροφίας Ε.Π.Ε.Δ.Β.Μ. Ηράκλειτος ΙΙ, ΕΣΠΑ 2007-2013.

Καθ' όλη τη διάρκειά της, η παρούσα διατριβή ήταν υπό τη στενή επιστημονική καθοδήγηση της επιβλέπουσας Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας Θεώνης Τράγκα. Θέλω να την ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στις ικανότητές μου, την άψογη συνεργασία της και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε μέσα από τις πολύ εποικοδομητικές συζητήσεις μας.

Θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την Δρ. Μαρουλιώ Ταλιέρη, με την οποία με συνδέει μακρόχρονη συνεργασία, γιατί με εισήγαγε στο χώρο της επιστημονικής έρευνας, με δίδαξε την ερευνητική σκέψη και πρακτική και στάθηκε αρωγός με κάθε τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, η οποία θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς τη συμβολή της. Επίσης, μου έδωσε τη δυνατότητα να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες συμμετέχοντας σε συνέδρια στην Ελλάδα και στο εξωτερικό και στάθηκε κοντά μου στις επιστημονικές και προσωπικές δυσκολίες που βρέθηκαν στο δρόμο μου.

Ευχαριστώ πολύ, επίσης, τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας Δημήτριο Στεφάνου, μέλος της Τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και φυσικά όλα τα μέλη της Επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: την Καθηγήτρια Βιοχημείας Μαρία-Ελένη Λέκκα, τον Καθηγητή Ογκολογίας Ευάγγελο Μπριασούλη, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Άννα Μπατιστάτου και την

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Άννα Γούσια, στην κρίση των οποίων υποβάλλεται αυτή η διατριβή, για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Γιώργο Παναγιώτου, καθώς και την Δρ. Μαρίνα Σαμιωτάκη, Επιστημονικό και Λειτουργικό Προσωπικό του Εργαστηρίου Πρωτεϊνικής Χημείας, υπεύθυνη για τον φασματογράφο μάζας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων Πρωτεομικής ανάλυσης. Η συνεργασία και η βοήθεια που μου προσέφεραν σε κρίσιμες στιγμές της διατριβής μου ήταν παραπάνω από πολύτιμη και οι γνώσεις που αποκόμισα στο Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας εξαιρετικά χρήσιμες για το μέλλον. Τους ευχαριστώ πολύ για τη θερμή φιλοξενία. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Δρ. Wolf Oehrl και Δρ. Μαρίνα Κοτσίκη του Εργαστηρίου Πρωτεϊνικής Χημείας για την αρμονική και εποικοδομητική συνεργασία, η οποία διευκόλυνε σημαντικά το έργο μου.

Θέλω να πω, ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Γεωργία Παπαχριστοπούλου, Βιολόγο M.Sc., του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας» για την πολύτιμη βοήθειά της στα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας και τον ουσιαστικό υποστηρικτικό της ρόλο τόσο πρακτικά όσο και ηθικά.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών Ανδρέα Σκορίλα για τη συνεργασία του στη στατιστική ανάλυση και τον Δρ. Δημήτριο Ξυνόπουλο, Διευθυντή της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας» για τη διάθεση των δειγμάτων μελέτης.

Το ευχαριστώ είναι πολύ λίγο για να εκφράσει κανείς την ευγνωμοσύνη του στους αγαπημένους του ανθρώπους, γιατί χωρίς αυτούς έτσι κι αλλιώς τίποτα δεν έχει αξία και νόημα. Η Αμαλία, η Σιμόνη, ο Γιάννης, η Ίνγκριντ, η Κωνσταντίνα, η Νάνσυ έχουν ο καθένας τους μια ξεχωριστή θέση στη ζωή μου και στην καρδιά μου. Η αγάπη τους είναι για μένα χαρά, ελπίδα και φως. Στους γονείς μου, Νίκο και Μαίρη, οφείλω ό,τι είμαι σήμερα. Με έμαθαν να είμαι ελεύθερη και να αγαπώ, στήριζαν πάντα τα όνειρά μου και φρόντιζαν για την ευτυχία μου. Ιδιαίτέρως, θέλω να αφιερώσω την παρούσα εργασία στον πατέρα μου, στον Νίκο, που έφυγε νωρίς και δεν πρόφτασε να δει τη διατριβή μου να ολοκληρώνεται, αλλά είμαι σίγουρη ότι θα είναι περήφανος.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACTB:	Actin beta, β-Ακτίνη
AJCC:	American Joint Committee on Cancer, Αμερικανική Συντονιστική Επιτροπή για τον Καρκίνο
ANXA1:	Annexin-1, Αννεξίνη 1
APC:	Adenomatous polyposis coli gene, Γονίδιο της αδενωματώδους ορθοκολικής πολυποδίασης
APS:	Ammonium persulfate, Υπερθειϊκό αμμώνιο
AREs:	Androgen response elements, Στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα
ATCC:	American Type Culture Collection
BCL2:	B-cell lymphoma 2, Γονίδιο <i>BCL2</i>
bFGF:	Basic fibroblast growth factor, Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας
BRAF:	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, Γονίδιο <i>BRAF</i>
BSA:	Bovine serum albumin, Αλβουμίνη ορού βοός
CAFs:	Cancer-associated fibroblasts, Ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον καρκίνο
cDNA:	Complementary DNA, Συμπληρωματικό DNA
CDSN:	Corneodesmosin, Κερατινοδεσμοσίνη
CID:	Collision-induced dissociation, Διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση
CIMP:	CpG island methylator phenotype, Φαινότυπος μεθυλιωτή CpG νησίδων
CIN:	Chromosomal instability, Χρωμοσωμική αστάθεια
COX-2:	Cyclooxygenase-2, Κυκλο-οξυγενάση-2
CSF-1:	Colony-stimulating factor 1, Παράγοντας επαγωγής αποίκησης 1
C_T:	Threshold cycle, Οριακός κύκλος
CTCs:	Circulating tumor cells, Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
CYC-1:	Cytochrome c-1, Κυτόχρωμα c-1
DCBE:	Double-contrast barium enema, Βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης
DFS:	Disease-free survival, Ελεύθερη νόσου επιβίωση
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium, Τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Eagle του Dulbecco
DMSO:	Dimethyl sulfoxide, Διμεθυλ-σουλφοξείδιο
DNA:	Deoxyribonucleic acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

dNTPs:	Deoxyribonucleotides 5'-triphosphate, 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
DSC:	Desmocollin, Δεσμοκολλίνη
DSG:	Desmoglein, Δεσμογλεΐνη
DTT:	Dithiothreitol, Διθειοθρεϊτόλη
ECM:	Extracellular matrix, Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
EGF:	Epidermal growth factor, Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR:	Epidermal growth factor receptor, Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EMT:	Epithelial-mesenchymal transition, Επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση
EREs:	Estrogen response elements, Στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα
ESI:	ElectroSpray ionization, Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
FAP:	Familial adenomatous polyposis, Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση
FASP:	Filter aided sample preparation, Προετοιμασία δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου
FBS:	Fetal bovine serum, Ορός εμβρύου βοός
FGF:	Fibroblast growth factor, Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας
FIT:	Fecal immunochemical test, Δοκιμασία ανοσοεντόπισης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα
FOBT:	Fecal occult blood test, Δοκιμασία ανίχνευσης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα
GREs:	Glucocorticoid response elements, Στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή
GSK3B:	Glycogen synthase kinase 3 beta, Κινάση 3β της συνθάσης του γλυκογόνου
hMLH1:	MutL homolog 1, Γονίδιο του συστήματος επιδιόρθωσης DNA
HNPCC:	Hereditary non-polyposis colorectal cancer, Κληρονομικός μη πολυποδισιακός ορθοκολικός καρκίνος
HPLC:	High-performance liquid chromatography, Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HREs:	Hormone response elements, Στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες
HRP:	Horseshoe peroxidase, Υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας
HSPA:	Heat-shock protein, Πρωτεΐνη θερμικού σοκ
IFNγ:	Interferon gamma, Ιντερφερόνη γάμμα
IGF:	Insulin-like growth factor, Αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης

IGFBPs:	Insulin-like growth factor binding proteins, Πρωτεΐνες δέσμησης αυξητικών παραγόντων IGF
IGFR-1:	Insulin-like growth factor receptor-1, Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα IGF-1
IL:	Interleukin, Ιντερλευκίνη
IUCC:	Union for International Cancer Control, Ένωση για τον Διεθνή Έλεγχο του καρκίνου
JPS:	Juvenile polyposis syndrome, Σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης
KLK:	Kallikrein-related peptidase, Πεπτιδάση σχετιζόμενη με την καλλικρεΐνη
LEKTI:	Lymphoepithelial Kazal-type inhibitor, Λεμφοεπιθηλιακός αναστολέας τύπου Kazal
LOH:	Loss of heterozygosity, Απώλεια ετεροζυγωτίας
MAPK:	Mitogen-activated kinase, MAP κινάση
MDSCs:	Myeloid-derived suppressor cells, Μυελοειδή ανοσοκατασταλικά κύτταρα
MET:	Mesenchymal-epithelial transition, Μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση
MMPs:	Matrix metalloproteases, Μεταλλοπρωτεάσες στρώματος
MMR:	DNA Mismatch repair, Σύστημα επιδιόρθωσης λανθασμένου ζευγαρώματος στο DNA
MS:	Mass spectrometry, Φασματομετρία μάζας
MSCs:	Mesenchymal stem cells, Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα
MSI:	Microsatellite instability, Μικροδορυφορική αστάθεια
NK cells:	Natural killer cells, Κύτταρα φυσικοί φονείς
ORF:	Open reading frame, Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης
OS:	Overall survival, Ολική επιβίωση
PAGE:	Polyacrylamide gel electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου
PAR:	Proteinase-activated receptor, Υποδοχέας ενεργοποιούμενος από πρωτεάσες
PBS:	Phosphate buffered saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR:	Polymerase chain reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PDGF:	Platelet-derived growth factor, Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
PFA:	Paraformaldehyde, Παραφορμαλδεΐδη
PG:	Prostaglandin, Προσταγλανδίνη
PSA:	Prostate-specific antigen, Ειδικό προστατικό αντιγόνο

PTGS:	Post-transcriptional gene silencing, Μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση
qPCR:	Quantitative polymerase chain reaction, Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RISC:	RNA-induced silencing complex, Σύμπλεγμα αποσιώπησης επαγόμενο από RNA
RNA:	Ribonucleic acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNAi:	RNA interference, Παρεμβολή RNA
ROS:	Reactive oxygen species, Δραστικές μορφές οξυγόνου
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute 1640, Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640
RSLC:	Rapid separation liquid chromatography, Υγρή χρωματογραφία ταχείος διαχωρισμού
RT:	Reverse transcription, Αντίστροφη μεταγραφή
SDS:	Sodium dodecyl sulfate, Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο
siRNA:	Small-interfering RNA, Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA
SLPI:	Secretory leukocyte protease inhibitor, Εκκρινόμενος από λευκοκύτταρα αναστολέας πρωτεασών
TAMs:	Tumor-associated macrophages, Μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο
TBE:	Tris-HCl borate EDTA
TBS:	Tris-buffered saline, Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με Tris
TBS-t:	Tris-buffered saline Tween 20, Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με Tris και Tween 20
TEMED:	N, N, N', N'- tetramethyl- ethane- 1,2-diamine, N, N, N', N'- τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
TGF-β:	Transforming growth factor beta, Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας βήτα
TGFBR2:	Transforming growth factor beta receptor II, Υποδοχέας II του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα βήτα
THBS1:	Thrombospondin 1, Θρομβοσπονδίνη 1
TLR:	Toll-like receptor, Υποδοχέας Toll-like
TNF:	Tumor necrosis factor, Παράγοντας νέκρωσης όγκων
TNM:	Tumors, Nodes, Metastases, Όγκοι, Λεμφαδένες, Μεταστάσεις
THBS1:	Thrombospondin 1, Θρομβοσπονδίνη 1

TLR:	Toll-like receptor, Υποδοχέας Toll-like
TNF:	Tumor necrosis factor, Παράγοντας νέκρωσης όγκων
TNM:	Tumors, Nodes, Metastases, Όγκοι, Λεμφαδένες, Μεταστάσεις
tPA:	Tissue plasminogen activator, Ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου
T_{reg} cells:	Regulatory T cell, Ρυθμιστικό Τ λεμφοκύτταρο
TXA₂:	Thromboxane A ₂ , Θρομβοξάνη A ₂
uPA:	Urokinase-type plasminogen activator, Ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης
uPAR:	Urokinase-type plasminogen activator receptor, Υποδοχέας uPA
UTR:	Untranslated region, Αμετάφραστη περιοχή
VEGF:	Vascular endothelial growth factor, Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
Wnt:	Wingless signaling pathway, Σηματοδοτικό μονοπάτι Wingless

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	1
1.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	2
1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	4
1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	7
1.4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	8
1. 5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ	11
1.5.1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ	12
1.5.2. ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ	16
1.5.3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΤΗ CpG ΝΗΣΙΔΩΝ	19
1.5.4. ΟΔΟΝΤΩΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ	22
1.5.5. ΦΛΕΓΜΟΝΗ	25
1.6. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ	28
1.6.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ	29
1.6.2. ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑ (EMT).....	35
1.6.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	38
1.6.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ	41
1.7. ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	44
1.7.1. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	44
1.7.2. ΝΕΟΙ ΥΠΟΨΗΦΙΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	46
2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΙΣΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ	51
2.1. ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ	52
2.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ	53
2.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ	55
2.3.1. Ο ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ	55
2.3.2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ.....	57
2.3.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ..	59
2.3.4. ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ.....	61
2.3.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ	65
2.4. ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ.....	72
2.4.1. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ-ΚΙΝΙΝΩΝ	73
2.4.2. Ο ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΟΣ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΡΟΛΟΙ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ	74

2.4.3. Ο ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΟΣ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΡΕΥΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	81
2.4.4. ΑΛΛΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ.....	84
2.5. ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	86
2.6. Η ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ 3 (KLK3/PSA) ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	91
2.7. ΟΙ ΙΣΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ	92
2.7.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	92
2.7.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	98
2.8. Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ 7 (KLK7)	100
2.9. Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ 14 (KLK14)	105

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

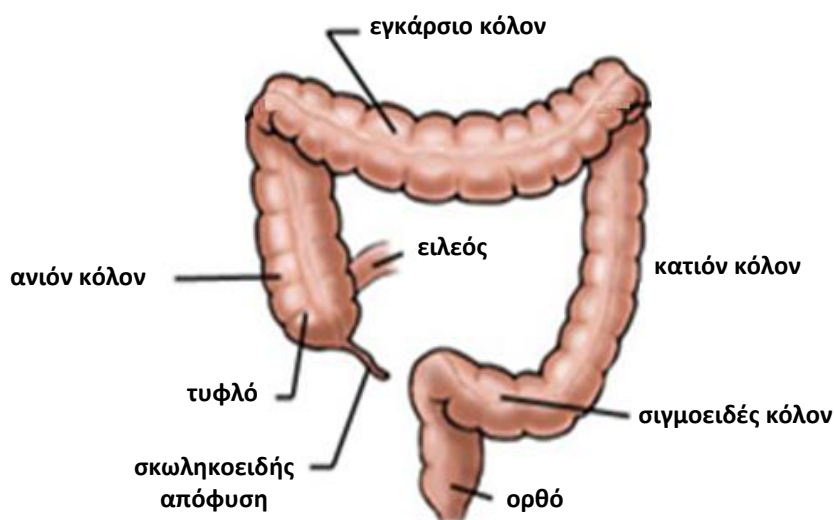
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	111
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	113
3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	114
3.1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	114
3.1.2. ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	115
3.1.3. ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	116
3.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	116
3.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	116
3.2.2. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	117
3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	117
3.2.4. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	118
3.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	120
3.2.6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ KLK7 ΚΑΙ KLK14	121
3.2.7. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ	122
3.2.8. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	130
3.2.9. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ RNA	133
3.2.10. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ <i>IN VITRO</i>	141
3.2.11. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	143
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	149
4.1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	150

4.2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i>	151
4.2.1. mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>KLK7</i>	151
4.2.2. mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>KLK14</i>	156
4.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i>	160
4.3.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΠΙΟ ΣΤΑΘΕΡΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	160
4.3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ	162
4.3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	163
4.4. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	175
4.4.1. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ <i>KLK7</i>	175
4.4.2. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ <i>KLK14</i>	177
4.4.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	179
4.5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ RNA.....	188
4.6. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ <i>IN VITRO</i>	191
4.7. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	194
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	201
5.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	204
5.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	204
5.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	207
5.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	211
5.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ <i>KLK7</i> ΚΑΙ <i>KLK14</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	214
5.6. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	217
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	219
ABSTRACT	223
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	227
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	251

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το παχύ έντερο συνιστά το τελικό τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα μετά το λεπτό έντερο και εκτείνεται από το τέλος του ειλεού μέχρι τον πρωκτό, έχοντας συνολικό μήκος περίπου 1,5 m. Διαιρείται ανατομικά στα εξής επιμέρους τμήματα: το τυφλό, το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατίον, το σιγμοειδές κόλον και το ορθό ή απευθυσμένο. Το παχύ έντερο αρχίζει από τη θέση της ειλεοτυφλικής βαλβίδας και συνεχίζει με το τυφλό. Σε μικρή απόσταση από την ειλεοτυφλική βαλβίδα εντοπίζεται η σκωληκοειδής απόφυση. Κατόπιν, ανέρχεται μέχρι το ήπαρ (ανιόν κόλον) και συνεχίζει ανακάμπτοντας προς τα έσω για να σχηματίσει το εγκάρσιο κόλον, το οποίο εκτείνεται οριζόντια μέχρι την περιοχή του σπλήνα, όπου και ανακάμπτει προς τα κάτω για να σχηματίσει το κατίον κόλον. Το τελευταίο κατέρχεται μέχρι τον αριστερό λαγόνιο βόθρο, όπου και μεταπίπτει στο σιγμοειδές κόλον. Το ορθό, που αποτελεί την τελική μοίρα του παχέος εντέρου, εισέρχεται στην πύελο για να καταλήξει στον πρωκτό (Böcker et al., 2007).

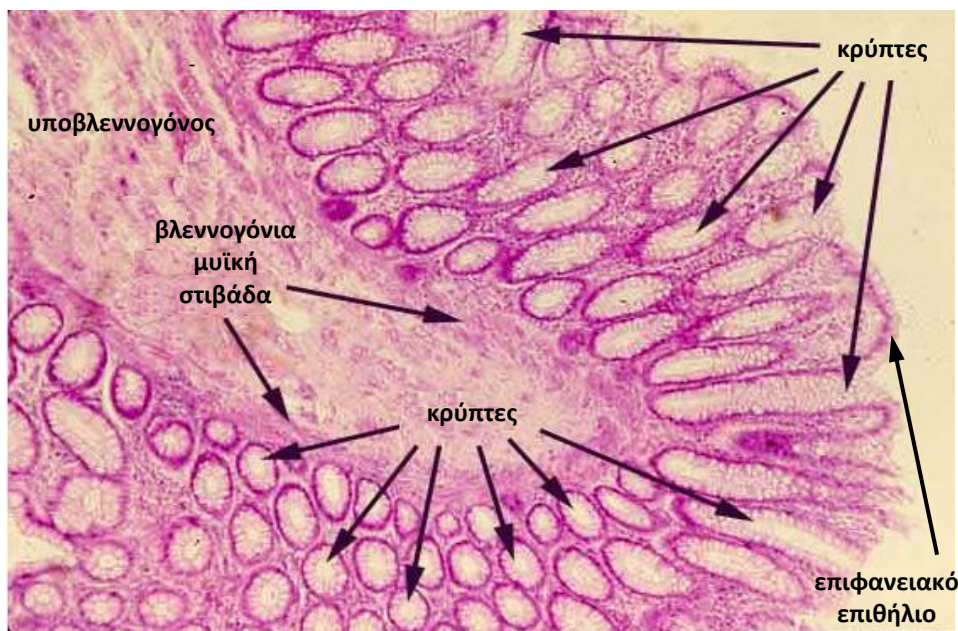


Εικόνα 1.1. Τα μέρη του παχέος εντέρου.

Το τοίχωμα του παχέος εντέρου αποτελείται από τέσσερις χιτώνες: τον βλεννογόνο (επιθήλιο – ινοσυνδετικό στρώμα – βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα), τον υποβλεννογόνο, τον μυϊκό και τον ορογόνο.

Το επιφανειακό επιθήλιο του βλεννογόνου του παχέος εντέρου είναι κυλινδρικό και αποτελείται από απορροφητικά και καλυκοειδή κύτταρα που εμφανίζουν πολικότητα και

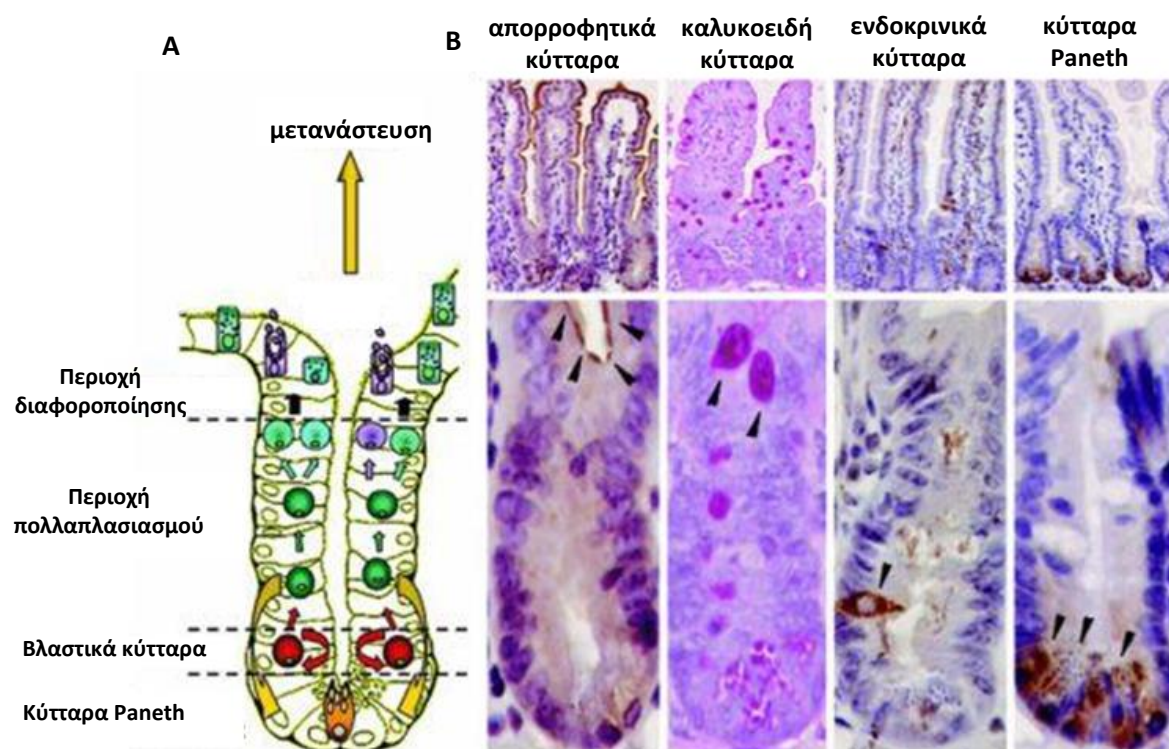
επικάθονται στην βασική μεμβράνη, χωρίς όμως την παρουσία λαχνών. Τα απορροφητικά κύτταρα διαθέτουν ωοειδείς πυρήνες στη βάση του κυττάρου και είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά νερού και ηλεκτρολυτών. Τα καλυκοειδή κύτταρα διαθέτουν κοκκία βλέννας στο κυτταρόπλασμά τους, τα οποία εκκρίνονται, με σκοπό να λιπαίνουν τη διερχόμενη ύλη. Μεταξύ των επιφανειακών επιθηλιακών κυττάρων μπορεί φυσιολογικά να εντοπίζονται ηωσηνόφιλα και λεμφοκύτταρα (Αγνάντη και συν., 2005).



Εικόνα 1.2. Ιστολογική τομή βλεννογόνου του παχέος εντέρου (χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης).

Στον βλεννογόνο του παχέος εντέρου υπάρχουν επιθηλιακοί αδένες που ονομάζονται κρύπτες του Lieberkühn, οι οποίοι επενδύονται με ανώριμα και αδιαφοροποίητα αρχέγονα κύτταρα, εξειδικευμένα νευροενδοκρινικά κύτταρα (που εκκρίνουν ορμόνες, όπως η χρωμογρανίνη) και κύτταρα Paneth (που εκκρίνουν αντιμικροβιακές ουσίες και ένζυμα, όπως η λυσοζύμη). Η σημαντικότερη λειτουργία των κρυπτών είναι η ανανέωση των κυττάρων του επιφανειακού επιθηλίου, τα οποία έχουν πεπερασμένο χρόνο ζωής, καθώς εκπίπτουν στον αυλό ή οδηγούνται σε απόπτωση. Το επιθήλιο του παχέος εντέρου διαθέτει αξιοσημείωτη ικανότητα πολλαπλασιασμού, αφού αντικαθίσταται κάθε 5 περίπου ημέρες από αρχέγονα κύτταρα, τα οποία μετατρέπονται σε απορροφητικά, καλυκοειδή ή ενδοκρινικά κύτταρα (Pinto and Clevers, 2005). Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε μια κρύπτη γίνεται στα τελευταία 5-10

κύτταρα κατά μήκος του άξονα της κρύπτης (ζώνη πολλαπλασιασμού). Επίσης, κατά μήκος του άξονα της κρύπτης αρχίζει η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων (ζώνη διαφοροποίησης) σε ένα από τα τρία είδη ώριμων κυττάρων (απορροφητικά, καλυκοειδή ή ενδοκρινικά), τα οποία παράλληλα μετακινούνται προς το πάνω μέρος της κρύπτης (Εικόνα 1.3). Τα περισσότερα από τα κύτταρα της ζώνης διαφοροποίησης έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού, αλλά συνεχίζουν να γίνονται ολοένα και πιο ώριμα λειτουργικά μέχρι να εκπέσουν από την επιφάνεια. Σχεδόν 95% των καρκινικών όγκων στο παχύ έντερο προέρχονται από το επιθήλιο του εντερικού βλεννογόνου.



Εικόνα 1.3. Οργάνωση κρύπτης Lieberkühn (A). Ανοσοϊστοχημική εντόπιση (βέλη) των βασικών κυτταρικών τύπων μιας κρύπτης Lieberkühn (B): απορροφητικά κύτταρα (χρώση με αλκαλική φωσφατάση), καλυκοειδή κύτταρα (χρώση Schiff), νευροενδοκρινικά κύτταρα (χρώση με συναπτοφυσίνη) και κύτταρα Paneth (χρώση με λυσοζύμη) (Pinto and Clevers, 2005).

1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Το παχύ έντερο συνιστά τη θέση ανάπτυξης των περισσότερων πρωτοπαθών νεοπλασιών από οποιοδήποτε άλλο όργανο του σώματος. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (όρος που συμπεριλαμβάνει τα καρκινώματα του κόλου και του ορθού) ή

ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο, τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες στις Η.Π.Α. και γενικότερα αποτελεί έναν από τους κυρίαρχους τύπους καρκίνου στις δυτικές βιομηχανοποιημένες χώρες. Συνήθως αναπτύσσεται αργά, μέσα σε μια περίοδο 10 έως 15 ετών (American Cancer Society, 2011).

Στο 75% περίπου των περιπτώσεων ο καρκίνος του παχέος εντέρου αναπτύσσεται σε έδαφος προϋπάρχοντος αδενωματώδους πολύποδα (αδενώματος) και είναι σποραδικός, αλλά σε άλλες περιπτώσεις (10% του συνόλου) είναι κληρονομικός. Κληρονομικά σύνδρομα που προδιαθέτουν γενετικά για την εμφάνιση καρκίνου στο παχύ έντερο είναι η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP) και ο κληρονομικός μη πολυποδισιακός καρκίνος παχέος εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC), που πλέον ονομάζεται σύνδρομο Lynch (Morán et al., 2010). Τα αδενώματα είναι οι βασικότερες μορφές προκαρκινικών αλλοιώσεων στον εντερικό βλεννογόνο. Η πιθανότητα εμφάνισής τους αυξάνει δραματικά με την πρόοδο της ηλικίας (άνω των 50 ετών). Η δυνατότητα μετατροπής των αδενωμάτων σε καρκίνο εξαρτάται από το μέγεθος, τον ιστολογικό τύπο (οδοντωτά, σωληνώδη, λαχνοσωληνώδη και λαχνωτά) και το βαθμό δυσπλασίας τους (Naini and Odze, 2013). Περίπου στο 30% των περιπτώσεων σποραδικού καρκίνου, οι ασθενείς έχουν τουλάχιστον έναν εξ αίματος συγγενή 1^{ου} έως 3^{ου} βαθμού που εμφάνισε καρκίνο στο παχύ έντερο ή αδένωμα χωρίς σαφές μοντέλο κληρονομικότητας, γεγονός που υποδηλώνει σε κάποιο βαθμό την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης.

Συνολικά, η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας (50 έτη και άνω) και τα ποσοστά θνησιμότητας είναι περίπου 30% έως 40% υψηλότερα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες. Στις Η.Π.Α. ευθύνεται για το 10-11% των συνολικών κρουσμάτων αλλά και θανάτων από καρκίνο, ενώ στην Ελλάδα το ποσοστό επί των θανάτων από καρκίνο πέφτει στο 7,5%. Η επίπτωση της νόσου τα τελευταία χρόνια (2008-2010) παρουσιάζει σημαντική μείωση της τάξης του 4% περίπου στις Η.Π.Α., χάρη στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία με την εκτεταμένη εφαρμογή της κολonosκόπησης που έχει συμβάλει σημαντικά στην πρόληψη της νόσου, μέσω της εξάλειψης προ-καρκινικών αλλοιώσεων (φλεγμονών, πολυπόδων, αδενωμάτων) που μπορεί να καταλήξουν σε καρκίνο (Siegel et al., 2014).

Βασικότεροι παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου είναι το ατομικό ή οικογενειακό ιατρικό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου, αδενωματοδών πολυπόδων ή χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης στο έντερο, καθώς επίσης και το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η απουσία φυσικής δραστηριότητας, η πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά και κόκκινο κρέας δίαιτα, η ελλιπής κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και το αυξημένο σωματικό βάρος (Chan and Giovannucci, 2010).

Περισσότερο από το 90% των καρκινικών όγκων στο παχύ έντερο είναι αδενοκαρκινώματα, που προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και εντοπίζονται κυρίως στο ορθό ή στο σιγμοειδές. Τα αδενοκαρκινώματα χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση καρκινικών αδενικών σχηματισμών (καρκινωμάτωσης σωληνώδεις βλάστες), με βάση τους οποίους καθορίζεται ο βαθμός αποδιαφοροποίησης του όγκου (grade). Σε καλά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα περισσότερο από το 95% του όγκου είναι αδενικοί σχηματισμοί, ενώ τα λίγο διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα είναι ως επί το πλείστον συμπαγή με αδενικούς σχηματισμούς σε λιγότερο από το 50% του όγκου (Fleming et al., 2012). Τα αδενοκαρκινώματα διακρίνονται σε δυο υποκατηγορίες: το βλεννώδες και το αδενοκαρκίνωμα αποτελούμενο από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cells). Άλλοι, σπάνιοι τύποι καρκινωμάτων του παχέος εντέρου είναι το αδενοπλάκωδες καρκίνωμα, το καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο, το νευροενδοκρινές καρκίνωμα, το μικροκυτταρικό και το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει προτείνει μια διεθνώς αποδεκτή ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Compton, 2003).

Πίνακας 1.1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκινωμάτων παχέος εντέρου κατά τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΤΑ WHO	
Αδενοκαρκίνωμα	Πλακοκυτταρικό καρκίνωμα
Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
Καρκίνωμα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα
Μυελοειδές καρκίνωμα	Άλλα (π.χ. θηλώδες)
Αδενοπλάκωδες καρκίνωμα	

1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πραγματοποίηση εξετάσεων για την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου συνιστάται μετά την ηλικία των 50 ετών σε ασυμπτωματικά άτομα που δεν έχουν αντίστοιχο ατομικό ή οικογενειακό ιατρικό ιστορικό. Σε διαφορετική περίπτωση συνιστάται από νεότερη ηλικία και ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Πλέον, ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί μια ιάσιμη νόσο, αν ανιχνευτεί έγκαιρα, χάρη στις σύγχρονες ενδοσκοπικές τεχνικές που επιτρέπουν την ανίχνευση και απομάκρυνση προ-καρκινικών αλλοιώσεων.

Για την πρόληψη τη νόσου ενδείκνυνται οι δοκιμασίες ανίχνευσης αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα (fecal occult blood test, FOBT ή fecal immunochemical test, FIT) και η νεότερη δοκιμασία μοριακής ανίχνευσης μεταλλάξεων στο DNA κυττάρων του βλεννογόνου του παχέος εντέρου, τα οποία αποπίπτουν με τα κόπρανα (fecal DNA test). Οι πρώτες μοριακές δοκιμασίες στο DNA κοπράνων ανίχνευαν μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *K-ras* που σχετίζεται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, για την ανίχνευση του καρκίνου αυτού προτάθηκαν δοκιμασίες προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης mRNA διαφόρων γονιδίων στα εντερικά κύτταρα που περιέχονται στα κόπρανα. Για παράδειγμα, η ανάλυση mRNA των γονιδίων *COX-2* και *MMP7* έχει ευαισθησία που φτάνει στο 90% (Binefa et al., 2014).

Υπάρχουν διάφορες απεικονιστικές μέθοδοι εξέτασης του παχέος εντέρου, όπως ο βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης (double-contrast barium enema, DCBE), η αξονική ή μαγνητική τομογραφία κοιλίας και η εικονική κολονοσκόπηση (computed tomography colonography, CTC). Ωστόσο, η μέθοδος που συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα για τη διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου διεθνώς είναι η ενδοσκόπηση (ορθοσκόπηση/εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση ή ολική κολονοσκόπηση), διότι είναι ταυτόχρονα απεικονιστική και επεμβατική μέθοδος. Με την ενδοσκόπηση πραγματοποιείται άμεση αφαίρεση των πολυποειδών μορφωμάτων που τυχόν ανευρίσκονται κατά τη διάρκεια της εξέτασης. Η διάγνωση που θέτει η ενδοσκόπηση του παχέος εντέρου, επιβεβαιώνεται με την ιστολογική εξέταση δειγμάτων του μορφώματος που λαμβάνονται μέσω των ενδοσκοπίων (Shah et al., 2014; Cummings and Cooper, 2011).

Ως προς την αντιμετώπιση της νόσου, ο ενδεδειγμένος τρόπος είναι η πλήρης αφαίρεση των αδενωμάτων, ανεξαρτήτως μεγέθους, ιστολογικού τύπου και βαθμού δυσπλασίας. Η χειρουργική αφαίρεση, επίσης, είναι ο συνηθέστερος τρόπος αντιμετώπισης των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Σε λίγες περιπτώσεις είναι αναγκαία η δημιουργία μόνιμης εκτροπής της αποχετευτικής οδού του πεπτικού σωλήνα μέσω κολοστομίας. Χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί πριν ή μετά τη χειρουργική αφαίρεση, σε περιπτώσεις που έχει διεισδύσει βαθιά στα τοιχώματα του εντέρου ή έχει διηθήσει τους παρακείμενους λεμφαδένες, οι οποίοι επίσης αφαιρούνται (American Cancer Society, 2011).

Οι χημειοθεραπευτικές ουσίες που χορηγούνται σήμερα περιλαμβάνουν την οξαλιπλατίνη (oxaliplatin), την 5-φλουουρακίλη (5-fluorouracil/5-FU) συχνά σε συνδυασμό με τη λευκοβορίνη (leucovorin, LV) και την ιρινοτεκάνη (irinotecan), με σημαντικές παρενέργειες στον οργανισμό των ασθενών. Σε μεταστατική νόσο χρησιμοποιούνται και νέες στοχευμένες θεραπείες με μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, όπως το bevacizumab (Avastin) που αναστέλλει την αγγειογένεση, και τα cetuximab (Erbix) και ranitumumab (Vectibix) που παρεμποδίζουν τη δράση των ορμονικών παραγόντων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Catenacci et al., 2011). Όταν ο καρκίνος έχει διηθήσει τους λεμφαδένες και έχει επεκταθεί στο ήπαρ, τους πνεύμονες ή άλλα όργανα, η χειρουργική αφαίρεση και η χημειοθεραπεία συνήθως απλώς επιμηκύνουν την επιβίωση.

1.4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Ο όρος στάδιο (stage) του καρκίνου περιγράφει την έκταση που έχει λάβει ο καρκίνος στο σώμα. Πιο συγκεκριμένα, βασίζεται στο ποσοστό ενδοτοιχωματικής διήθησης, στην προσέγγιση παρακείμενων ιστών και στην εξάπλωση στους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένα όργανα (μετάσταση). Το στάδιο του καρκίνου είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής που πρέπει να ακολουθηθεί, καθώς και της πρόγνωσης.

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου πραγματοποιείται με βάση διάφορα συστήματα ταξινόμησης. Το 1932 ο C.E. Duke πρότεινε ένα σύστημα

ταξινόμησης το οποίο τοποθετούσε τους ασθενείς με καρκίνο του ορθού σε τρεις κατηγορίες (A, B, C), ενώ αργότερα προστέθηκε και μια τέταρτη (D) (Πίνακας 1.2) (Duke, 1932). Σήμερα, το σύστημα κατά Duke's χρησιμοποιείται ευρέως και βρίσκει εφαρμογή όχι μόνο για το ορθό αλλά για όλο το παχύ έντερο.

Πίνακας 1.2. Σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά Duke's.

Στάδιο A	Ο όγκος έχει αναπτυχθεί όχι πέραν του μυϊκού χιτώνα
Στάδιο B	Ο όγκος έχει διηθήσει όλο το πάχος του εντερικού τοιχώματος ως τους περικολικούς ιστούς
Στάδιο C	Ο όγκος έχει διηθήσει τουλάχιστον έναν παρακείμενο λεμφαδένα
Στάδιο D	Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

Το 1954 το σύστημα του Duke τροποποιήθηκε από τους Astler και Coller με την προσθήκη υπο-κατηγοριών, που το καθιστούσαν περισσότερο περιγραφικό (Astler and Coller, 1954). Το σύστημα σταδιοποίησης κατά Astler-Coller χρησιμοποιείται ευρέως και σήμερα (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά Astler-Coller.

Στάδιο A	Ο όγκος περιορίζεται εντός του εντερικού βλεννογόνου
Στάδιο B1	Ο όγκος έχει διηθήσει τον μυϊκό χιτώνα χωρίς να έχει επεκταθεί σε όλο το πάχος του
Στάδιο B2	Ο όγκος διηθεί ολόκληρο το μυϊκό χιτώνα
Στάδιο C1	Ο όγκος περιορίζεται εντός του εντερικού τοιχώματος, αλλά έχει διηθήσει και λεμφαδένες
Στάδιο C2	Ο όγκος έχει διηθήσει εξολοκλήρου το εντερικό τοίχωμα και έχει διηθήσει λεμφαδένες
Στάδιο D	Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

Το 1987 η Αμερικανική Συντονιστική Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer, AJCC) και η Διεθνής Ένωση Ενάντια στον Καρκίνο (International Union Against Cancer, IJCC) εισήγαγαν το σύστημα σταδιοποίησης TNM, το οποίο αξιολογεί το τοπικό βάθος διήθησης του πρωτοπαθούς όγκου (T: tumor size), την απουσία ή παρουσία διηθημένων λεμφαδένων και τον αριθμό τους (N: nodes) και την απουσία ή παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M: metastasis), όπως αναγράφονται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4. Σύστημα TNM για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

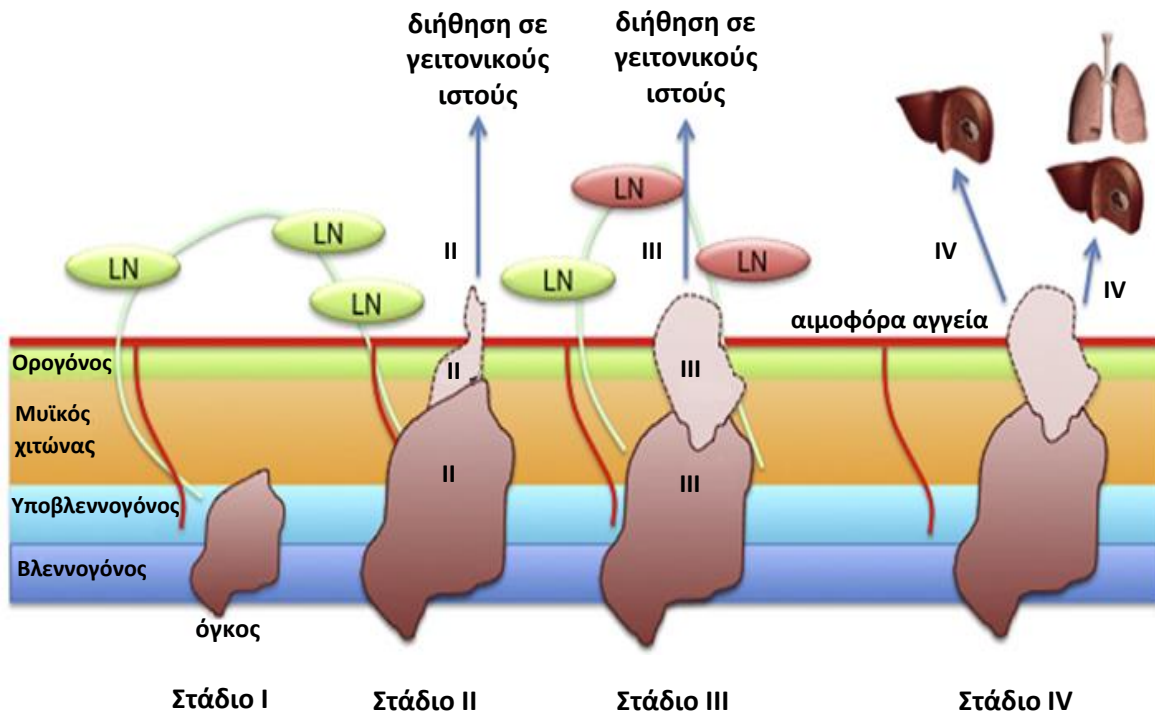
Πρωτοπαθής όγκος (T)	
Tx	Ο όγκος δεν μπορεί να καθορισθεί
To	Απουσία όγκου
Tis	Καρκίνωμα <i>in situ</i>
T1	Ο όγκος έχει διηθήσει τον βλεννογόνο έως και τον υποβλεννογόνο χιτώνα
T2	Ο όγκος έχει διηθήσει έως τον μυϊκό χιτώνα
T3	Ο όγκος έχει διηθήσει ολόκληρο το μυϊκό χιτώνα έως τον ορογόνο ή τον περιτολικό ιστό
T4	Ο όγκος έχει διηθήσει το περιτόναιο ή και άλλα όργανα και δομές
Διήθηση λεμφαδένων (N)	
Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
No	Δεν έχουν διηθηθεί λεμφαδένες
N1	Έχουν διηθηθεί 1-3 επιχώριοι λεμφαδένες
N2	Έχουν διηθηθεί 4 ή περισσότεροι λεμφαδένες
N3	Έχουν διηθηθεί λεμφαδένες κατά μήκος της μεσεντέριας αρτηρίας
Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)	
Mx	Δεν μπορούν να ανιχνευτούν μεταστάσεις
Mo	Δεν υπάρχουν μεταστάσεις
M1	Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

Σύμφωνα με το σύστημα TNM, οι ασθενείς τοποθετούνται σε ένα από τα τέσσερα στάδια (I-IV) που αναγράφονται στον Πίνακα 1.5 και παρουσιάζονται σχηματικά με τις υποκατηγορίες τους στην Εικόνα 1.4.

Πίνακας 1.5. Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Στάδιο 0	Tis	No	Mo
Στάδιο I	T1 /T2	No	Mo
Στάδιο II	T3 /T4	No	Mo
Στάδιο III	Οποιοδήποτε T	N1 /N2	Mo
Στάδιο IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

(Wu, 2007; de Gramont, et al., 2011)



Εικόνα 1.4. Στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου. **Στάδιο I:** ο όγκος έχει εξαπλωθεί στον βλεννογόνο έως και το μυϊκό χιτώνα, αλλά δεν έχει διηθήσει παρακείμενους λεμφαδένες (LN: lymph nodes). **Στάδιο II:** ο όγκος έχει εξαπλωθεί στο μυϊκό χιτώνα έως τον ορογόνο (II A) ή έχει εξαπλωθεί στον ορογόνο χωρίς να έχει διηθήσει γειτονικά όργανα (II B) ή έχει εξαπλωθεί στον ορογόνο και έχει διηθήσει γειτονικά όργανα (II C). **Στάδιο III:** ο όγκος έχει εξαπλωθεί από το βλεννογόνο έως και το μυϊκό χιτώνα και έχει διηθήσει 1 έως 3 παρακείμενους λεμφαδένες (III A) ή έχει εξαπλωθεί και στον ορογόνο αλλά όχι σε γειτονικά όργανα (IIIB) ή έχει εξαπλωθεί στον ορογόνο και σε γειτονικά όργανα και έχει διηθήσει 1 ή περισσότερους παρακείμενους λεμφαδένες (III C). **Στάδιο IV:** ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε όλο ή μέρος του εντερικού τοιχώματος και μέσω του αίματος και των λεμφαδένων έχει δημιουργήσει μετάσταση σε ένα (IV A) ή περισσότερα (IV B) όργανα, όπως το ήπαρ και οι πνεύμονες (Bustin and Murphy, 2013).

1.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ

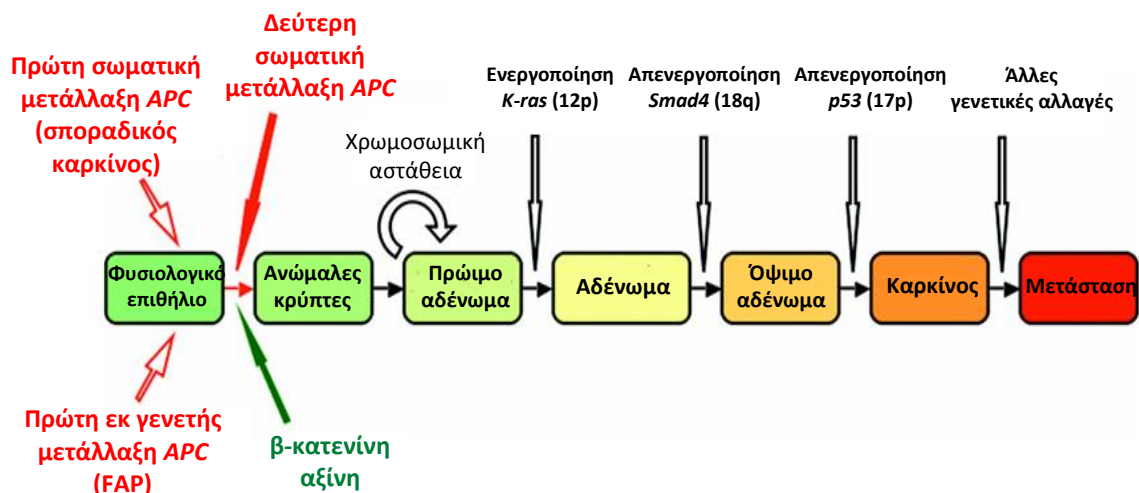
Ο καρκίνος στο παχύ έντερο είναι μια ετερογενής, πολυσταδιακή νόσος οφειλόμενη σε διαφορετικά μονοπάτια καρκινογένεσης. Ως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τέσσερα μονοπάτια καρκινογένεσης του σποραδικού καρκινώματος του παχέος εντέρου: το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (Chromosomal Instability, CIN), το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (Microsatellite Instability, MSI), το μονοπάτι του φαινότυπου μεθυλιωτή CpG νησίδων (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP) και το οδοντωτό μονοπάτι (Serrated pathway) (Harrison and Benziger, 2011). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μονοπατιών αποτελεί η συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στα κύτταρα, οι οποίες οδηγούν στον καρκινικό φαινότυπο. Σε μοριακό επίπεδο τα πιο κοινά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που φέρουν

μεταλλαγμένα γονίδια στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι τα RAS/RAF/MEK/ERK, Wnt-APC-β-catenin και το TGFβ1-SMAD (Lao and Grady, 2011).

1.5.1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ

Σύμφωνα με το μοντέλο που πρότειναν οι Fearon και Vogelstein (1990), η καρκινογένεση στο παχύ έντερο είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, κατά την οποία οι γενετικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο οδηγούν σε υπερπλασία, αδενωματώδη δυσπλασία μέσω μικρο-διήθησης, αδenoκαρκίνωμα και τέλος μετάσταση (Fearon and Vogelstein, 1990). Η διαδικασία αυτή ονομάστηκε μονοπάτι χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN pathway), διότι οι όγκοι που προκύπτουν (~75% των καρκίνων παχέος εντέρου) χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα ανισορροπίας αλληλομόρφων, λόγω ανευπλοειδίας ή δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως διπλασιασμοί και μετατοπίσεις. Οι περισσότεροι αδενωματώδεις πολύποδες μεταπίπτουν σε καρκινώματα μέσω χρωμοσωμικής αστάθειας (Anwar et al., 2004). Από την κλινική σκοπιά, έχει δειχθεί ότι το μονοπάτι της καρκινογένεσης μέσω χρωμοσωμικής αστάθειας συσχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς (Pritchard and Grady, 2011).

Το μονοπάτι αυτό συνδέεται με μια αρχική μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC (Adenomatous polyposis coli) ή/και έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5, όπου εδράζεται το APC. Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται τόσο σε προκαρκινικές αλλοιώσεις όσο και στον καρκίνο και θεωρείται πρωταρχικής σημασίας για την έναρξη του μετασχηματισμού σε αδένωμα. Οι σωματικές μεταλλάξεις του APC οδηγούν σε σποραδικό καρκίνο παχέος εντέρου, ενώ οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις του σχετίζονται με την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (FAP). Στη συνέχεια της εξέλιξης της νόσου, προκύπτουν περαιτέρω μεταλλάξεις, όπως η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *K-ras* αλλά και ελλείψεις ή απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH) στα χρωμοσώματα 18q και 17p, όπου εδράζονται τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *DCC*, *SMAD4* και *TP53* αντίστοιχα.



Εικόνα 1.5. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *APC*, *β-catenin* ή *axin* είναι απαραίτητες για την έναρξη της καρκινογένεσης. Η επακόλουθη εξέλιξη της κακοήθειας συνοδεύεται από χρωμοσωμική αστάθεια και ακόμη περισσότερες μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια: *K-ras*, *SMAD4*, *TP53* και σε άλλα άγνωστα γονίδια (Fearon and Vogelstein, 1990).

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *APC* φυσιολογικά εμπλέκεται στη ρύθμιση της β-κατενίνης (ογκογονίδιο), στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και στην κυτταρική προσκόλληση, καθώς και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη *APC* συμμετέχει στο σχηματισμό ενός συμπλόκου μαζί με την αξίνη και την κινάση 3β της συνθάσης γλυκογόνου (*GSK3B*), το οποίο προσδένει και φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την αναγνώριση της β-κατενίνης από σύμπλοκα ουμπικιτίνης και οδηγεί στην αποδόμησή της στο πρωτεόσωμα. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης *APC* στη β-κατενίνη οδηγεί σε καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt (Wingless pathway), το οποίο εμπλέκεται στη μορφογένεση διαφόρων οργάνων κατά την ανάπτυξη, στη ρύθμιση της απόπτωσης και της διαφοροποίησης και έχει έναν ιδιαίτερο ρόλο στην ομοιόσταση επιμέρους περιοχών των ιστών, όπου εδράζονται αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα, όπως είναι οι κρύπτες του εντερικού επιθηλίου. Εντός των κρυπτών οι παράγοντες Wnt παράγονται φυσιολογικά από μεσεγχυματικά κύτταρα κοντά στη θέση των αρχέγονων κυττάρων, επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαίωξη του πληθυσμού τους (Worthley and Leggett, 2010; Gregorieff and Clevers, 2005).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *APC* έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός κολοβωμένου πρωτεϊνικού προϊόντος, το οποίο δεν μπορεί να προσδεθεί στη β-

κατενίνη. Έτσι, ενεργοποιείται η σηματοδότηση Wnt, η β-κατενίνη δεν αποδομείται και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου εμφανίζεται σε αυξημένα επίπεδα και δρα ως μεταγραφικός συμπαράγοντας σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Tcf/LEF (Kennell and Cadigan, 2009; Beachy et al., 2004). Το γεγονός αυτό επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων των παραγόντων Tcf, μεταξύ των οποίων βρίσκονται γονίδια που εμπλέκονται άμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως τα *CCDN1* και *MYC* (van de Wetering et al., 2002). Η απαίτηση για συνεχή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στον καρκίνο φαίνεται ότι εξυπηρετεί τη συνεχή επαγωγή της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των αδιαφοροποίητων κυττάρων των κρυπτών Lieberkühn, από τις οποίες προκύπτουν οι καρκινικοί όγκοι (Gregorieff and Clevers, 2005).

Στην πορεία των βημάτων της καρκινογένεσης ενεργοποιείται το πρωτο-ογκογονίδιο *K-ras*, το οποίο κωδικοποιεί για μια μικρή πρωτεΐνη (GTPάση) που δεσμεύει GTP και εδρεύει στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνη Ras φυσιολογικά εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, που ενεργοποιείται μετά τη σύνδεση διαφόρων μορίων-προσδετών (ligands) σε ποικίλους μεμβρανικούς υποδοχείς, με αποτέλεσμα την επακόλουθη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν μίτωση, όπως τα μονοπάτια των MAP κινασών (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs). Η πρωτεΐνη Ras είναι ενεργή όταν έχει συνδεθεί με GTP, ενώ η υδρόλυση του GTP σε GDP την καθιστά ανενεργή. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, το πρωτο-ογκογονίδιο *K-ras* ενεργοποιείται από σημειακές μεταλλάξεις που ελαττώνουν την ενεργότητα GTPάσης της πρωτεΐνης Ras και επιμηκύνουν την ενεργό κατάσταση, κατά την οποία η πρωτεΐνη μετάγει μιτογόνα σήματα. Έτσι, διεγείρεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του όγκου, ευνοώντας τη μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα. Οι μεταλλάξεις ενεργοποίησης του *K-ras* φαίνεται να ακολουθούν τις μεταλλάξεις του *APC* και έχουν ανιχνευτεί στο 35-42% των καρκινωμάτων στο παχύ έντερο και σε παρόμοιο ποσοστό αδενωμάτων με υψηλή δυσπλασία, ενώ αντίθετα τα καλοήγη πολυποειδή μορφώματα δεν έχουν το γονίδιο αυτό μεταλλαγμένο (Worthley and Leggett, 2010; Wang et al., 2006).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *DCC*, *SMAD4* και *SMAD2* εδράζονται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 18 και εμφανίζουν απώλεια ετεροζυγωτίας στο 60%

περίπου των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Το γονίδιο *DCC* (Deleted in colorectal carcinoma) εμφανίζεται μεταλλαγμένο σε πιο προχωρημένα στάδια καρκίνου, αν και ο ρόλος του στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου έχει αμφισβητηθεί. Γενικά, η έλλειψη του *DCC* δεν θεωρείται βασική γενετική αλλαγή για το σχηματισμό ενός όγκου, αλλά μία από τις πολλές μεταλλάξεις που μπορούν να συμβάλλουν στην περαιτέρω ανάπτυξη του υπάρχοντος όγκου (Kheiriseid et al., 2013). Αντίθετα, μεταλλάξεις απενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων *SMAD4* ή *SMAD2*, που αποτελούν σημαντικά μόρια μεταγωγής σήματος στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGFβ (Transforming Growth Factor beta), έχει διαπιστωθεί ότι οδηγούν σε απενεργοποίηση της σηματοδότησης TGFβ, γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη καρκίνου. Το σηματοδοτικό μονοπάτι TGFβ καταλήγει στη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τον οποίο φυσιολογικά καταστέλλουν. Οι εκ γενετής μεταλλάξεις του *SMAD4* οδηγούν στο κληρονομικό σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης (Juvenile Polyposis Syndrome, JPS) που συσχετίζεται με καρκίνο στο παχύ έντερο (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* εδράζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα p53 (tumor protein p53), ο οποίος στην ενεργή μορφή του επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που επιβραδύνουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ώστε να παρέχουν επαρκή χρόνο για την επιδιόρθωση του DNA, όταν έχει αναγνωριστεί κάποια βλάβη σε αυτό. Όταν όμως, η γενετική βλάβη που έχει υποστεί το κύτταρο είναι πολύ εκτεταμένη και δεν είναι δυνατή η επιδιόρθωσή της, η πρωτεΐνη p53, επάγει τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών γονιδίων που οδηγούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Επιπλέον, αναστέλλει την αγγειογένεση μέσω επαγωγής της θρομβοσπονδίνης (THBS1) (Mills, 2005). Οι μεταλλάξεις του *TP53* σε συνδυασμό με απώλεια ετεροζυγωτίας του φυσιολογικού αλληλομόρφου, αποτελούν όψιμο συμβάν στο κλασικό μονοπάτι που συνοδεύει τη μετάβαση από αδένωμα σε αδenoκαρκίνωμα και παρατηρούνται στο 50% των αδενωμάτων με εστίες διήθησης και στο 50% ως 75% των ορθοκολικών καρκίνων (Worthley and Leggett, 2010).

Για την εξέλιξη ενός όγκου στο παχύ έντερο σε διηθητικό μεταστατικό καρκίνο, είναι απαραίτητη η συσσώρευση διαφόρων περαιτέρω γενετικών αλλοιώσεων, όμως οι

ελάχιστες απαραίτητες συνθήκες για τη μετάβαση αυτή φαίνεται να περιλαμβάνουν τη συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt, την ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος από το Ras, την απώλεια της λειτουργικότητας του p53 και την απενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος από το μονοπάτι TGFβ. Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας που συνοδεύει την παθολογική μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα, έχει αποτελέσει μια βάση για το μοριακό χαρακτηρισμό της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, αλλά είναι πλέον σαφές ότι ο καρκίνος αυτός μπορεί να αναπτυχθεί και μέσω άλλων μοριακών οδών.

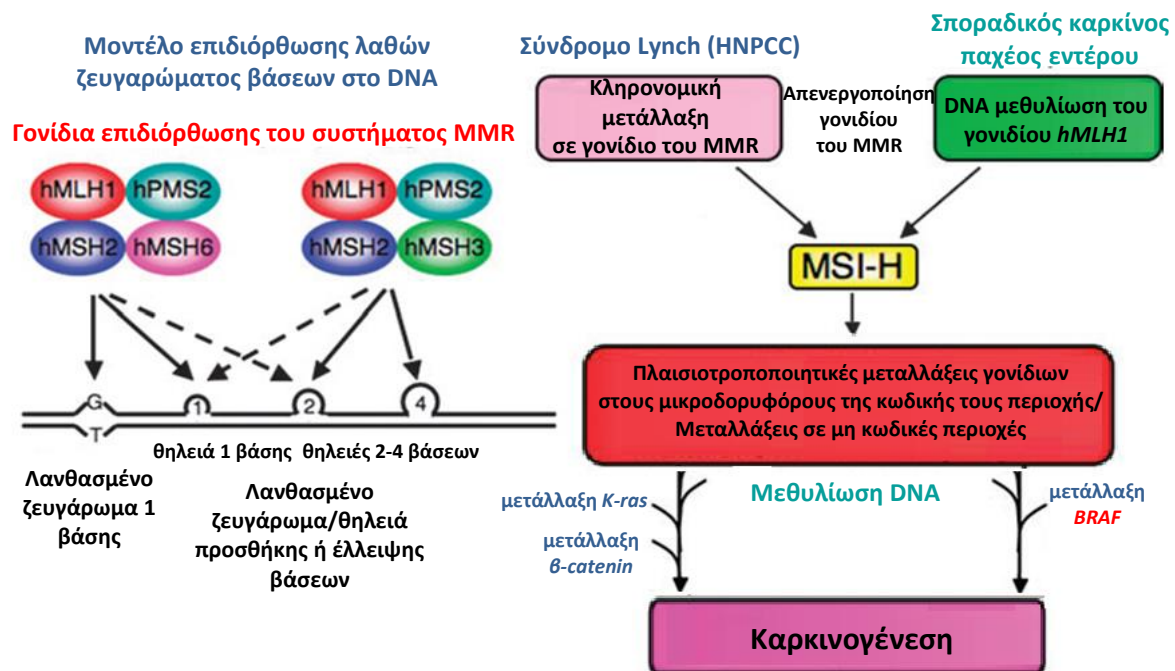
1.5.2. ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ

Η μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability, MSI) είναι μια μορφή γονιδιωματικής αστάθειας, που οφείλεται σε μεταλλάξεις στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες DNA που υπάρχουν διάσπαρτες σε όλο το γονιδίωμα (Harrison and Benziger, 2011). Αυτή η οδός καρκινογένεσης ονομάζεται διαφορετικά και μονοπάτι των μεταλλακτών (mutator pathway), διότι επιταχύνει τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε πολλά γονίδια σχετιζόμενα με τον καρκίνο, τα οποία διαθέτουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Morán et al., 2010).

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μονο- ή δι- ή ολιγο- νουκλεοτίδια, όπως (A)_n ή (CA)_n και είναι ιδιαίτερα πιθανό να εμφανίσουν λάθη ζευγαρώματος βάσεων κατά την αντιγραφή του DNA. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην εισαγωγή λανθασμένου νουκλεοτιδίου είτε στην «ολίσθηση» (slippage) των DNA πολυμερασών στις αλληλουχίες αυτές, γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει μια παροδική θηλειά προσθήκης ή έλλειψης βάσεων. Τα λάθη αυτά φυσιολογικά επιδιορθώνονται από το σύστημα επιδιόρθωσης του λανθασμένου ζευγαρώματος βάσεων (Mismatch repair, MMR), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και την επιδιόρθωση λαθών που κάνουν οι DNA πολυμεράσες κατά την αντιγραφή και είναι ιδιαίτερα συντηρημένο εξελικτικά από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Αν τα λάθη δεν επιδιορθωθούν, οδηγούν σε μετάλλαξη στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA: το λανθασμένο ζευγάρωμα μίας βάσης έχει ως συνέπεια την εμφάνιση κάποιας σημειακής μετάλλαξης, ενώ η προσθήκη ή έλλειψη βάσεων σε μια μικροδορυφορική αλληλουχία που βρίσκεται στην κωδική περιοχή ενός γονιδίου, έχει ως συνέπεια την αλλαγή του

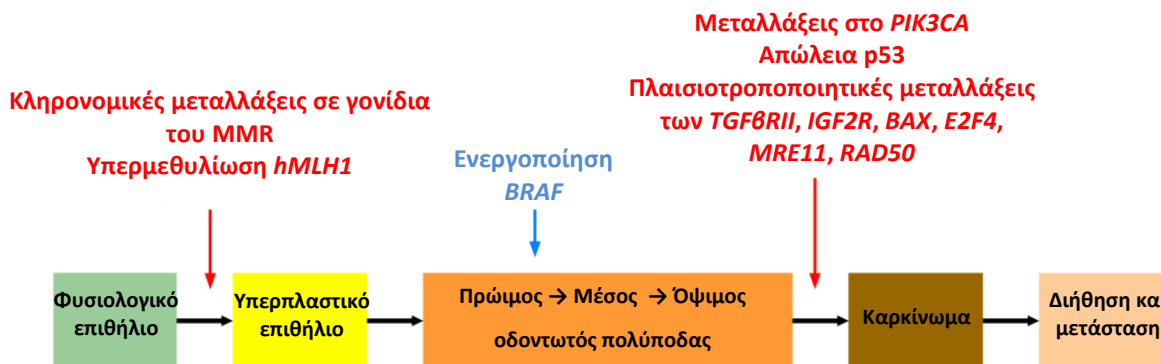
πλασίου ανάγνωσης που με τη σειρά της οδηγεί στην παραγωγή μιας κολοβωμένης πρωτεΐνης με απώλεια της λειτουργικότητάς της (Boland and Goel, 2010).

Το σύστημα επιδιόρθωσης MMR περιλαμβάνει τουλάχιστον επτά διαφορετικές πρωτεΐνες (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 και PMS2), οι οποίες συνδέονται με διάφορους τρόπους μεταξύ τους για να σχηματίσουν ετεροδιμερή που αναγνωρίζουν και επιδιορθώνουν λάθη στο ζευγάρι των βάσεων. Συγκεκριμένα, μόλις αναγνωριστεί ένα λανθασμένο ζευγάρι, η MSH2 σχηματίζει ένα ετεροδιμερές σύμπλεγμα είτε με την MSH6 είτε με την MSH3, που ονομάζεται MutSα ή MutSβ αντίστοιχα. Επίσης, η MLH1 σχετίζεται με την PMS2, την PMS1 ή την MLH3 σχηματίζοντας τα συμπλέγματα MutLα, MutLβ ή MutLγ, αντίστοιχα. Η αναγνώριση των λανθασμένων ζευγών και των θηλειών προσθήκης ή έλλειψης βάσεων πραγματοποιείται από το συνδυασμό ενός MutS και ενός MutL συμπλέγματος, το οποίο αλληλεπιδρά με τον παράγοντα C της αντιγραφής. Ακολουθεί απομάκρυνση του λανθασμένου τμήματος με εκτομή, από πρωτεΐνες όπως η εξωνουκλεάση-1 και το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA), ενώ η αντικατάσταση με τα σωστά νουκλεοτίδια και η σύνδεση μεταξύ τους πραγματοποιούνται από τη DNA πολυμεράση δ και τη DNA δεσμάση αντίστοιχα (Vilar and Gruber, 2010; Shah et al., 2010).



Εικόνα 1.6. Το μοντέλο του συστήματος επιδιόρθωσης MMR και οι μοριακές οδοί στα καρκινώματα του παχέος εντέρου που χαρακτηρίζονται από υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (Imai and Yamamoto, 2008).

Η μικροδορυφορική αστάθεια διαφέρει από τη χρωμοσωμική αστάθεια στο ότι εμφανίζει φυσιολογικό καρυότυπο. Οι όγκοι που φέρουν μεταλλάξεις σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες διακρίνονται σε όγκους υψηλής (MSI-high) και χαμηλής (MSI-low) αστάθειας, αναλόγως των ποσοτικών διαφορών τους στον αριθμό ασταθών γενετικών θέσεων (Poulogiannis et al., 2010). Το ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης MMR που φέρουν οι όγκοι υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας, προσδίδει συγκεκριμένα μοριακά, παθολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, όπως η έκκριση βλέννας, η χαμηλή διαφοροποίηση, η σημαντική λεμφοκυτταρική διήθηση, η οδοντωτή μορφολογία στη βάση των καρκινικών αδενίων και η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *TGFBR2*, *BAX*, *BRAF*, *MRE11A*, *IGF2R*, *RAD50* (Imai and Yamamoto, 2008; Vilar and Gruber, 2010). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι πολλά γονίδια που διαθέτουν μικροδορυφορικές επαναλήψεις είναι μεταλλαγμένα σε MSI-high καρκίνους του παχέος εντέρου, όπως τα γονίδια που προαναφέρθηκαν (Kheirleisid et al., 2013). Ο σποραδικός MSI καρκίνος συσχετίζεται με την πρόοδο της ηλικίας και το φύλο, καθώς εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες (Markowitz and Bertagnolli, 2009).



Εικόνα 1.7. Η πορεία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο οφειλόμενη σε μικροδορυφορική αστάθεια (Vilar and Gruber, 2010).

Το πρωτο-ογκογονίδιο *BRAF* κωδικοποιεί για μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται από την αλληλεπίδρασή της με το Ras και είναι ενδιάμεσο μόριο στο μονοπάτι σηματοδότησης RAS/RAF/MEK/ERK. Μέσω του μονοπατιού αυτού μεταγεται σήμα από το εξωκυττάριο περιβάλλον προς τον πυρήνα, οδηγώντας στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που παίζουν σημαντικούς ρόλους στη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη, την απόπτωση ή τη διαφοροποίηση. Η συνεχής ενεργοποίηση του μονοπατιού

οδηγεί σε αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη που μπορεί να ευνοήσει τη διήθηση και τη μετάσταση. Έχουν εξακριβωθεί συγκεκριμένες μεταλλάξεις του *BRAF* που συνυπάρχουν με τη μικροδορυφορική αστάθεια, με κυρίαρχη τη μετάλλαξη ενεργοποίησης *BRAF*^{V600E}. Η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται στο 40-50% των όγκων υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας. Συνολικά, το γονίδιο *BRAF* εμφανίζει μεταλλάξεις στο 10% περίπου των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια, ενώ στους καρκίνους που οφείλονται στο σύνδρομο Lynch δεν είναι μεταλλαγμένο (Cantwell-Dorris et al., 2011; Thiel and Ristimäki, 2013).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TGFBR2* που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα TGFβ στο αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι TGFβ, περιέχει επαναλαμβανόμενη αλληλουχία πολυαδενίνης στην κωδική περιοχή του και μπορεί να εμφανίσει πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις απενεργοποίησης, λόγω της δυσλειτουργίας του συστήματος επιδιόρθωσης MMR (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Έτσι, απενεργοποιείται η μεταγωγή σήματος μέσω του TGFβ, γεγονός που επάγει την ανάπτυξη καρκίνου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Ομοίως, το προ-αποπτωτικό γονίδιο *BAX* συχνά απενεργοποιείται σε όγκους υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας, γιατί περιέχει μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις στην κωδική περιοχή του (Imai and Yamamoto, 2008).

Οι ασθενείς με όγκους του παχέος εντέρου που φέρουν μεταλλάξεις σε μικροδορυφόρους έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνους που φέρουν χρωμοσωμική αστάθεια. Μικροδορυφορική αστάθεια παρατηρείται περίπου στο 15% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, εκ των οποίων περίπου 3% αντιστοιχεί σε περιπτώσεις που οφείλονται στο σύνδρομο Lynch (HNPCC) και περίπου 12% σε σποραδικό καρκίνο (Morán et al., 2010).

1.5.3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΤΗ CpG ΝΗΣΙΔΩΝ

Εκτός των μοριακών οδών της χρωμοσωμικής και της μικροδορυφορικής αστάθειας που ήταν ήδη γνωστό ότι οδηγούν σε καρκινογένεση στο παχύ έντερο, το 1999 προτάθηκε από τους Toyota και συν. ένα νέο μοριακό μονοπάτι, αυτό του φαινότυπου μεθυλιωτή CpG νησίδων (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP) (Toyota et al., 1999). Το μονοπάτι αυτό χαρακτηρίζεται από επιγενετική αστάθεια, η οποία οδηγεί στην

αποσιώπηση της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων εξαιτίας υπερ-μεθυλίωσης των υποκινητών τους και συνοδεύεται από συνολική υπο-μεθυλίωση του γονιδιώματος των κυττάρων. Περίπου 15% των σποραδικών καρκίνων παχέος εντέρου οφείλονται στο φαινότυπο μεθυλιωτή, ο οποίος γι' αυτό το λόγο συνιστά τη δεύτερη συχνότερη μοριακή οδό καρκινογένεσης μετά τη χρωμοσωμική αστάθεια (Harrison and Benziger, 2011).

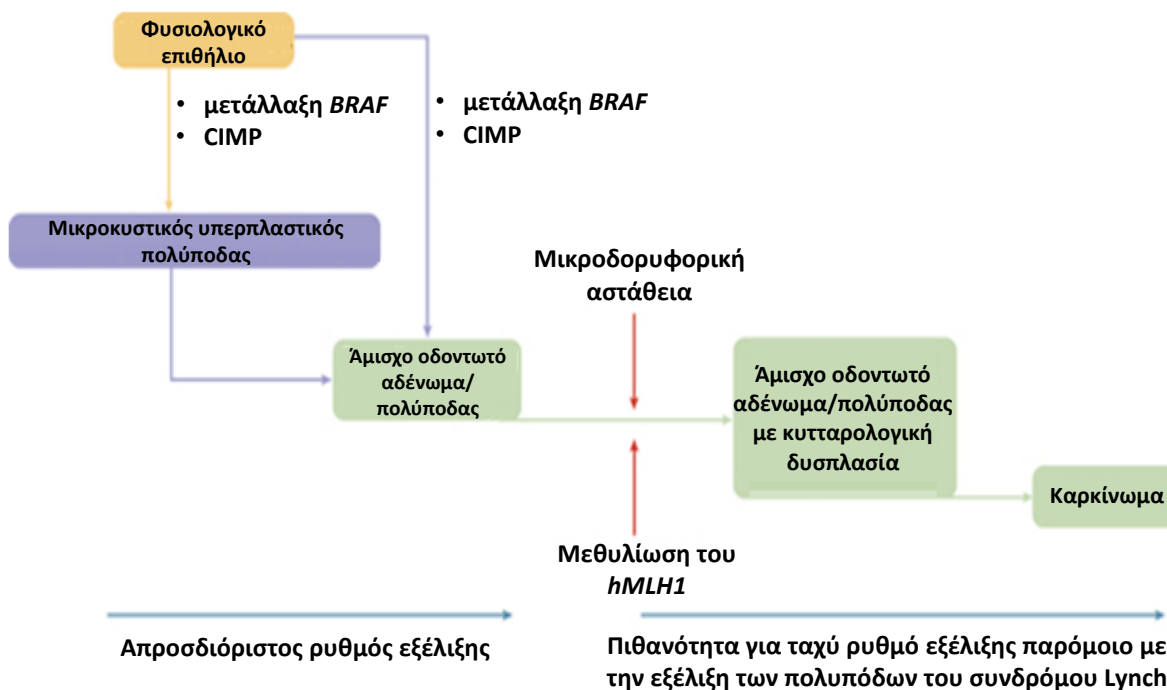
Η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός που κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, την εμβρυϊκή ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Η μεθυλίωση του DNA είναι μια ενζυμική διεργασία μέσω της οποίας προστίθεται μια μεθυλική ομάδα στη θέση 5 της κυτοσίνης από DNA μεθυλοτρανφεράσες και έτσι παράγεται η 5-μεθυλκυτοσίνη. Οι CpG (cytosine preceding guanine) νησίδες είναι αλληλουχίες του γονιδιώματος πλούσιες σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης, οι οποίες απαντώνται συχνά στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων και είναι επιρρεπείς στην υπερ-μεθυλίωση. Έχει βρεθεί ότι στο 50% περίπου των γονιδίων η έκφραση ρυθμίζεται φυσιολογικά μέσω μεθυλίωσης των υποκινητών τους (Nazemalhosseini Mojarad et al., 2013). Τροποποιήσεις των ιστονών της χρωματίνης σηματοδοτούν τις CpG περιοχές που προορίζονται για μόνιμη μεθυλίωση. Η μεθυλίωση του υποκινητή ενός γονιδίου οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπηση της έκφρασής του (Boland and Goel, 2010).

Στους περισσότερους καρκίνους CIMP το γονίδιο *hMLH1* του συστήματος επιδιόρθωσης MMR υφίσταται υπερ-μεθυλίωση σε νησίδες CpG που διαθέτει στην περιοχή του υποκινητή του, γεγονός που οδηγεί στην επιγενετική μεταγραφική του απενεργοποίηση. Όταν υπερ-μεθυλώνονται στην περιοχή του υποκινητή και τα δυο αλληλόμορφα του *hMLH1*, η έκφραση του γονιδίου χάνεται και επακολουθεί υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια, η οποία περιγράφηκε προηγουμένως (Geiersbach and Samowitz, 2011). Επιπλέον, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *BRAF*^{V600E} και του φαινότυπου μεθυλιωτή του καρκίνου του παχέος εντέρου, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο του ενεργοποιημένου *BRAF* στην παθογένεση του φαινοτύπου μεθυλιωτή και μια σύνδεση μεταξύ των μονοπατιών του φαινότυπου μεθυλιωτή και της μικροδορυφορικής αστάθειας (Pritchard and Grady, 2011; Cantwell-Dorris et al., 2011).

Είναι σημαντικό ότι οι καρκινικοί όγκοι CIMP προέρχονται από διαφορετικές προκαρκινικές αλλοιώσεις από ότι οι όγκοι του παχέος εντέρου που προκύπτουν μέσω των υπόλοιπων μονοπατιών. Οι όγκοι που αναπτύσσονται μέσω χρωμοσωμικής αστάθειας αλλά και λόγω του συνδρόμου Lynch (HNPCC), προέρχονται από αδενωματώδεις πολύποδες, που χαρακτηρίζονται από κάποιο βαθμό δυσπλασίας (ήπια, μέτρια, μεγάλη). Εκείνοι, όμως, που αναπτύσσονται μέσω μεθυλίωσης προέρχονται κυρίως από άμισχους οδοντωτούς πολύποδες που ονομάζονται και άμισχα οδοντωτά αδενώματα (sessile serrated adenomas) και έχουν εμφάνιση απλού υπερπλαστικού πολύποδα. Στην πραγματικότητα όμως, τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα αποτελούν προκαρκινικά στάδια της καρκινογένεσης CIMP, δεν είναι δυσπλαστικά και καθορίζονται από συγκεκριμένη αρχιτεκτονική των εντερικών κρυπτών τους. Διαθέτουν πριονωτού τύπου αναδιπλώσεις του κρυπτικού επιθηλίου τους, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της ελαττωμένης απόπτωσης και της καθυστέρησης της μετανάστευσης των κυττάρων από την κρύπτη προς την επιφάνεια. Συνήθως έχουν μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *BRAF* και χαρακτηρίζονται από συνεχή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK, στο οποίο συμμετέχει η πρωτεΐνη *BRAF*. Συγκεκριμένα, οι μικροκυστικοί (microvesicular) υπερπλαστικοί πολύποδες εμφανίζουν υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του *BRAF* και είναι πρόδρομοι των άμισχων οδοντωτών αδενωμάτων, επομένως είναι πολύ πιθανό να αποτελούν τους πρόδρομους πολύποδες της καρκινογένεσης CIMP. Τα χαρακτηριστικά αυτά δεν υπάρχουν στους κλασικούς αδενωματώδεις πολύποδες, οι οποίοι αποτελούν τις τυπικές προκαρκινικές αλλοιώσεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Worthley and Leggett, 2010).

Ο επιγενετικός μοριακός μηχανισμός που οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων μέσω υπερ-μεθυλίωσης των υποκινητών τους σε συνδυασμό με την υπο-μεθυλίωση του συνολικού DNA, δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από το φαινότυπο μεθυλιωτή θεωρούνται πλέον ως μια ξεχωριστή κατηγορία καρκίνων με ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά, αλλά δεν έχει διαλευκανθεί η πιθανή κλινική σημασία αυτού του διαχωρισμού, διότι δεν είναι εξακριβωμένες οι μοριακές οδοί που οδηγούν στο συγκεκριμένο φαινότυπο. Ωστόσο, έχει προταθεί περαιτέρω κατηγοριοποίηση των όγκων CIMP σε όγκους υψηλού (CIMP-high) και όγκους χαμηλού (CIMP-low) βαθμού μεθυλίωσης, αναλόγως των ποσοτικών διαφορών τους

στην υπερ-μεθυλίωση των CpG νησίδων (Harrison and Benziger, 2011). Όγκοι που εξελίσσονται μέσω του μονοπατιού CIMP πλήττουν κυρίως γυναίκες προχωρημένης ηλικίας και ο τελικός καρκινικός φαινότυπος επηρεάζεται περαιτέρω από την παρουσία ή μη ταυτόχρονης μικροδορυφορικής αστάθειας, η οποία μπορεί να προκληθεί λόγω της μεταγραφικής αποσιώπησης του γονιδίου *hMLH1*. Οι όγκοι CIMP που ταυτόχρονα έχουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια, έχουν σχετικά καλή πρόγνωση, ενώ απουσία υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας ο φαινότυπος CIMP χαρακτηρίζεται από υψηλή παθολογία, απουσία λεμφοκυτταρικής διήθησης και δυσμενέστερη πρόγνωση (Worthley and Leggett, 2010).



Εικόνα 1.8. Η πιθανή πορεία του φαινότυπου μεθυλιωτή CpG νησίδων στην καρκινογένεση υψηλής μεθυλίωσης του παχέος εντέρου συνοδευόμενη από μικροδορυφορική αστάθεια (Rex et al., 2012).

1.5.4. ΟΔΟΝΤΩΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

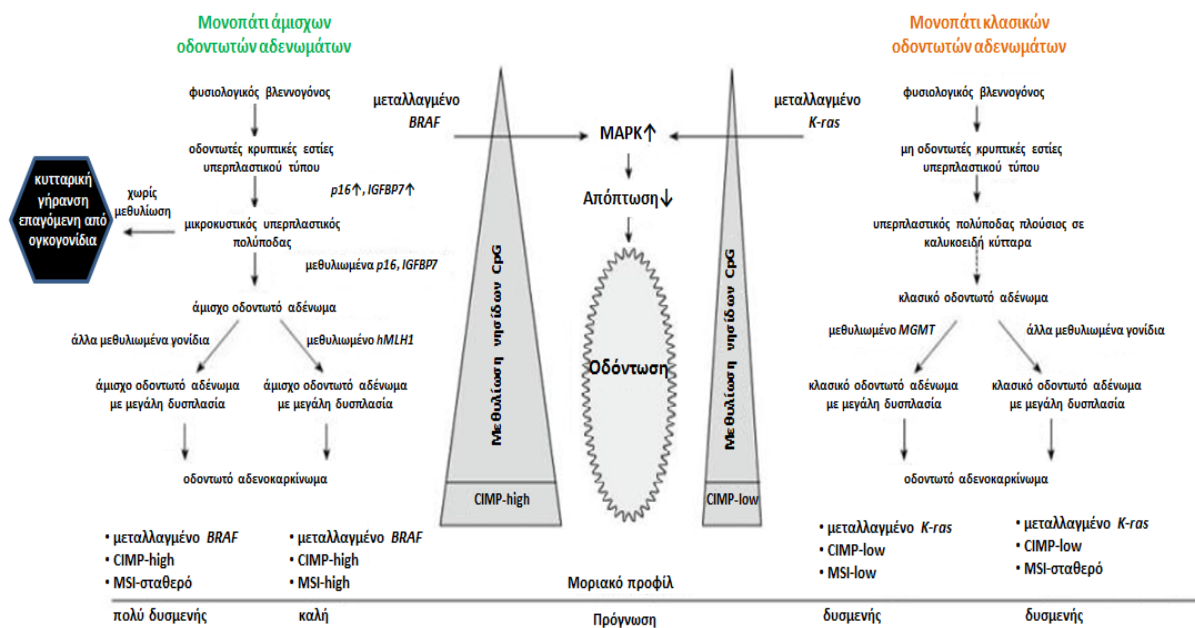
Το οδοντωτό μονοπάτι (Serrated pathway) έχει αναγνωριστεί ως ξεχωριστή οδός καρκινογένεσης στο παχύ έντερο σχετικά πρόσφατα (Leggett and Whitehall, 2010). Πριν την ανακάλυψή του, οι πολύποδες του παχέος εντέρου κατηγοριοποιούνταν σε αδενώματα και υπερπλαστικούς πολύποδες, οι οποίοι θεωρούνταν καλοήθεις χωρίς

δυνατότητα καρκινικού μετασχηματισμού. Σήμερα έχει γίνει σαφές ότι οι μέχρι πρότινος θεωρούμενοι υπερπλαστικοί πολύποδες στην πραγματικότητα περιλαμβάνουν τα κλασικά οδοντωτά αδενώματα (traditional serrated adenomas), τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα (sessile serrated adenomas) και τους πραγματικούς καλοήθεις υπερπλαστικούς πολύποδες. Συγκεκριμένα, το 2003 οι Torlakovic και συν. πρότειναν τον περαιτέρω διαχωρισμό των οδοντωτών αδενωμάτων σε κλασικά οδοντωτά αδενώματα και σε άμισχα οδοντωτά αδενώματα, τα οποία ενώ έχουν οδοντωτή μορφολογία στις κρύπτες τους, δεν διαθέτουν κυτταρολογική δυσπλασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Torlakovic et al., 2003).

Τα κλασικά οδοντωτά αδενώματα διαφέρουν από τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα στο ότι περιέχουν έναν ομοιογενή πληθυσμό ανώμαλων κυττάρων, ενώ τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα δεν είναι τόσο ομοιόμορφα. Και οι δυο κατηγορίες αδενωμάτων μπορούν να αναπτυχθούν σε οδοντωτά αδενοκαρκινώματα αλλά μέσω διαφορετικών οδών: τα κλασικά οδοντωτά αδενώματα εξελίσσονται σε οδοντωτά αδενοκαρκινώματα με χαμηλή ή καθόλου μικροδορυφορική αστάθεια, ενώ τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα εξελίσσονται σε οδοντωτά αδενοκαρκινώματα με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (Εικόνα 1.9). Μεταλλάξεις του *K-ras* έχουν βρεθεί στο 80% των κλασικών οδοντωτών αδενωμάτων αλλά είναι σπάνιες στα άμισχα οδοντωτά αδενώματα, τα οποία χαρακτηρίζονται κυρίως από μεταλλάξεις του *BRAF*, οι οποίες, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σχετίζονται έντονα με την ανώμαλη γονιδιακή μεθυλίωση. Οι μεταλλάξεις των *K-ras* και *BRAF* είναι αμοιβαία αποκλειόμενες και αυτό υποδηλώνει ότι μετάλλαξη σε ένα από τα δυο αυτά σημαντικά ενδιάμεσα μόρια του μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK αρκεί για να πυροδοτήσει τον καρκινικό μετασχηματισμό (Leggett and Whitehall, 2010; Harrison and Benziger, 2011).

Οι πρόδρομες αλλοιώσεις των άμισχων οδοντωτών αδενωμάτων είναι οι μικροκυστικοί υπερπλαστικοί πολύποδες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία επιθηλιακών κυττάρων με μικροκυστίδια που περιέχουν βλέννα και βρίσκονται στο ανώτερο τμήμα των κρυπτών και μειωμένο αριθμό και ανωμαλίες των καλυκοειδών κυττάρων σε σύγκριση με το φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο. Οι μικροκυστικοί υπερπλαστικοί πολύποδες διαθέτουν εξέχουσα οδόντωση κυρίως στο άνω μισό των κρυπτών και έχουν εκτεταμένη περιοχή πολλαπλασιασμού. Η συνολική αρχιτεκτονική

τους είναι ελαφρά διαφορετική από εκείνη των καλοηθών υπερπλαστικών πολυπόδων και χαρακτηρίζεται από ήπια διαστολή των εντερικών κρυπτών. Σε μοριακό επίπεδο οι μικροκυστικοί υπερπλαστικοί πολύποδες συνήθως (κατά 80%) έχουν τη μετάλλαξη ενεργοποίησης του ογκογονιδίου *BRAF*^{V600E}, η οποία επάγει τη σηματοδότηση RAS/RAF/MEK/ERK που οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης και επάγει το σχηματισμό της οδοντωτής μορφής. Αυτή, στη συνέχεια, ακολουθείται από κυτταρική γήρανση επαγόμενη από ογκογονίδια (oncogene-induced senescence), που περιλαμβάνει την υπερ-έκφραση γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως τα *p16* and *IGFBP7*. Τα γονίδια αυτά κρατούν το κύτταρο σε λανθάνουσα κατάσταση. Όμως, η ανώμαλη μεθυλίωση των CpG νησίδων στους υποκινητές των συγκεκριμένων γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη διαφυγή του κυττάρου από τη λανθάνουσα φάση και τη μετάβαση των μικροκυστικών υπερπλαστικών πολυπόδων στο επόμενο στάδιο του οδοντωτού μετασχηματισμού, δηλαδή αυτό του άμισχου οδοντωτού αδενώματος (Patai et al., 2013).



Εικόνα 1.9. Η πορεία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο μέσω της οδοντωτής οδού (Patai et al., 2013).

Τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα σε μοριακό επίπεδο έχουν μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *BRAF* και υπερ-μεθυλίωση CpG νησίδων, γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι αποτελούν ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ των μικροκυστικών

υπερπλαστικών πολυπόδων και του σποραδικού καρκινώματος υψηλού βαθμού μεθυλίωσης (CIMP-high). Τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα μπορούν στη συνέχεια να αποκτήσουν δυσπλασία και να μετασχηματιστούν σε καρκινώματα υψηλού βαθμού μεθυλίωσης (CIMP-high), κυρίως μέσω της υπερ-μεθυλίωσης και απώλειας έκφρασης του *hMLH1* που ακολουθεί (Bettington et al., 2013).

Τα κλασικά οδοντωτά αδενώματα αποτελούν σπάνια υπο-κατηγορία των αλλοιώσεων οδοντωτού τύπου με επίπτωση 1%-6%. Μακροσκοπικά μοιάζουν με τα κανονικά αδενώματα, αφού έχουν μισχωτή πολυποειδή μορφή. Ειδοποιό διαφορά τους από τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα αποτελεί η κυτταρολογική δυσπλασία (90% ήπια και 10% μεγάλη) που εμφανίζουν. Επίσης, χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό νέων έκτοπων εντερικών κρυπτών, οι οποίες έχουν χάσει την ικανότητα προσκόλλησής τους στην υποκείμενη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα. Σε μοριακό επίπεδο έχουν συχνά μεταλλάξεις του *K-ras* (Aust and Baretton, 2010).

Τα οδοντωτά αδενοκαρκινώματα χαρακτηρίζονται από (70%) ώριμο και άφθονο βλεννοπαραγωγό επιθήλιο με καλά διατηρημένη πολικότητα των κυττάρων, που μοιάζει με τα οδοντωτά αδενώματα. Οι Laiho και συν. (2007) έδειξαν ότι τα οδοντωτά αδενοκαρκινώματα είναι μια βιολογικά διακριτή υπο-κατηγορία καρκίνων του παχέος εντέρου. Η συγκριτική μελέτη οδοντωτών αδενοκαρκινωμάτων και κλασικών αδενοκαρκινωμάτων κατέδειξε διαφορετική έκφραση σε 201 γονίδια. Ταυτοποιήθηκαν τρία γονίδια που θεωρήθηκαν σημαντικά για τη συμμετοχή τους στην καρκινογένεση του οδοντωτού αδενοκαρκινώματος: τα *EPHB2* (Ephrin receptor B2), *HIF1α* (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) και *PTCH* (Patched). Η έκφραση των *EPHB2* και *PTCH* είναι μειωμένη στο οδοντωτό αδενοκαρκίνωμα σε σύγκριση με το κλασικό αδενοκαρκίνωμα (Laiho et al., 2007). Επίσης, οι μεταλλάξεις ενεργοποίησης των *BRAF* και *K-ras* είναι συχνές σε αυτά. Η υπερ-μεθυλίωση του *hMLH1* και η υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια που προκαλεί, αλλά και η μεθυλίωση του γονιδίου *MGMT*, που κωδικοποιεί για μια DNA μεθυλοτρανφεράση και προκαλεί χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια είναι οι κύριοι παράγοντες που επάγουν τον καρκινικό μετασχηματισμό των οδοντωτών αδενωμάτων (Εικόνα 1.9) (Noffsinger, 2009; Patai et al., 2013).

1.5.5. ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Η χρόνια φλεγμονή του παχέος εντέρου (π.χ. ελκώδης κολίτιδα, νόσος Crohn) εκθέτει τους ασθενείς σε έναν αριθμό σηματοδοτικών μηχανισμών που σχετίζονται με αυτήν και οι οποίοι μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η αυξημένη ενεργοποίηση των μονοπατιών της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), η απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών ενδιάμεσων μορίων, όπως η κυτοκίνη TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και τα αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Επιπλέον, το φλεγμονώδες μικρο-περιβάλλον μπορεί να συμβάλει στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο με τρεις τρόπους: α) αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες που προκαλεί βλάβες στο DNA, συμβάλλοντας έτσι στην έναρξη του καρκινικού μετασχηματισμού, β) ενεργοποιώντας αντι-αποπτωτικά μονοπάτια στα επιθηλιακά κύτταρα, συμβάλλοντας στην εξέλιξη του καρκίνου και γ) δημιουργώντας ένα μικρο-περιβάλλον που υποβοηθά την κυτταρική ανάπτυξη, τη νεο-αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση (Scarpa et al., 2014).

Ο μηχανισμός που οδηγεί από τη φλεγμονή στην καρκινογένεση σχετίζεται πιθανά με τη λανθασμένη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στα βακτήρια της μικροχλωρίδας του εντερικού αυλού σε συνδυασμό με ένα γενετικό υπόβαθρο που προδιαθέτει για τον καρκίνο (Harrison and Benziger, 2011). Ασθενείς με χρόνια εντερική φλεγμονή που διαθέτουν και αντίστοιχο οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης καρκίνου στο παχύ έντερο, διατρέχουν τουλάχιστον διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, γεγονός που υποδηλώνει μια αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών που οδηγούν στη σποραδική καρκινογένεση και στην καρκινογένεση μετά από χρόνια φλεγμονή. Πράγματι, ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ενεργοποίηση του NF-κB και του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt κατά τη φλεγμονή, τα οποία προωθούν, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων του APC, την ενεργοποίηση της β-κατενίνης που καταλήγει στην καρκινογένεση, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (Terzić et al., 2010).

Η κυκλο-οξυγενάση 2 (COX-2) είναι ένα ένζυμο που παίζει ρόλο στη διαδικασία αποκατάστασης τραυματισμών του βλεννογόνου της γαστρεντερικής οδού. Η παραγωγή του επάγεται από τους παράγοντες TNF και άλλα ενδιάμεσα μόρια της φλεγμονής και

μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες (PGs). Κυρίως παράγεται η προσταγλανδίνη PGE₂, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, καθώς προσδένεται στους αντίστοιχους υποδοχείς της και μετάγει σήμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αγγειογένεσης, μέσω της ενεργοποίησης των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων VEGF (Vascular endothelial growth factor) και bFGF (basic Fibroblast growth factor) (Wang and Dubois, 2006). Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο COX-2 υπερ-εκφράζεται στα αδενώματα και τα καρκινώματα του παχέος εντέρου και πιθανότατα εμπλέκεται και στη σποραδική καρκινογένεση στο παχύ έντερο. Η ενεργότητα του COX-2 κατά τη φλεγμονή είναι αυξημένη, πράγμα που εν μέρει είναι φυσιολογικό, αλλά πιθανότατα συμβάλλει και στην καρκινογένεση μετά από χρόνια φλεγμονή του εντέρου. Οι ενδείξεις που υπάρχουν για το ρόλο του COX-2 αφορούν στη δημιουργία βλαβών στο DNA που οφείλονται στη δράση του μεταλλαξογόνου παραπροϊόντος της σύνθεσης των προσταγλανδινών, μαλονδιαλδεΰδη. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι μετά την έναρξη της καρκινογένεσης το COX-2 μπορεί να επάγει την εξέλιξη της, αυξάνοντας την έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου *Bcl-2*, πράγμα που έχει παρατηρηθεί σε καρκινώματα που σχετίζονται με ελκώδη κολίτιδα (Scarpa et al., 2014).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και η ενεργοποίησή του έχει συσχετιστεί με την έκφραση διαφόρων κυτοκινών, αντι-αποπτωτικών παραγόντων όπως το *Bcl-2*, αγγειογενετικών παραγόντων και του COX-2. Στη χρόνια φλεγμονή του παχέος εντέρου παρατηρείται συνεχής ενεργοποίηση του NF-κB στα μυελοειδή (μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα του ινοσυνδετικού στρώματος του βλεννογόνου) και στα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Ο NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, όπου ενεργοποιείται σε απόκριση στη μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων TLRs (Toll-like Receptors, TLRs) και μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, συμπεριλαμβανομένων και αντι-αποπτωτικών γονιδίων (Lawrence, 2009). Η ενεργοποίηση του NF-κB επάγει την καρκινογένεση, διότι συμβάλλει στην αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και στην αγγειογένεση, αναστέλλει την απόπτωση και προωθεί τη διήθηση και τη μετάσταση (Terzić et al., 2010).

1.6. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ

Η διήθηση και η μετάσταση είναι βασικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες μέσω μιας πολυσταδιακής πορείας αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και του ξενιστή, οδηγούν στην ανάπτυξη ενός δευτεροπαθούς όγκου σε άλλο όργανο. Περισσότερο από 90% της νοσηρότητας και θνησιμότητας που προκαλεί ο καρκίνος σχετίζεται με τη μετάσταση σε άλλο όργανο. Μετάσταση είναι η νεοπλασματική πορεία κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν από την πρωτοπαθή εστία, επιζούν στην κυκλοφορία του αίματος καθώς «κρύβονται» από τους μηχανισμούς ανοσο-επιτήρησης, εγκαθίστανται και αναπτύσσονται σε απομακρυσμένα όργανα δημιουργώντας νέους όγκους. Για να επιτευχθεί η μετάσταση σε διαφορετική θέση από τον πρωτοπαθή όγκο, ορισμένα νεοπλασματικά κύτταρα, αφού χάσουν οποιαδήποτε εξάρτηση από την προσκόλληση σε γειτονικά τους κύτταρα και με τη βοήθεια της αποδιοργανωμένης εξωκυττάριας ουσίας, μεταναστεύουν διαπερνώντας επιτυχώς τους ιστικούς φραγμούς. Αυτό μπορεί να αφορά και μια απλή μετακίνηση από μια θέση σε άλλη, δηλαδή από τον πρωτοπαθή όγκο στο διάμεσο στρώμα, στην οποία απαιτείται διείσδυση και πρωτεόλυση των ιστών. Αρκετές από τις διαδικασίες της μετάστασης περιλαμβάνουν μηχανισμούς που επηρεάζονται και κάποιες φορές ρυθμίζονται αποκλειστικά από μη καρκινικά κύτταρα του μικρο-περιβάλλοντος του όγκου (Τζωρτζιάτου-Σταθοπούλου, 2009; Keleg et al., 2003). Η ικανότητα διήθησης και μετάστασης ενός καρκινικού όγκου είναι αυτή που καθορίζει τελικά την πρόγνωση του ασθενούς (Duffy, 1996).

Παρόλο που η διασπορά του καρκίνου σε κάποιο όργανο πέραν της πρωτοπαθούς εστίας εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του όγκου και του ξενιστή, υπάρχει μια γενετική βάση που προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα την ικανότητα της διήθησης. Τα γονίδια που ενέχονται στη μετάσταση κωδικοποιούν για υποδοχείς παλιννόστησης (homing receptors), τους αντίστοιχους προσδέτες τους και εκκρινόμενες πρωτεάσες που αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Extracellular matrix, ECM). Όλα προκαλούν διήθηση και ικανότητα επιβίωσης ανεξάρτητη από υπόστρωμα προσκόλλησης. Πρόκειται για γονίδια που δεν είναι αναπτυξιακά απαραίτητα, αλλά εκφράζονται σε απόκριση στο κυτταρικό στρες και φυσιολογικά εξυπηρετούν την χημειοτακτική προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μεταστατική ιδιότητα

προσδίδεται στα καρκινικά κύτταρα λόγω της έκτοπης έκφρασης ή του λανθασμένου ματίσματος (splicing) των προϊόντων αυτών των γονιδίων (Weber, 2008).

Η προτίμηση συγκεκριμένου οργάνου ως δευτεροπαθούς εστίας για αποίκηση από καρκινικά κύτταρα υπόκειται σε διαφορεική ρύθμιση των ενεργοποιημένων γενετικών προγραμμάτων απόκρισης σε κυτταρικό στρες στους διάφορους τύπους καρκίνου. Η θεωρία της παλιννόστησης (homing theory) υποστηρίζει ότι όργανα απομακρυσμένα από τη θέση του πρωτοπαθούς όγκου προσελκύουν ενεργά τα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχέων προσκόλλησης ή διαλυτών χημειοτακτικών ουσιών που εκκρίνουν. Έτσι, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating tumor cells, CTCs) μπορεί να ανταποκριθούν στους παράγοντες αυτούς που διαχέονται τοπικά έξω από τα όργανα-στόχους και προδιαθέτουν για την εξαγγείωση των κυττάρων αυτών στο νέο ιστό (Keleg et al., 2003; Weber, 2008; Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου, 2009).

1.6.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με το μικρο-περιβάλλον (tumor microenvironment) τους είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου, την προστασία του από το ανοσοποιητικό σύστημα, την εξέλιξή του και τη μετάσταση, που είναι απειλητική για τη ζωή. Οι καρκινικοί όγκοι μπορούν να αναπτυχθούν μόνον εφόσον ο περιβάλλον ιστός είναι σε θέση να τους παρέχει το μέσο το οποίο υποστηρίζει την ανάπτυξη και τη διασπορά τους. Συνεπώς, απαιτείται μια αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ των γενετικά ασταθών καρκινικών κυττάρων και του σταθερού περιβάλλοντός τους, η οποία επίσης καθορίζει το βαθμό πολλαπλασιασμού, την ικανότητα διήθησης και μετάστασης, ακόμη και την πρόγνωση του ασθενούς (Goubran et al., 2014).

Ο όρος μικρο-περιβάλλον ενός καρκινικού όγκου περιλαμβάνει το συνδετικό στρώμα που στηρίζει τον όγκο και το οποίο αποτελείται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και από μια πληθώρα στρωματικών κυττάρων, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος, περικύτταρα, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες και διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα, σιτευτικά κύτταρα (μαστοκύτταρα), καθώς και μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal stem cells, MSCs) (Joyce and Pollard, 2009; Davidson et al., 2014).

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελείται από δυο κύρια συστατικά: τις γλυκοζαμινογλυκάνες και τις ινώδεις πρωτεΐνες. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (υαλουρονικό οξύ, θειϊκή χονδροϊτίνη, θειϊκή δερματάνη, θειϊκή ηπαράνη, ηπαρίνη, θειϊκή κερατάνη) είναι μεγάλες μη διακλαδιζόμενες πολυσακχαριτικές αλυσίδες που μπορούν να συνδεθούν με πρωτεΐνες, σχηματίζοντας πρωτεογλυκάνες. Οι ινώδεις πρωτεΐνες (διάφοροι τύποι κολλαγόνου, ελαστίνη) σχηματίζουν ινίδια στην εξωκυττάρια μήτρα του συνδετικού ιστού, όπου έχουν στηρικτικό ρόλο, ενώ η φμπρονεκτίνη μεσολαβεί στη σύνδεση της πλασματικής μεμβράνης με εξωκυττάρια μόρια. Επιπλέον, υπάρχουν και μη νηματοειδείς πρωτεΐνες που διευκολύνουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στα κύτταρα και την εξωκυττάρια ουσία, όπως η λαμινίνη και η εντακτίνη, που αποτελούν κύρια συστατικά των βασικών μεμβρανών (Μαργαρίτης και συν., 2008). Απουσία κακοήθειας, η ομοιόσταση των ιστών εξασφαλίζει τη σταθερή δομή τους και τον αυστηρό έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, που επιτυγχάνεται και διατηρείται μέσω της διακυτταρικής επικοινωνίας. Η εξωκυττάρια ουσία δρα ως φυσικό κρίωμα που διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων ενός ιστού και μεταβιβάζει τα διάφορα σήματα επιβίωσης και διαφοροποίησης. Έτσι, η διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού αναστέλλει τον καρκινικό μετασχηματισμό λόγω της σταθερότητας της δομής του, που επιτυγχάνεται χάρη στις πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες και οι καδερίνες. Εκτός της δομής, θεμελιώδη ρόλο στην ομοιόσταση των ιστών παίζει η ανοσο-επιτήρηση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα εξαλείφει κατεστραμμένα, γηρασμένα και προ-καρκινικά ή καρκινικά κύτταρα (Goubran et al., 2014).

Στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης, ωστόσο, παρακάμπτονται οι προστατευτικοί φραγμοί του μικρο-περιβάλλοντος με τη βοήθεια συγκεκριμένων συνθηκών που επικρατούν σε αυτό, όπως η χρόνια φλεγμονή, με αποτέλεσμα το τοπικό ιστικό μικρο-περιβάλλον να αποκτά την ικανότητα να επάγει την ανάπτυξη του καρκίνου (Joyce and Pollard, 2009). Αφού παρακάμψουν τους εγγενείς μηχανισμούς της απόπτωσης, τα καρκινικά κύτταρα υφίστανται πιέσεις από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα καρκινικά αντιγόνα της επιφάνειάς τους αναγνωρίζονται από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και τα καταστρέφουν. Οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα του μικρο-περιβάλλοντος του όγκου, επίσης, ασκούν επιδράσεις κατά της ογκογένεσης. Ωστόσο, αυτά τα κύτταρα αργότερα

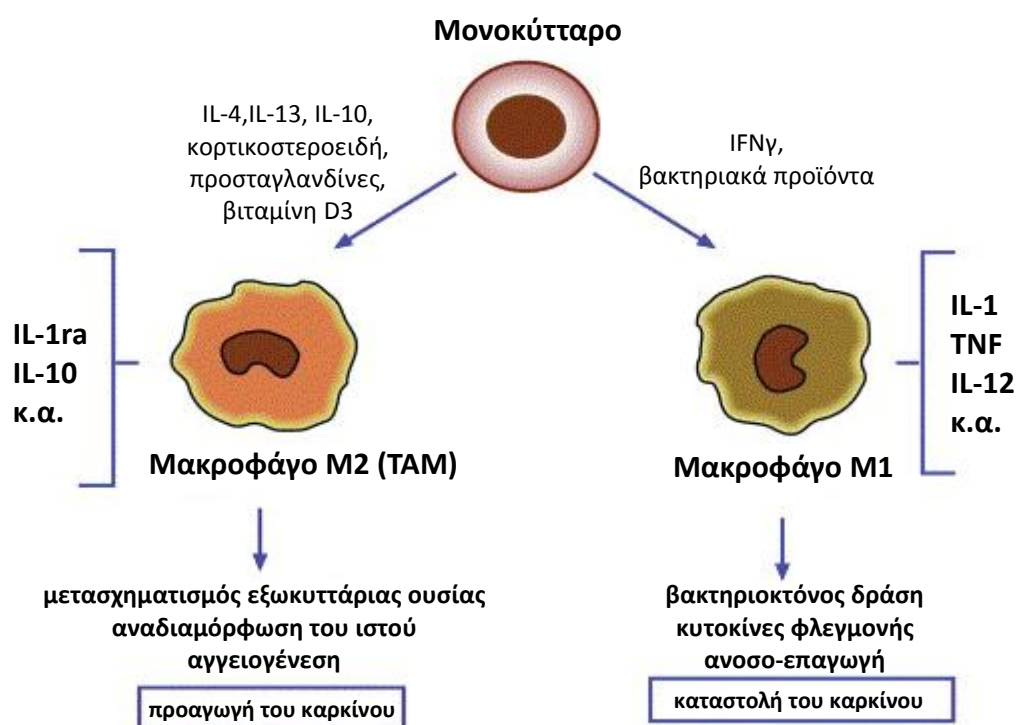
μπορούν να «εκπαιδευτούν» από τον όγκο, ώστε να υποστηρίξουν την ανάπτυξή του (Quail and Joyce, 2013).

Οι στρωματικοί ινοβλάστες εκκρίνουν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των κυττάρων καθώς και της τοπικής ανοσο-απόκρισης. Οι ινοβλάστες που βρίσκονται στο μικρο-περιβάλλον ενός καρκινικού όγκου διαφέρουν από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες και ονομάζονται ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον καρκίνο (Cancer-associated fibroblasts, CAFs), αφού προκύπτουν κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης υπό την επίδραση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που εκκρίνει ο όγκος (π.χ. TGFβ, FGF, PDGF). Αυτοί εκκρίνουν με τη σειρά τους πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και συστατικά της βασικής μεμβράνης, ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, καταστέλλουν την ανοσο-απόκριση και συμβάλλουν στη διατάραξη της ομοιόστασης του ιστού. Οι ινοβλάστες CAF είναι, επιπλέον, η κύρια πηγή παραγωγής του αυξητικού αγγειογενετικού παράγοντα VEGF, ο οποίος επάγει την αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη του όγκου. Έτσι, οι ινοβλάστες CAF μπορούν να ευνοήσουν την πορεία της καρκινικής εξαλλαγής των μετασχηματισμένων επιθηλιακών κυττάρων, σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες που εμποδίζουν την ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων (Goubran et al., 2014; Joyce and Pollard, 2009).

Η παρουσία λευκοκυττάρων στους καρκινικούς όγκους θεωρούνταν στο παρελθόν ως μια αποτυχημένη απόπειρα του ανοσοποιητικού συστήματος να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Σήμερα όμως είναι γνωστό ότι οι όγκοι μπορούν να διαφύγουν της ανοσο-επιτήρησης τροποποιώντας ορισμένους τύπους φλεγμονωδών κυττάρων, έτσι ώστε να τους καταστήσουν ευνοϊκούς για την ανάπτυξη του καρκίνου αντί κατασταλτικούς, όπως φυσιολογικά θα έπρεπε να είναι (Joyce and Pollard, 2009).

Κυρίαρχο ποσοστό του πληθυσμού λευκοκυττάρων των ιστών αποτελούν τα μακροφάγα, μια ομάδα με μεγάλη ετερογένεια που περιλαμβάνει πολλούς υποπληθυσμούς με διακριτό φαινότυπο. Τα μακροφάγα προέρχονται από τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων του αίματος και εγκαθίστανται στους ιστούς. Διαθέτουν υψηλού βαθμού προσαρμοστικότητα σε απόκριση σε τοπικά σήματα που φτάνουν από το μικρο-περιβάλλον του εκάστοτε ιστού, οπότε είναι σε θέση να αναλάβουν μια ευρεία γκάμα ρόλων που απαιτούνται για την ομοιόσταση: από την άμυνα εναντίον μολυσματικών παραγόντων ως τη μορφογένεση του ιστού, την

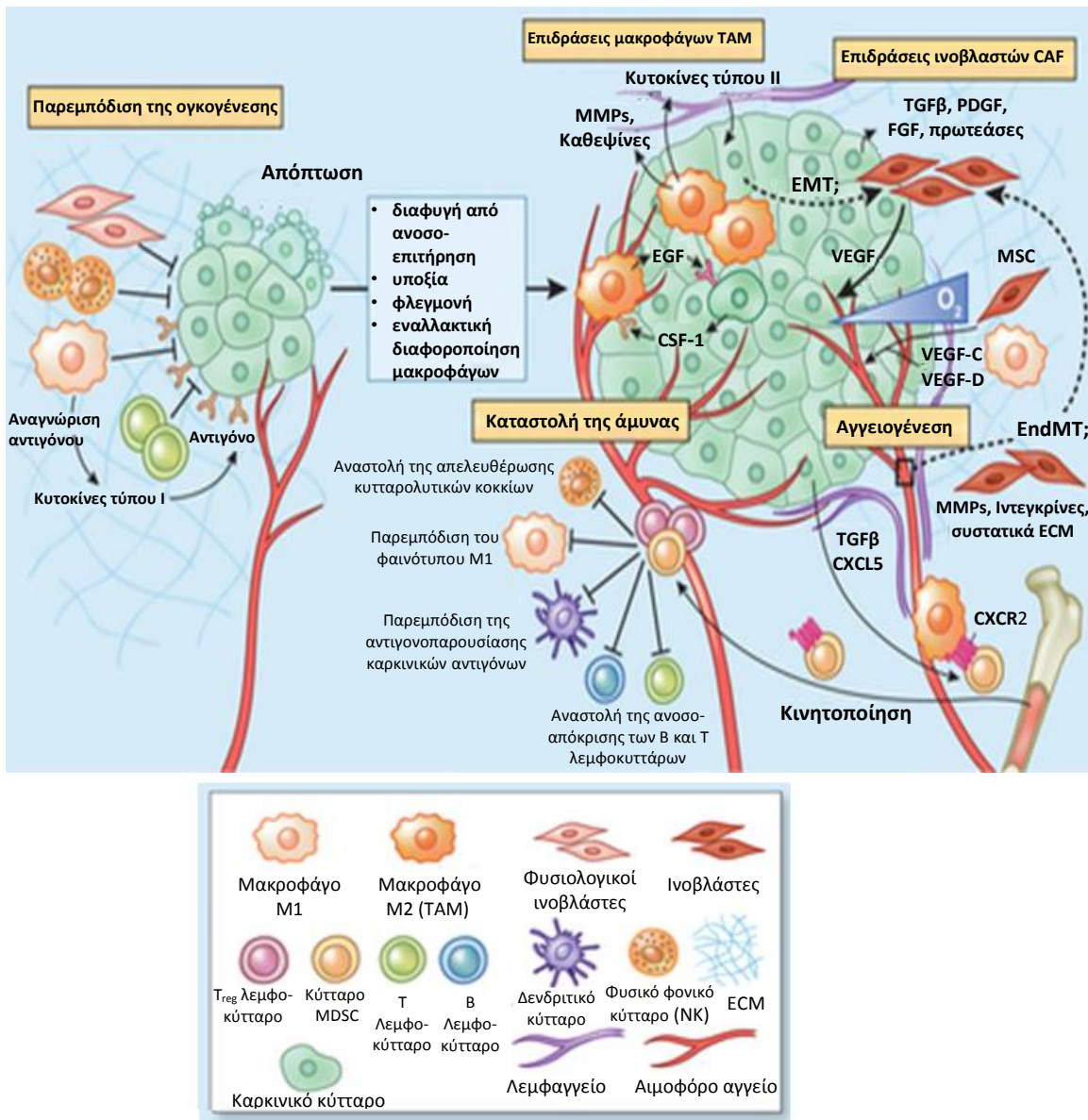
επούλωση τραυμάτων και τη ρύθμιση της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν δυο πιθανές οδοί διαφοροποίησης των μακροφάγων, οι οποίες καταλήγουν στα κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα τύπου 1 (M1) ή στα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα τύπου 2 (M2). Τα βακτηριακά προϊόντα ή τμήματα των βακτηριακών κυττάρων και η κυτοκίνη ιντερφερόνη γ (IFN γ) του υποπληθυσμού Th1 των CD4+ T λεμφοκυττάρων (βοηθητικά T λεμφοκύτταρα) επάγουν τη διαφοροποίηση των μακροφάγων μέσω του μονοπατιού M1. Τα ενεργοποιημένα M1 μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν μικρόβια, εξαλείφουν καρκινικά κύτταρα, παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα, ώστε να ενεργοποιηθεί η ειδική άμυνα και παράγουν μεγάλες ποσότητες προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Από την άλλη πλευρά, η έκθεση των μακροφάγων στις κυτοκίνες του υποπληθυσμού Th2 των CD4+ T λεμφοκυττάρων και σε κυτοκίνες που προέρχονται από τον όγκο (π.χ. ιντερλευκίνες IL-4, IL-10, IL-13, TGF β ή προσταγλανδίνη E2) οδηγεί στη διαφοροποίηση των μακροφάγων μέσω του μονοπατιού M2 (Εικόνα 1.10) (Quatromoni and Eruslanov, 2012).



Εικόνα 1.10. Τα μονοπάτια διαφοροποίησης των κλασικά ενεργοποιημένων μακροφάγων M1 και των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων M2 (Sica et al., 2006).

Τα μακροφάγα M2, που διαφορετικά ονομάζονται και μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο (Tumor-associated macrophages, TAMs), δεν έχουν την αντικαρκινική δράση των μακροφάγων M1. Αντίθετα, παράγουν αγγειογενετικούς και άλλους αυξητικούς παράγοντες (π.χ. VEGF, EGF), μέσω των οποίων προάγεται η αγγειογένεση, καθώς επίσης και πρωτεάσες (μεταλλοπρωτεάσες και καθεψίνες), μέσω των οποίων αποδομούνται πρωτεολυτικά τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα μακροφάγα TAM εκδηλώνουν διάφορους φαινότυπους στα πλαίσια της ανάπτυξης του όγκου, της αγγειογένεσης και της διήθησης, μέσω της έκκρισης πληθώρας πρωτεασών, κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (Biswas and Mantovani, 2010).

Η πρωτεόλυση του στρώματος αποτελεί βασική διαδικασία της διήθησης, συνεπώς τα μακροφάγα TAM εμπλέκονται σε αυτήν, αφού συγκεντρώνονται σε μεγάλους αριθμούς και είναι οι κύριοι παραγωγοί πρωτεασών σε εστίες διείδυσης του όγκου στη βασική μεμβράνη (εξωκυττάριο στρώμα αποτελούμενο από πυκνό πλέγμα κολλαγόνου τύπου IV, γλυκοπρωτεϊνών, όπως λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη, πρωτεογλυκανών και αυξητικών παραγόντων), όπου έλκονται από χημειοτακτικές ουσίες που εκκρίνει ο όγκος (Quatromoni and Eruslanov, 2012). Από πειράματα *in vivo* υπάρχουν ενδείξεις ότι τα καρκινικά κύτταρα στη συνέχεια μεταναστεύουν μέσω της βασικής μεμβράνης με την επίδραση του αυξητικού παράγοντα EGF (Epidermal growth factor) που παράγεται από τα μακροφάγα TAM σε απόκριση στην παρακρινή δράση της εκκρινόμενης από τον όγκο κυτοκίνης CSF-1 (Colony-stimulating factor 1) (Εικόνα 1.11). Η εντόπιση των μακροφάγων TAM είναι κυρίως στο περιφερειακό στρώμα του συμπαγούς όγκου και όχι στο κέντρο του, με εξαίρεση την παρουσία τους στα αιμοφόρα αγγεία του κέντρου του όγκου, όπου η δράση τους διευκολύνει την ενδοαγγείωση των καρκινικών κυττάρων (Quail and Joyce, 2013). Έτσι λοιπόν, τα μακροφάγα TAM, σε αντίθεση με τα M1, είναι προσαρμοσμένα στην προαγωγή της καρκινογένεσης μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την άμυνα, αλλά και άλλων που δεν σχετίζονται με αυτή και γι' αυτό θεωρούνται τόσο ως «το κλειδί που ξεκλειδώνει την πύλη» για τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων όσο και ως «το καύσιμο» της μετανάστευσής τους (Pollard, 2004; Wyckoff et al., 2007).



Εικόνα 1.11. Οι δράσεις των διαφόρων τύπων στρωματικών κυττάρων αλλά και οι συνθήκες που επικρατούν στο εξωκυττάριο χώρο, προάγουν την ανάπτυξη της πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας (Quail and Joyce, 2013).

Είναι πλέον αποδεκτή η θεώρηση ότι τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν πληθώρα κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, με τη βοήθεια των οποίων κινητοποιούνται κύτταρα του μυελού των οστών και επιστρατεύονται στη θέση μιας μελλοντικής μετάστασης όπου δημιουργούν ένα περιβάλλον που θα επιτρέψει την έλευση των καρκινικών κυττάρων (Sceney et al., 2013). Καθώς αναπτύσσεται ο όγκος, τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (Myeloid-derived suppressor cells,

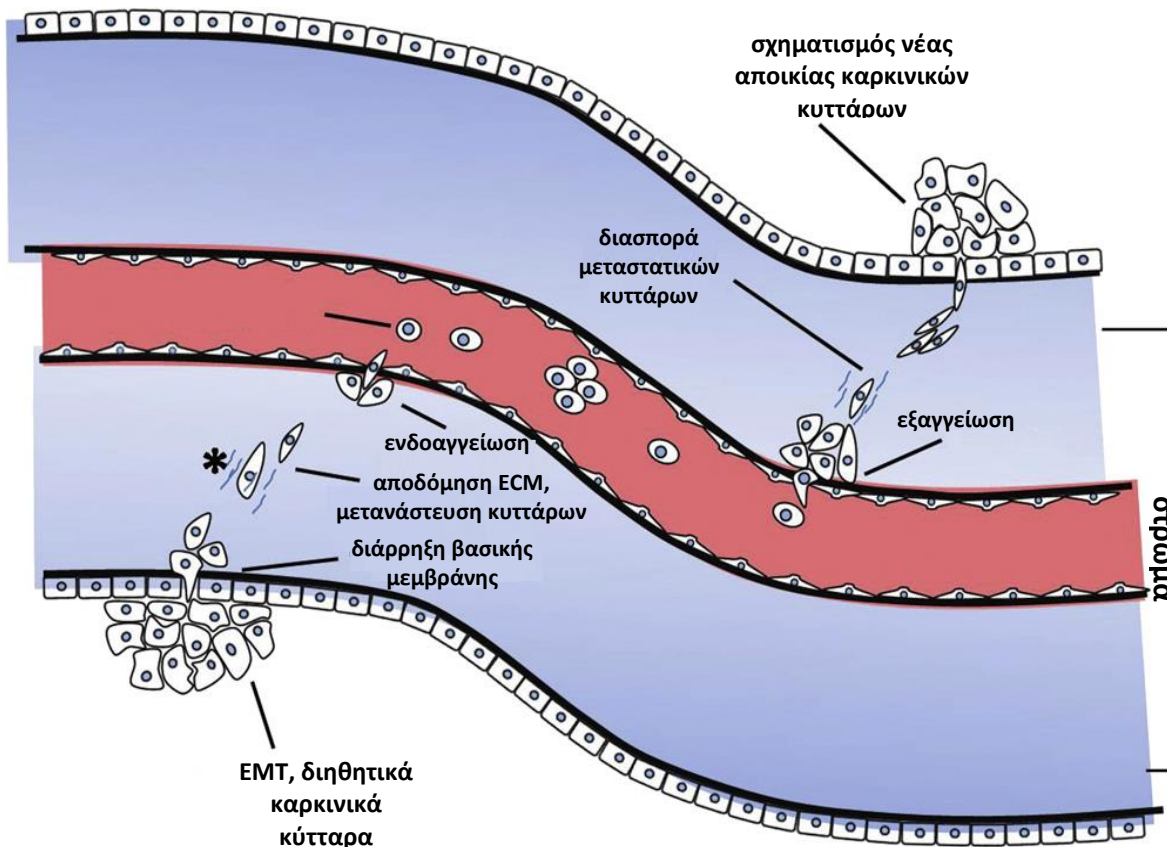
MDSCs) και τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (T_{reg} cells) κινητοποιούνται στην κυκλοφορία σε απόκριση σε κυτοκίνες (π.χ. TGF β , CXCL5-CXCR2) που εκκρίνονται από τον όγκο. Τα κύτταρα MDSCs και T_{reg} διηθούν τον αναπτυσσόμενο όγκο, ώστε να εμποδίσουν την ανοσο-επιτήρησή του από τον ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω παρεμπόδισης της αντιγονοπαρουσίασης και του πολλαπλασιασμού B και T λεμφοκυττάρων αλλά και της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών κυττάρων (Natural killer cells, NK). Επιπρόσθετα στις δράσεις των προαναφερθέντων κυττάρων, διάφορες άλλες εξωκυτταρικές συνθήκες, όπως η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (υποξία) και η αλλαγή της σύστασης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, επίσης συμβάλλουν στην εξέλιξη της ανάπτυξης του όγκου (Εικόνα 1.11) (Quail and Joyce, 2013).

1.6.2. ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑ (EMT)

Η μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) είναι μια φυσιολογική βιολογική λειτουργία κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (τύπου I EMT), η οποία συμμετέχει στον σχηματισμό του μεσοδέρματος και του νευρικού σωλήνα, αλλά απαντάται επίσης σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, όπως η διάμεση νεφρική ίνωση και η ηπατική ίνωση, αλλά και η καρκινική μετάσταση (τύπου II EMT). Η EMT είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία, δηλαδή μπορεί να συμβεί και αντίστροφα ως μετάβαση από μεσέγχυμα σε επιθήλιο (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET), η οποία είναι επίσης απαραίτητη κατά την φυσιολογική ανάπτυξη ιστών και οργάνων (Sipos and Galamb, 2012).

Η έναρξη της μετάστασης προϋποθέτει τη διήθηση, η οποία ενεργοποιείται από τη μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (τύπου II EMT). Η βιολογική αυτή διαδικασία οδηγεί στην απώλεια της πολικότητας και της ικανότητας κυτταρικής προσκόλλησης ενός επιθηλιακού κυττάρου, το οποίο φυσιολογικά αλληλεπιδρά με τη βασική μεμβράνη, έτσι ώστε αυτό μέσω πολλαπλών βιοχημικών αλλαγών που υφίσταται (καταστολή E-καδερίνης, αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση κινασών τυροσίνης, υπερ-έκφραση N-καδερίνης, βιμεντίνης, φμπρονεκτίνης, πρωτεϊνών SNAIL με δακτυλίου ψευδαργύρου και μεταλλοπρωτεασών, καταστολή στην έκφραση των miRNAs 200 και 205), να αποκτήσει φαινότυπο μεσεγχυματικού κυττάρου. Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος

χαρακτηρίζεται από αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης, διήθησης και αντίστασης στην απόπτωση (Kalluri and Weinberg, 2009).



Εικόνα 1.12. Μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (EMT) κατά τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Karagiannis et al., 2010).

Το σύνολο των σηματοδοτικών παραγόντων που συμβάλλουν στη μετάβαση EMT των καρκινικών κυττάρων παραμένει απροσδιόριστο. Έχει προταθεί ότι οι διάφορες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα κατά την πορεία σχηματισμού του πρωτοπαθούς όγκου, τα καθιστούν ιδιαίτερα ευαίσθητα στην απόκριση σε μοριακά σήματα που επάγουν EMT. Τα σήματα αυτά προέρχονται από το στρώμα που περιβάλλει τον όγκο. Τέτοια σηματοδοτικά μόρια είναι οι αυξητικοί παράγοντες EGF, TGFβ, HGF (Hepatocellular growth factor) και PDGF (Platelet-derived growth factor), οι οποίοι φαίνεται ότι επάγουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στην EMT στα καρκινικά κύτταρα. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι οι SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug), ZEB-1 (Zinc finger E-box binding

homeobox 1), TWIST 1 (Twist-related protein 1), GSC (Homeobox protein gooseoid) και FOXC2 (Forkhead box protein C2) (Medici et al., 2008). Στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει βρεθεί ότι η απουσία έκφρασης του υποδοχέα του TGFβ προσδίδει καλύτερη πρόγνωση (Watanabe et al., 2001). Οι μεταγραφικοί παράγοντες Snail, Slug και ZEB-1 είναι υπεύθυνοι για την καταστολή της μεταγραφής της E-καδερίνης (E-cadherin). Η καταστολή της έκφρασης της E-καδερίνης στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με τη μετάβαση EMT και τα κύτταρα που χάνουν την μεμβρανική E-καδερίνη ανταποκρίνονται περισσότερο στη σηματοδοτούμενη από αυξητικούς παράγοντες επαγωγή της μετάβασης EMT (Terass et al., 2000). Για το λόγο αυτόν η E-καδερίνη έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Τα καρκινικά κύτταρα ενός πρωτοπαθούς όγκου, αφού αποκτήσουν μεσεγχυματικό φαινότυπο, χάνουν την ικανότητα προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου που προκαλείται λόγω καταστολής της E-καδερίνης και διαπερνούν τη βασική μεμβράνη, καθώς αποκτούν αυξημένη ικανότητα διήθησης. Στη συνέχεια, μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος μέσω ενδοαγγείωσης (Εικόνα 1.12).

Αργότερα, όταν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) εξέρχονται από την κυκλοφορία του αίματος (εξαγγείωση) για να σχηματίσουν μικρομεταστάσεις (Εικόνα 1.12), υφίστανται την αντίστροφη διαδικασία, τη μετάβαση από μεσέγχυμα σε επιθήλιο (MET), η οποία εξυπηρετεί τον κλωνικό τους πολλαπλασιασμό στις θέσεις της μετάστασης. Τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα που έχουν προκύψει μέσω EMT, συνήθως δημιουργούν αποικίες σε απομακρυσμένες θέσεις από τον πρωτοπαθή όγκο, οι οποίες μοιάζουν σε ιστοπαθολογικό επίπεδο στον πρωτοπαθή όγκο από τον οποίο προήλθαν. Η μετατροπή του μεσεγχυματικού φαινότυπου των μεταστατικών κυττάρων σε επιθηλιακό φαίνεται ότι είναι αναγκαία προκειμένου να δημιουργηθεί ένας απομακρυσμένος δευτεροπαθής όγκος (Kalluri and Weinberg, 2009). Τα καρκινικά κύτταρα αντιμετωπίζουν σημαντικά εμπόδια στην προσπάθειά τους να εγκαταλείψουν το αγγειακό σύστημα και να καταφέρουν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν στο μικρο-περιβάλλον ενός διαφορετικού ιστού, όπως είναι για παράδειγμα η απουσία των σηματοδοτικών μορίων που υπήρχαν στο μικρο-περιβάλλον του πρωτοπαθούς όγκου και τα οποία ήταν υπεύθυνα για την επαγωγή της EMT στην πρώτη θέση (Thiery, 2002). Έτσι, η τάση των καρκινικών κυττάρων να υφίστανται την ανάστροφη μετάβαση MET πιθανόν

αντανακλά τα εμπόδια που αντιμετωπίζουν μετά την εξαγγείωσή τους στο παρέγχυμα ενός απομακρυσμένου οργάνου. Ωστόσο, πολλά βήματα αυτού του μηχανισμού παραμένουν άγνωστα και απαιτούν περαιτέρω πειραματική διερεύνηση. Συμπερασματικά, οι διαδικασίες μετάβασης EMT και MET αποτελούν την απαρχή και την ολοκλήρωση του καταρράκτη αντιδράσεων της διήθησης και μετάστασης (Εικόνα 1.12).

1.6.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

Τα εξωσώματα είναι μεμβρανικής προέλευσης νανο-κυστίδια με διάμετρο έως 100nm, που απελευθερώνονται από πολλά είδη κυττάρων στο περιβάλλον τους με εξωκύτωση και παίζουν πολύπλοκους ρόλους στη διακυτταρική επικοινωνία. Ιδιαίτερα, εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το περιεχόμενό τους μπορεί να είναι πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (DNA, mRNA, miRNA). Τα εξωσώματα συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και επάγουν σηματοδοτικές αποκρίσεις σε αυτά είτε βρίσκονται σε απομακρυσμένους ιστούς, όπου τα εξωσώματα μπορούν να μεταβούν, είτε βρίσκονται στο περιβάλλον του κυττάρου που τα εκκρίνει (They et al., 2002). Τα τελευταία χρόνια έχουν αποκαλυφθεί διάφοροι ρόλοι των εξωσωμάτων στον καρκίνο.

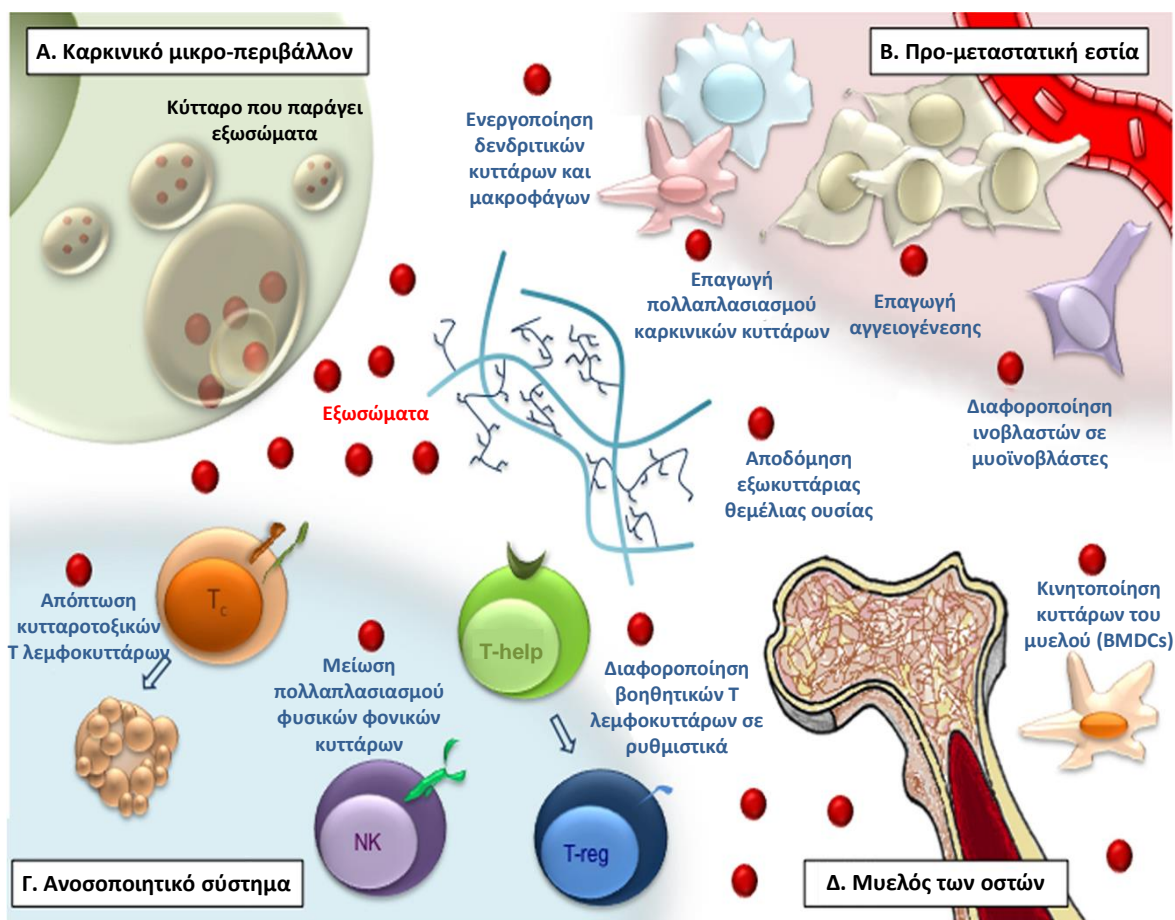
Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από διάφορα κύτταρα του καρκινικού μικρο-περιβάλλοντος ή από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, τροποποιούν και αναδομούν το κυτταρικό μικρο-περιβάλλον ώστε να διευκολύνουν το σχηματισμό όγκου, ενώ παράλληλα παρεμποδίζουν τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώσουν και να μεταναστεύσουν σε δευτερογενείς εστίες. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι το ίδιο το μικρο-περιβάλλον ενός όγκου αυξάνει την ικανότητα σύντηξης εξωσωμάτων με κύτταρα που υπάρχουν σε αυτό. Η λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης των εξωσωμάτων αλλάζει σύσταση και αποκτά μεγαλύτερη ικανότητα σύντηξης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων, σε απόκριση στο μειούμενο pH που χαρακτηρίζει το υποξικό καρκινικό μικρο-περιβάλλον (Parolini et al., 2009).

Οι πρωτεΐνες που συνήθως εμπεριέχουν τα εξωσώματα είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς και κυτταροσκελετού, πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, μεταγωγείς σήματος, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins)

και πολλές άλλες (Kharazih et al., 2012). Ορισμένες εμπειριχόμενες στα εξωσώματα πρωτεΐνες είναι παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η p53 και παράγοντες σηματοδότησης αυξητικών (π.χ. EGF και FGF) και αγγειογενετικών παραγόντων, γεγονός που υποδηλώνει ένα ρόλο για τα εξωσώματα στον καρκινικό μετασχηματισμό κυττάρων μετά από σύντηξή τους με αυτά (Tickner et al., 2014).

Τα εξωσώματα συχνά μεταφέρουν νουκλεϊκά οξέα στα κύτταρα-στόχους, δηλαδή αποτελούν μέσο για την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των κυττάρων, επάγοντας έτσι φαινοτυπικές αλλαγές σε αυτά (Valadi et al., 2007). Έρευνες έχουν δείξει ότι εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα μαστού, πνεύμονα και ωοθηκών περιέχουν μόρια microRNAs (miRNAs), μιας κατηγορίας εξελικτικά συντηρημένων μικρού μήκους μονόκλωνων μορίων RNA τα οποία παίζουν ρόλο στην καταστολή της μετάφρασης ή στην επαγωγή της αποδόμησης του mRNA διαφόρων γονιδίων. Είναι σχεδόν βέβαιο ότι τα εξωσώματα είναι απαραίτητα για τη μεταφορά μορίων miRNA και τη σηματοδότηση στον καρκίνο. Επίσης, έχει δειχθεί ότι μπορεί να μεταφέρουν μεταλλαγμένα mRNA μετάγραφα ή τμήματα DNA που πιθανόν να συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στην πρωτοπαθή ή στη μεταστατική εστία τους (Tickner et al., 2014).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν πληθώρα κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων για την κινητοποίηση κυττάρων του μυελού των οστών, ώστε αυτά να μεταβούν στη θέση μιας μελλοντικής μετάστασης και να ευνοήσουν τη διαμόρφωση του μικρο-περιβάλλοντος που θα επιτρέψει την έλευση και εγκατάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ορισμένες πρώιμες διεργασίες που οδηγούν στο σχηματισμό μιας προ-μεταστατικής εστίας έχουν συσχετιστεί με τη δράση εξωσωμάτων. Τέτοιες είναι η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου των αγγείων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αγγειογένεση (Hong et al., 2009). Παρόλο που οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία μιας προ-μεταστατικής εστίας *in vivo* δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα εξωσώματα που εκκρίνουν τόσο τα καρκινικά όσο και τα υγιή κύτταρα είναι απαραίτητοι μεσολαβητές του σχηματισμού μιας προ-μεταστατικής εστίας. Στην Εικόνα 1.13 παρουσιάζονται οι έως σήμερα μελετημένες επιδράσεις των εξωσωμάτων στο σχηματισμό μιας προ-μεταστατικής εστίας.



Εικόνα 1.13. Οι πολλαπλοί ρόλοι των εξωσωμάτων στην ογκογένεση. (Α) Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα επηρεάζουν το μικρο-περιβάλλον του όγκου αναδιοργανώνοντας την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, προάγοντας την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. (Β) Τα εξωσώματα μεταβαίνουν σε μακρινές θέσεις από την πρωτοπαθή καρκινική εστία, όπου προάγουν τη διαμόρφωση μιας προ-μεταστατικής εστίας. Αυξάνεται η αγγείωση και επάγεται η διαφοροποίηση ενδοθηλιακών και στρωματικών κυττάρων, η οποία οδηγεί στη δημιουργία του καρκινικού μικρο-περιβάλλοντος. (Γ) Οι ανοσολογικές αποκρίσεις απορρυθμίζονται με τρόπο που παρεμποδίζει την αναγνώριση του όγκου και τις αντικαρκινικές δράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Επάγεται η απόπτωση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (T_c), αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός των φυσικών φονικών κυττάρων (NK), ενώ τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται ώστε να αποκτήσουν φαινότυπο ρυθμιστικού Τ λεμφοκυττάρου (T_{reg}). (Δ) Κύτταρα της μυελοειδούς σειράς επιστρατεύονται στον καρκινικό και προ-καρκινικό ιστό και υποβοηθούν την ανάπτυξη του καρκίνου (Tickner et al., 2014).

Η τροποποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) σε μια νέα θέση μελλοντικής αποίκησης καρκινικών κυττάρων έχει αποδοθεί άμεσα στη δράση του περιεχομένου των εξωσωμάτων, τα οποία μπορούν επιπλέον να επάγουν τη διήθηση στο στρώμα της προ-μεταστατικής εστίας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την αποδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από εξωσώματα καρκινικών κυττάρων που μεταφέρουν παράγοντες όπως γλυκοπρωτεΐνες ή μεταλλοπρωτεάσες. Εξωσώματα που συμβάλλουν στην ανάπτυξη μιας προ-μεταστατικής εστίας μπορεί να παράγονται επίσης

από μη καρκινικά κύτταρα εντός αυτής, πριν την αποίκισή της από καρκινικά κύτταρα ή την έλευση των εξωσωμάτων που εκκρίνουν τα καρκινικά κύτταρα (Tickner et al., 2014).

Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα εξωσώματα συμβάλλουν στο σχηματισμό της προ-μεταστατικής εστίας μέσω της απορρύθμισης της ανοσο-απόκρισης έναντι του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, τα εξωσώματα έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν την κυτταροτοξικότητα της ανοσο-απόκρισης επάγοντας την απόπτωση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και ελαττώνοντας τον πολλαπλασιασμό των φυσικών φονικών κυττάρων (NK cells). Επίσης, εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα επάγουν τη διαφοροποίηση των CD4+ βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (T_{reg} cells), το οποίο υποδηλώνει έναν πιθανό μηχανισμό διαφυγής από την ανοσο-επιτήρηση, αφού τα ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα καθιστούν το ανοσοποιητικό σύστημα ανεκτικό στην παρουσία του όγκου (Whiteside, 2013).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εξωσώματα «εκπαιδεύουν» τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (bone-marrow-derived cells, BMDCs) που έχουν επιστρατευτεί σε μια προ-μεταστατική εστία, ώστε να επάγουν έναν φαινότυπο που θα υποστηρίξει τη μετάσταση. Έχει ακόμηδειχθεί ότι, οι ινοβλάστες και κύτταρα της άμυνας μπορούν να δεχτούν σήματα επαγωγής για τη δημιουργία ενός δεκτικού για τον καρκίνο μικρο-περιβάλλοντος. Είναι γνωστό ότι στο τροποποιημένο μικρο-περιβάλλον αρκετών συμπαγών καρκινικών όγκων υπάρχει αυξημένη παρουσία μυοϊνοβλαστών, οι οποίοι υποβοηθούν την ανάπτυξη του όγκου, την αγγειογένεση και τη μετάστασή του. Φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των ινοβλαστών για την απόκτηση μυοϊνοβλαστικού φαινότυπου σχετίζεται με την επίδραση εξωσωμάτων και αποτελεί κομβικό συμβάν στο σχηματισμό μιας προ-μεταστατικής εστίας (Webber et al., 2010).

1.6.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ

Οι πρωτεάσες ή πρωτεϊνάσες ή πρωτεολυτικά ένζυμα αποτελούν μία ομάδα ενζύμων, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών. Η δράση των πρωτεασών είναι πάντοτε μη αναστρέψιμη και αφορά είτε στη μη ειδική αποδόμηση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, όπως συμβαίνει για παράδειγμα κατά την απόπτωση, είτε στην περιορισμένη υδρόλυση επιλεγμένων πρωτεϊνών-στόχων, που στοχεύει σε λειτουργική αλλαγή, όπως είναι η ενεργοποίηση μιας προ-ορμόνης. Οι πρωτεάσες

διακρίνονται σε κατηγορίες με βάση τρία σημαντικά κριτήρια: τη θέση του πεπτιδικού δεσμού που πρόκειται να υδρολυθεί στο μόριο του υποστρώματος (εσωτερική ή ακραία), τον καταλυτικό μηχανισμό και τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ τους, οι οποίες αποκαλύπτονται από τη δομή τους. Σύμφωνα με το πρώτο κριτήριο, οι πρωτεάσες διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις ενδοπεπτιδάσες που διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς σε εσωτερική θέση του μορίου του υποστρώματος και σε εξωπεπτιδάσες που δρουν στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης-στόχου. Σύμφωνα με το δεύτερο κριτήριο, οι ενδοπεπτιδάσες κατηγοριοποιούνται, σύμφωνα με το αμινοξύ που εντοπίζεται στο ενεργό τους κέντρο, σε πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης, ασπαραγινικού, θρεονίνης, και μεταλλοπρωτεάσες (MMPs), που διαθέτουν ένα μεταλλικό ιόν στο ενεργό τους κέντρο. Με βάση το τρίτο κριτήριο, οι πρωτεάσες κάθε καταλυτικής τάξης κατηγοριοποιούνται σε εξελικτικές ομάδες (clans), οι οποίες με τη σειρά τους περιλαμβάνουν πολλές οικογένειες (families), τα μέλη των οποίων διαθέτουν σημαντικές ομοιότητες αλληλουχίας (Borgoño et al., 2004). Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 569 πρωτεολυτικά ένζυμα που παράγονται από τα ανθρώπινα κύτταρα: 194 μεταλλοπρωτεάσες, 176 πρωτεάσες σερίνης, 150 πρωτεάσες κυστεΐνης, 28 πρωτεάσες θρεονίνης και 21 πρωτεάσες ασπαραγινικού (López-Otín and Matrisian, 2007).

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι γνωστό πλέον ότι πέρα από τις μη ειδικές τους λειτουργίες στον καταβολισμό των πρωτεϊνών, δρουν, επίσης, πολύ ειδικά για τη διάσπαση συγκεκριμένων υποστρωμάτων και με τον τρόπο αυτό επηρεάζουν το φαινότυπο των κυττάρων, την επιβίωση και την απόπτωσή τους. Οι πρωτεάσες διαδραματίζουν θεμελιώδεις ρόλους σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, αλλά σχετίζονται και με ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων καθώς και με την εξέλιξη και τη διήθηση/μετάσταση του καρκίνου, γιατί παρέχουν στα καρκινικά κύτταρα πρόσβαση στο κυκλοφορικό σύστημα των λεμφαγγείων και των αιμοφόρων αγγείων. Τα αγγεία υποστηρίζουν την ανάπτυξη του όγκου και αποτελούν οδό διαφυγής των καρκινικών κυττάρων, που εξυπηρετεί τη διασπορά τους σε άλλα όργανα (Folgueras et al., 2004).

Η σχέση των πρωτεασών με τον καρκίνο ανάγεται στο 1946, όταν ο Fisher πρότεινε ότι η πρωτεόλυση που συμβαίνει κατά την καρκινογένεση, μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και την επακόλουθη διήθηση στον

περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό (Fisher, 1946). Σήμερα είναι γνωστό ότι τα πρωτεολυτικά ένζυμα συμβάλλουν σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης, όχι μόνο στα τελευταία, όπως αρχικά πιστευόταν (Borgoño and Diamandis, 2004; Mohamed and Sloane, 2006). Οι εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές πρωτεάσες μπορούν να λειτουργήσουν ως σηματοδοτικά μόρια σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για τη βιολογία του καρκίνου. Οι διεργασίες στις οποίες ενέχεται η δράση πρωτεασών περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση, την αγγειογένεση, τη γήρανση, την αυτοφαγία, την απόπτωση και τη διαφυγή από την ανοσο-επιτήρηση.

Η λειτουργία των ενδοκυτταρικών πρωτεασών σε σηματοδοτικά μονοπάτια έχει σχέση με την απομάκρυνση άχρηστων ή κατεστραμμένων προϊόντων. Για παράδειγμα, οι λυσοσωμικές κυστεϊνικές καθεψίνες διασπούν πρωτεΐνες μετά από την ενδοκύτωση τους, ενώ οι κυστεϊνικές πρωτεάσες της οικογένειας των κασπασών λειτουργούν σε καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Η οργάνωση της λειτουργίας των ενδοκυτταρικών πρωτεασών σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες χρησιμεύει ως μηχανισμός προστασίας, καθώς υπάρχουν αρκετά παραδείγματα μεταλλάξεων απώλειας λειτουργικότητας σε αυτές σε διάφορους τύπους καρκίνου, πράγμα που δείχνει ότι μπορούν να δράσουν και ως καταστολείς της καρκινογένεσης (π.χ. Κασπάσες 3, 5, 6, 7, 8, Καθεψίνη L, κ.α.) (López-Otín and Matrisian, 2007).

Οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες, από την άλλη πλευρά, συμμετέχουν ενεργά στην προαγωγή της καρκινογένεσης. Πράγματι, τα ένζυμα αυτά συνήθως υπερ-εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα και στο περιβάλλον τους ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ογκογόνων μεταγραφικών μονοπατιών. Ένα σημαντικό πρωτεολυτικό γεγονός στον καταρράκτη της μετάστασης είναι η αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου IV της βασικής μεμβράνης. Πληθώρα μελετών έχουν αποδείξει τη θετική συσχέτιση μεταξύ της εξέλιξης του καρκίνου και της έκφρασης εξωκυτταρικών πρωτεασών, όπως μεταλλοπρωτεάσες και πρωτεάσες σερίνης σε πολλούς τύπους όγκων. Η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων, αλλά και από την ισορροπία μεταξύ ενεργοποιημένων πρωτεασών και των φυσικών αναστολέων τους (López-Otín and Matrisian, 2007; Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου, 2009). Ωστόσο, διάφορες

μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν και εξωκυτταρικές πρωτεάσες με αντι-καρκινική δράση (Overall and Kleinfeld, 2006).

1.7. ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου και ο έλεγχος της ανταπόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή εναντίον της νόσου αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για την επιτυχή αντιμετώπισή της. Σε αυτά συμβάλλουν καθοριστικά οι μοριακοί βιοδείκτες καρκίνου (tumor biomarkers). Οι δείκτες καρκίνου είναι βιομόρια (πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, μόρια DNA ή RNA) που εκκρίνονται είτε από τους ίδιους τους καρκινικούς όγκους είτε από τον υγιή οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία ενός όγκου και χρησιμεύουν ως ενδείξεις της κατάστασης και της εξέλιξης μιας κακοήθειας. Κύριο χαρακτηριστικό ενός καρκινικού βιοδείκτη είναι ότι μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά και να αξιολογηθεί παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της απόκρισης σε μια θεραπευτική αγωγή εναντίον της νόσου (Shah et al., 2014).

Οι μοριακοί δείκτες πρόγνωσης (prognostic markers) μπορούν να αυξήσουν την προγνωστική αξία των κλασικών κλινικών και παθολογικών παραμέτρων (στάδιο της νόσου, διήθηση λεμφαδένων, βαθμός αποδιαφοροποίησης), αφού μπορούν να προβλέψουν την κλινική έκβαση του καρκίνου απουσία οποιασδήποτε θεραπείας, δηλαδή μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη φυσική εξέλιξη της νόσου. Από την άλλη πλευρά, οι μοριακοί δείκτες πρόβλεψης (predictive markers) μπορούν να προβλέψουν την κλινική έκβαση του καρκίνου με βάση την απόκριση του ασθενούς σε κάποια συγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή (George and Kopetz, 2011). Επειδή οι βιοδείκτες καρκίνου σχετίζονται με την κλινική έκβαση της νόσου, μπορούν να αποτελέσουν ισχυρά εργαλεία στην Κλινική Ογκολογία (Cho, 2007).

1.7.1. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου καθορίζεται κυρίως από κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και από μοριακούς βιοδείκτες. Η ανίχνευση ενός βιοδείκτη για τον καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να γίνει στον καρκινικό ιστό, στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος και στα κόπρανα του ασθενούς. Η χρησιμότητά τους

έγκειται στην πρόβλεψη της κλινικής έκβασης της ασθένειας αλλά και στο σχεδιασμό της καταλληλότερης θεραπείας τόσο προ- όσο και μετεγχειρητικά (Bustin and Murphy, 2013). Το στάδιο TNM της νόσου, η παρουσία ή μη διηθημένων λεμφαδένων και ο βαθμός αποδιαφοροποίησης του όγκου αποτελούν τις κλασικές παραμέτρους πρόγνωσης, οι οποίες όμως παρέχουν περιορισμένη προγνωστική πληροφορία και δεν μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση στην επικουρική χημειοθεραπεία (Kelley and Venook, 2011). Ο ιστολογικός τύπος στις περισσότερες περιπτώσεις δεν προσφέρει καμία προγνωστική πληροφορία, με εξαίρεση τους βλεννώδεις καρκίνους που χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη επιβίωση των ασθενών σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα, ενώ οι καρκίνοι δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring cell carcinomas) και οι μικροκυτταρικοί καρκίνοι αναφέρονται ως εξαιρετικά διηθητικοί και έχουν κακή πρόγνωση (Feldman et al., 2010; Compton, 2003).

Ο βιοδείκτης καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (Carcinoembryonic antigen, CEA) ήταν ο πρώτος δείκτης στον ορό του αίματος που προτάθηκε για τον προσδιορισμό της έκτασης, την πρόγνωση και την παρουσία ή μη μεταστάσεων στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Thompson et al., 1969) και ως σήμερα χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Πρόκειται για μια ομάδα 19 γλυκοπρωτεϊνών που αυξάνεται λόγω της παρουσίας καρκίνου στο παχύ έντερο, αλλά και σε νεοπλάσματα του ανωτέρου πεπτικού συστήματος και άλλων οργάνων (π.χ. μαστός, πνεύμονας, στόμαχος, πάγκρεας), καθώς και σε καλοήθειες καταστάσεις (π.χ. κίρρωση ήπατος, παγκρεατίτιδα, φλεγμονές του εντέρου, νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια βρογχίτιδα, εμφύσημα) και σε καπνιστές. Σύμφωνα με τις περισσότερες σχετικές μελέτες, αυξημένα επίπεδα του CEA, πέραν των τιμών αναφοράς, έχουν ειδικότητα μεγαλύτερη του 90% και ευαισθησία που αυξάνεται αυξανόμενου του σταδίου του καρκίνου από 43% ως 69% (He and Efron, 2011). Τα προεγχειρητικά επίπεδα του CEA έχουν σχέση με την έκβαση του καρκίνου στο παχύ έντερο και πρέπει να προσδιορίζονται, ώστε να συγκριθούν με μετεγχειρητικές τιμές. Η αποτυχία μετεγχειρητικής ομαλοποίησης των επιπέδων του CEA υποδηλώνει ατελή εκτομή, ενώ η σταθερή και προοδευτική αύξηση αυτών μετά από περίοδο ομαλοποίησης, καθιστά εξαιρετικά ισχυρή την πιθανότητα υποτροπής (Carpell, 2007).

Άλλοι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι τα καρκινικά αντιγόνα CA19-9 και CA195 καθώς και η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂).

Παρόλα αυτά, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα CEA και CA19-9, έχουν χαμηλή διαγνωστική αξία, γιατί δεν είναι αυξημένα στα αρχικά στάδια του καρκίνου και γιατί αυξάνονται και σε καλοήθεις παθήσεις. Επιπλέον, η δοκιμασία gene chip-based Oncotype Dx Colon Cancer test (Genomic Health, Redwood City, CA, USA) μπορεί να προβλέψει την πιθανότητα υποτροπής σε ασθενείς σταδίου II μετά από χειρουργική αφαίρεση του όγκου, αξιολογώντας την έκφραση mRNA 12 γονιδίων σε καρκινικό ορθοκολικό ιστό. Με την ίδια τεχνολογία, η δοκιμασία έκφρασης mRNA ColoPrint (Agendia BV, Amsterdam, The Netherlands) αξιολογεί ένα σύνολο 18 γονιδίων σχετιζόμενων με την πρόγνωση (Salazar et al., 2011).

Στη μεταστατική νόσο, η συνήθης θέση απομακρυσμένης μετάστασης του καρκίνου στο παχύ έντερο είναι το ήπαρ και η παρουσία της συνεπάγεται δυσμενή πρόγνωση σε οποιαδήποτε φάση της κλινικής πορείας της κακοήθειας (Feldman et al., 2010). Στην περίπτωση αυτήν χρησιμοποιούνται οι μεταλλάξεις του *K-ras* και του *BRAF* ως βιοδείκτες πρόβλεψης της ανθεκτικότητας στις στοχευμένες θεραπείες με τα μονοκλωνικά αντισώματα Cetuximab και Panitumumab, οπότε βοηθούν στον εντοπισμό εκείνου του πληθυσμού ασθενών οι οποίοι θα έχουν τη βέλτιστη ανταπόκριση στη συγκεκριμένη θεραπεία (Chibaudel et al., 2012).

1.7.2. ΝΕΟΙ ΥΠΟΨΗΦΙΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για τον καρκίνο έχει υπάρξει αντικείμενο εκτεταμένης και επίμονης έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες, εντούτοις τα αποτελέσματα δεν έχουν δικαιώσει την προσπάθεια αυτή. Ο ιδανικός καρκινικός δείκτης θα πρέπει να μπορεί να προσδιοριστεί στο αίμα, να δίνει θετικό αποτέλεσμα μόνο στους πάσχοντες (ευαισθησία) και αρνητικό μόνο στους υγιείς (ειδικότητα), να συσχετίζεται με το στάδιο της νόσου, να παρέχει προγνωστική πληροφορία, να προβλέπει την απόκριση σε μια θεραπευτική αγωγή και ο προσδιορισμός του να μπορεί να επαναληφθεί εύκολα. Οι δείκτες καρκίνου που βρίσκονται σε χρήση σήμερα απέχουν αρκετά από το ιδανικό και δεν διαθέτουν την απαραίτητη ευαισθησία και ειδικότητα, αν και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Για το λόγο αυτό είναι σαφής η ανάγκη για την ανακάλυψη νέων δεικτών που να πληρούν τις περισσότερες, αν όχι όλες, τις προϋποθέσεις που περιγράφηκαν προηγουμένως (Pavlou et al., 2013).

Πολλοί υποψήφιοι μοριακοί δείκτες, οι οποίοι είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στις μοριακές οδούς της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο αλλά και άλλοι, βρίσκονται υπό έρευνα. Τέτοια μόρια που διερευνώνται ως προς την προγνωστική τους αξία στους καρκίνους σταδίου II/III είναι τα *Ki-67*, *BRAF*, *p53*, *Bcl-2*, *E-καδερίνη*, *β-κατενίνη*, *TGFβ*, *VEGF*, οι μεταλλοπρωτεάσες, η συνθετάση του θυμιδυλικού και η τελομεράση. Ορισμένοι υποψήφιοι δείκτες πρόβλεψης της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία με 5-φλουοουρακίλη, ιρινοτεκάνη ή οξαλιπλατίνη (π.χ. συνθετάση του θυμιδυλικού, τοποϊσομεράση I, DNA πολυμεράση β) δεν έχουν εισαχθεί στην κλινική πράξη (Ross, 2011). Ωστόσο, εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειας του καρκίνου, κανένας μεμονωμένος δείκτης δεν μπορεί να διαγνώσει ή να προβλέψει την εξέλιξη του καρκίνου με απόλυτη αξιοπιστία. Έτσι, υπάρχει πλέον η πεποίθηση ότι ο προσδιορισμός πολλών βιοδεικτών μαζί (biomarker panel), θα μπορούσε να προσδώσει την απαιτούμενη ευαισθησία και ειδικότητα για κλινική χρήση που λείπει από τους μεμονωμένους δείκτες, αξιοποιώντας τη συνολική διαγνωστική ή προγνωστική σημασία που αυτοί έχουν. Άλλωστε, ο περιορισμένος αριθμός δεικτών για τον καρκίνο του παχέος εντέρου που έχουν ως σήμερα εισαχθεί στην κλινική πράξη, έχει οδηγήσει σε αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, ακριβώς λόγω της μεμονωμένης χρήσης τους (García-Bilbao et al., 2012).

Έχουν προταθεί ως δείκτες καρκίνου, επίσης, προϊόντα του εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Τα εναλλακτικά mRNA μετάγραφα (mRNA transcript variants) που προκύπτουν από τέτοια γονίδια μπορεί να έχουν διαφορετικές δράσεις από το κλασικό mRNA, όπως για παράδειγμα τα αποπτωτικά γονίδια *Bcl-x*, *Κασπάση 9*, *Ced-4* και *Κασπάση 2/Ich-1* που μεταγράφονται παράγοντας προ- και αντι-αποπτωτικά εναλλακτικά mRNA. Πολλές φορές έχει δειχθεί ότι ορισμένα μετάγραφα mRNA είναι ιστοειδικά ή ειδικά ως προς την παρουσία κάποιας μορφής καρκίνου, επομένως θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες διάγνωσης ή πρόγνωσης. Η συσχέτιση των μεταβολών στο πρότυπο του εναλλακτικού ματίσματος με την κακοήθεια, καθιστά τα εναλλακτικά μετάγραφα ως πιθανούς βιοδείκτες, των οποίων η χρησιμότητα μένει να διερευνηθεί (Brinkman, 2004).

Μετά τη σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη των microRNAs (miRNAs), τα οποία παίζουν ρόλο στην καταστολή της μετάφρασης ή στην αποδόμηση διαφόρων mRNAs, πολλά από αυτά έχουν προταθεί ως πιθανοί δείκτες διάγνωσης ή πρόγνωσης του καρκίνου. Ένα

τέτοιο μόριο είναι το miR-92a, το οποίο εμφανίζεται σημαντικά αυξημένο στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου και έχει συσχετιστεί με τη μετάσταση και άρα με κακή πρόγνωση (Ye and Cao, 2014). Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων miRNAs σε κύτταρα του εντερικού αυλού που αποπίπτουν με τα κόπρανα, έχει βρεθεί ότι μπορούν να διακρίνουν μεταξύ υγιών ατόμων και πασχόντων από ελκώδη κολίτιδα, όπως και να παρέχουν διαφορική διάγνωση μεταξύ των σταδίων καρκίνου κατά Duke's (miR-21, miR-106a, miR-92) (Dong et al., 2011). Το miR-21 έχει προταθεί από αρκετές μελέτες ως πολλά υποσχόμενος πιθανός δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης, αφού η αυξημένη έκφρασή του συσχετίζεται με τη διήθηση των λεμφαδένων και τη μετάσταση (Kulda et al., 2010; Ye and Cao, 2014). Οι Schepeler και συν. (2007) έδειξαν ότι ο συνδυασμός τεσσάρων miRNAs (miR-142-3p, miR-212, miR-151 και miR-144) μπορεί να διαχωρίσει αποτελεσματικά τους όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια από τους μικροδορυφορικά σταθερούς, με ευαισθησία 92% και ειδικότητα 81% (Schepeler et al., 2007). Η χρησιμότητα των miRNAs ως νέων πιθανών βιοδεικτών για τον καρκίνο του παχέος εντέρου βρίσκεται υπό εντατική διερεύνηση.

Τα εξωσώματα έχουν προταθεί, επίσης, ως πιθανοί νέοι βιοδείκτες για την παρακολούθηση της εμφάνισης, της εξέλιξης και της πρόγνωσης του καρκίνου, καθώς και της αποτελεσματικότητας των φαρμακευτικών θεραπειών. Στις σχετικά λίγες μελέτες που έχουν διερευνήσει τη χρησιμότητα των εξωσωμάτων ως βιοδεικτών, έχει δειχθεί ότι μπορούν να ανιχνευτούν σε υψηλές συγκεντρώσεις στον καρκινικό ιστό και σε αρκετά βιολογικά υγρά, όπως στον ορό ή το πλάσμα του αίματος ασθενών με καρκίνο. Τα εξωσώματα μπορεί να αποτελούν ιδανικούς μη επεμβατικούς υποψήφιους βιοδείκτες καρκίνου, διότι εμφανίζουν εξατομικευμένο πρότυπο έκφρασης, συνήθως αντανακλούν την κατάσταση της νόσου και προσδιορίζονται εύκολα σε βιολογικά υγρά, ακόμα και μετά από μακροχρόνια κρυοσυντήρηση. Η παρουσία νουκλεϊκού οξέος στα εξωσώματα έχει προταθεί ως βιοδείκτης στο γλοιοβλάστωμα, μέσω της ταυτοποίησης του ειδικού ως προς την παρουσία της νόσου μεταγράφου του υποδοχέα EGFR, ενώ στο μελάνωμα έχει παρατηρηθεί η παρουσία εξωσωμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών (Caveolin-1 και CD63). Τέλος, πολλά υποσχόμενη φαίνεται να είναι η διερεύνηση μορίων miRNA που περιέχονται σε εξωσώματα, ως πιθανών καρκινικών δεικτών (Tickner et al., 2014).

Υπάρχει αυξημένη προσδοκία ότι οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται και εκείνοι που βρίσκονται υπό έρευνα, θα αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα εγκαινιάσουν μια νέα εποχή εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου (Tejpar, 2007).

2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΙΣΤΙΚΕΣ

ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ

2.1. ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ

Οι πρωτεάσες σερίνης είναι μια οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων με δράση ενδοπεπτιδάσης, οι οποίες στο ενεργό τους κέντρο διαθέτουν ένα πυρηνόφιλο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης (Ser), ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος (Asp) και ένα κατάλοιπο ιστιδίνης (His). Τα κατάλοιπα αυτά αποτελούν την επονομαζόμενη καταλυτική τριάδα. Κατά την αναδίπλωση του ενζύμου στο χώρο, το κατάλοιπο σερίνης του ενεργού κέντρου χάνει ένα πρωτόνιο (H^+) από το υδροξύλιο της πλευρικής του ομάδας, το οποίο μεταφέρεται στον ιμιδαζολικό δακτύλιο του καταλοίπου της ιστιδίνης, με αποτέλεσμα η υδροξυλομάδα να μετατραπεί σε δραστικό πυρηνόφιλο ιόν αλκοξειδίου. Η καταλυτική τους δράση συνίσταται στη πυρηνόφιλη προσβολή ενός ατόμου άνθρακα καρβονυλικής ομάδας του μορίου του υποστρώματος από τη δραστική υδροξυλομάδα. Το ενεργό κέντρο επίσης, αλληλεπιδρά μη αντιστρεπτά με τον αναστολέα διισοπροπυλ-φθοροφωσφορικό (DFP). Από όλα τα κατάλοιπα σερίνης του ενζύμου, το DFP μπορεί να αντιδράσει μόνο με την ενεργό σερίνη για να σχηματίσει φωσφορικό εστέρα (Polgár and Halász, 1982; Schultz and Liebman, 1997).

Ανάλογα με την δομική τους ομολογία, οι πρωτεάσες σερίνης έχουν οργανωθεί σε 12 ομάδες και οι περισσότερες ανήκουν στην ομάδα SA που έχουν ομοιότητα με τη θρυψίνη ή τη χυμοθρυψίνη (Borgoño et al., 2004). Αυτή η μεγάλη οικογένεια περιλαμβάνει τα πεπτικά ένζυμα (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση), αυξητικούς παράγοντες με το χαρακτηριστικό μοτίβο kringle (ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου, tPA), μερικούς από τους παράγοντες πήξης του αίματος και τις καλλικρεΐνες. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε πολλές και σημαντικές ζωτικές λειτουργίες, όπως είναι η πέψη, η πήξη του αίματος και η ινωδόλυση, η κυτταρομεσολαβητική και χυμική ανοσία, η ανάπλαση των ιστών, η ενεργοποίηση ορμονών και αυξητικών παραγόντων και η πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας. Ορισμένα από αυτά εκκρίνονται ως ανενεργά ζυμογόνα, τα οποία υφίστανται πρωτεολυτική ενεργοποίηση, ενώ άλλα είναι προσδεδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο, έχουν σημαντικό ρόλο και σε παθολογικές καταστάσεις, κυρίως νευροεκφυλιστικές ασθένειες και στον καρκίνο (Yousef and Diamandis, 2002α; Yousef and Diamandis, 2003α).

Η κατάλυση από πρωτεάσες σερίνης περιορίζεται στην υδρόλυση ενός ή δύο συγκεκριμένων πεπτιδικών δεσμών, από τους εκατοντάδες πεπτιδικούς δεσμούς που

υπάρχουν σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα (Schultz and Liebman, 1997). Οι πρωτεάσες σερίνης χαρακτηρίζονται από την προτίμησή τους στην υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών παρακείμενων σε μια συγκεκριμένη κατηγορία αμινοξέων. Οι πρωτεάσες σερίνης με ενεργότητα όμοια με της θρυψίνης, διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς που ακολουθούν βασικά αμινοξέα, όπως η αργινίνη ή η λυσίνη, εφόσον όμως υπάρχει ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού ή γλουταμινικού οξέος στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, το οποίο μπορεί να σχηματίσει ισχυρό ηλεκτροστατικό δεσμό με τα βασικά αμινοξέα. Οι πρωτεάσες σερίνης με ενεργότητα όμοια με της χυμοθρυψίνης, διαθέτουν μια μη πολική θέση πρόσδεσης του υποστρώματος με αποτέλεσμα να απαιτούν ένα αρωματικό ή ογκώδες υδρόφοβο αμινοξύ, όπως η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη ή η λευκίνη. Αντίθετα, πρωτεάσες σερίνης με δράση ελαστάσης έχουν ογκώδη αμινοξέα (βαλίνη, θρεονίνη) στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος και έτσι απαιτούν μικρά υδρόφοβα κατάλοιπα, όπως η αλανίνη (Lesk and Fordham, 1996).

2.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Ο όρος καλλικρεΐνη (Kallikrein, KLK) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στα 1930 από τους Werle και συν. για να περιγράψει πρωτεολυτικά ένζυμα με δράση κινινογενάσης που αφθονούσαν σε εκχυλίσματα παγκρέατος, το οποίο στην αρχαία ελληνική καλείται καλλίκρεας (Werle, 1934). Ο όρος αποδόθηκε στην παγκρεατική/νεφρική καλλικρεΐνη, η οποία σύμφωνα με τη νέα ονοματολογία ονομάζεται ιστική καλλικρεΐνη 1 (KLK1) και ανιχνεύθηκε αρχικά στα ούρα και κατόπιν στο πάγκρεας. Εμπλέκεται στο σύστημα των καλλικρεϊνών-κινινών (Kallikrein-kinin system) και η δράση της συνίσταται στην πέψη ενός χαμηλού μοριακού βάρους πρόδρομου μορίου (κινινογόνου) προερχόμενου από το ήπαρ, ώστε να απελευθερωθεί λυσ-βραδυκινίνη (καλλιδίνη), η οποία συμμετέχει στον έλεγχο της πίεσης του αίματος, στην ισορροπία των ηλεκτρολυτών, στη φλεγμονή κ.α (Yousef and Diamandis, 2001).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 ανακαλύφθηκαν άλλα δυο μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών: η καλλικρεΐνη 2 (ή αδενική καλλικρεΐνη) και η καλλικρεΐνη 3 (ή ειδικό προστατικό αντιγόνο, prostate-specific antigen, PSA) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *KLK2* και *KLK3/PSA* αντίστοιχα και παρουσιάζουν μεγάλη δομική ομοιότητα με το γονίδιο *KLK1*. Τα τρία αυτά γονίδια αποτελούν τις επονομαζόμενες κλασικές

καλλικρεΐνες (*KLK1*, *KLK2* και *KLK3/PSA*) και συνεντοπίζονται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.4 (Borgoño et al., 2004).

Κατά τη χρονική περίοδο 1994-2001 κλωνοποιήθηκαν και χαρτογραφήθηκαν από την ερευνητική ομάδα των Diamandis και συν. 12 νέα γονίδια που παρουσίαζαν σημαντικές δομικές ομοιότητες με τα τρία γονίδια των κλασικών καλλικρεΐνών και ένα ψευδογονίδιο (*ψKLK1*), που εντοπίζονταν επίσης στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.4. Με την προσθήκη των 12 νέων μελών, η οικογένεια των καλλικρεΐνών επεκτάθηκε στα 15 συνολικά μέλη, τα οποία ορίστηκαν ως γονίδια της οικογένειας των ιστικών καλλικρεΐνών και χαρτογραφήθηκε πλήρως ο γενετικός τους τύπος (Yousef and Diamandis, 2002β; Paliouras and Diamandis, 2006α). Σύμφωνα με την τελευταία ονοματολογία (2006), αποφασίστηκε ότι οι ιστικές καλλικρεΐνες 2 ως 15 θα ονομάζονται πλέον πεπτιδάσες σχετιζόμενες με την καλλικρεΐνη (Kallikrein-related peptidases), εννοώντας την καλλικρεΐνη 1 (*KLK1*), διότι δεν διαθέτουν αποδεδειγμένη δράση κινογενάσης, όπως η καλλικρεΐνη 1 και το μεν γονίδιο θα συμβολίζεται ως *KLK*, ενώ η αντίστοιχη πρωτεΐνη ως *KLK* (Lundwall et al., 2006). Στον Πίνακα 2.1 αναγράφονται όλα τα γονίδια των ιστικών καλλικρεΐνών με τα πολλαπλά ονόματα που τους έχουν αποδοθεί.

Πίνακας 2.1. Ονομασίες των γονιδίων των ανθρώπινων ιστικών καλλικρεΐνών.

Επίσημη ονομασία γονιδίου	Άλλες ονομασίες
<i>KLK1</i>	Pancreatic/renal kallikrein
<i>KLK2</i>	Human glandular kallikrein 1
<i>KLK3</i>	PSA (Prostate-specific antigen)
<i>KLK4</i>	Prostase, KLK-L1, PRSS17, ARM1
<i>KLK5</i>	KLK-L2, HSCTE (Human stratum corneum tryptic enzyme)
<i>KLK6</i>	Zyme, Protease M, Neurosin, PRSS9
<i>KLK7</i>	HSCCE (Human stratum corneum chymotryptic enzyme), PRSS6
<i>KLK8</i>	Neuropsin; TADG-14, PRSS19
<i>KLK9</i>	KLK-L3
<i>KLK10</i>	NES1 (Normal epithelial cell-specific gene 1), PSSSL1
<i>KLK11</i>	TLSP (Trypsin-like serine protease), Hippostasin, PRSS20
<i>KLK12</i>	KLK-L5
<i>KLK13</i>	KLK-L4
<i>KLK14</i>	KLK-L6
<i>KLK15</i>	Prostinogen

Οι καλλικρεΐνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, οι οποίες διαφέρουν σημαντικά ως προς τη δομή του γονιδίου τους, το μοριακό βάρος και την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα: τις ιστικές καλλικρεΐνες και την καλλικρεΐνη του πλάσματος (Borgoño and Diamandis, 2004). Η καλλικρεΐνη του πλάσματος ή παράγοντας Fletcher, εκφράζεται αποκλειστικά από τα ηπατικά κύτταρα και εμπλέκεται στην πήξη του αίματος, στην ινωδόλυση, στην παραγωγή κινινών και στη φλεγμονή. Το γονίδιο της καλλικρεΐνης του πλάσματος *KLKB1*, εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 4q34-35 και αποτελείται από 15 εξώνια. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια κινινογενάση, η οποία συμμετέχει στο σύστημα καλλικρεΐνών-κινινών, όπως και η ιστική καλλικρεΐνη 1 (Bhoola et al., 1992; Yousef and Diamandis, 2001).

2.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

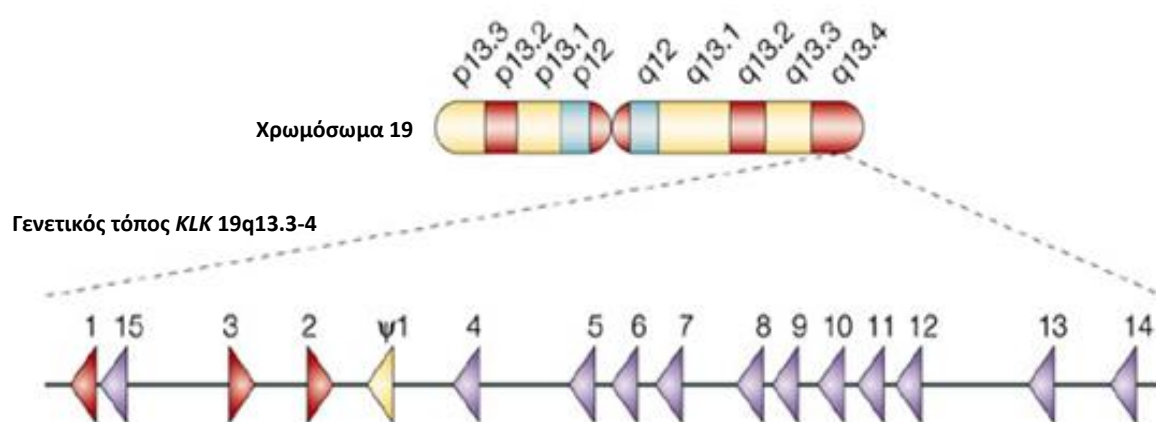
Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες αποτελούν μια υποοικογένεια 15 εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης, μοριακού βάρους 25-30 kDa, της οικογένειας S1 της εξελικτικής ομάδας PA, οι οποίες κωδικοποιούνται από τη μεγαλύτερη συστάδα διαδοχικών γονιδίων πρωτεασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι ιστικές καλλικρεΐνες εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, όλες έχουν ομοιότητες στην αλληλουχία τους σε ποσοστό 30-50% σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο. Οι τρεις κλασικές καλλικρεΐνες, όμως, έχουν κατά πολύ μεγαλύτερη ομολογία μεταξύ τους, της τάξης του 73-84% στη νουκλεοτιδική αλληλουχία και 61-77% στην αμινοξική. Εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς και βιολογικά υγρά, όπου ασκούν την πρωτεολυτική τους δράση (Yousef et al., 2000a; Borgoño and Diamandis, 2004).

2.3.1. Ο ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Τα 15 γονίδια των καλλικρεΐνών και το ψευδογονίδιο (*ΨKLK1*) εδράζονται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3-q13.4 καταλαμβάνοντας μια έκταση περίπου 265 kb στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19. Ο γενετικός τους τόπος οριοθετείται κεντρομερικά από το γονίδιο *ACPT* (όξινη φωσφατάση των όρχεων), διάφορα γονίδια που μεταγράφονται σε μικρά RNAs πυρηνίσκου (*SNORD88A*, *SNORD88B*, *SNORD88C*) και το γονίδιο *C19orf48* (αντιγόνο ελάσσονος ιστοσυμβατότητας), ενώ τελομερικά από το

γονίδιο *CTU1* (υπομονάδα 1 της κυτοσολικής θειουριδυλάσης) και το γονίδιο *Siglec-9*, μέλος της ομώνυμης γονιδιακής οικογένειας που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και κωδικοποιεί για διαμεμβρανικούς υποδοχείς λεκτίνης που δεσμεύουν σιαλικό οξύ (Yousef et al., 2001α; Michael et al., 2005).

Τα γονίδια των καλλικρεϊνών διατάσσονται σε στενή διαδοχή πάνω στο χρωμόσωμα 19 χωρίς να παρεμβάλλονται άλλα γονίδια ανάμεσά τους. Τα γονίδια των τριών κλασικών καλλικρεϊνών (*KLK1*, *KLK2* και *KLK3*) μαζί με το *KLK15* συνεντοπίζονται σε μια περιοχή μήκους περίπου 60 kb, ενώ τα γονίδια των υπόλοιπων καλλικρεϊνών (*KLK4*-*KLK14*), καθώς και το ψευδογονίδιο *ΨKLK1*, εντοπίζονται τελομερικά του *KLK2*. Η κατεύθυνση της μεταγραφής των λειτουργικών γονιδίων είναι από το τελομερές προς το κεντρομερές, εκτός των γονιδίων *KLK3* και *KLK2*, όπου ακολουθείται η αντίθετη κατεύθυνση (Diamandis and Yousef, 2002; Borgoño et al., 2004; Kontos and Scorilas, 2012). Στην Εικόνα 2.1 παρουσιάζεται σχηματικά η οργάνωση του γενετικού τόπου των καλλικρεϊνών και η κατεύθυνση της μεταγραφής των γονιδίων *KLKs*.



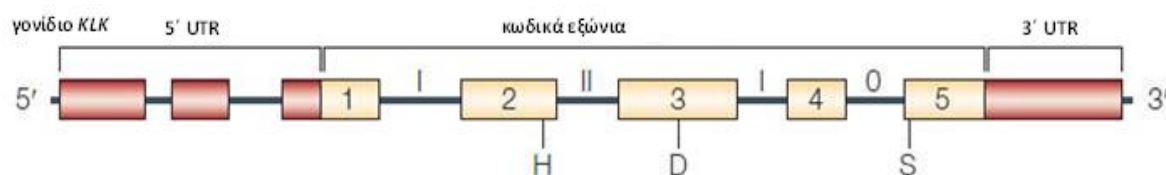
Εικόνα 2.1. Ο γενετικός τόπος και η κατεύθυνση μεταγραφής των γονιδίων *KLKs*. Τα γονίδια των κλασικών καλλικρεϊνών (*KLK1*, *KLK2* και *KLK3/PSA*) εμφανίζονται με κόκκινα βέλη, τα γονίδια *KLK4*-*KLK15* με μωβ βέλη και το ψευδογονίδιο *ΨKLK1* με κίτρινο βέλος (Borgoño and Diamandis, 2004).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του γενετικού τόπου είναι η παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε ποσοστό 34 έως 52%, ενώ οι περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνη περιορίζονται μόνο στο 4,3%. Στην πραγματικότητα, ολόκληρο το χρωμόσωμα 19 είναι ιδιαίτερος πλούσιος σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Οι πιο κοινές επαναλήψεις στο γενετικό τόπο των καλλικρεϊνών είναι τα μικρά διάσπαρτα

πυρηνικά στοιχεία (Short interspersed nuclear elements, SINES), όπως για παράδειγμα τα μεταθετά στοιχεία ALU και οι διάσπαρτες επαναλήψεις των θηλαστικών (Mammalian-wide interspersed repeats, MIRs), οι οποίες καλύπτουν σχεδόν το 22% της συνολικής αλληλουχίας του γενετικού τόπου (Yousef et al., 2001α). Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια σύντομη μικρο-δορυφορική αλληλουχία που ονομάζεται MSR1 και κυριαρχεί εντός της περιοχής 19q13.2–13.4. Η αλληλουχία αυτή είναι παρούσα στην 3' αμετάφραστη περιοχή των γονιδίων *KLK4* και *KLK14*, στα εσώνια των γονιδίων *KLK6*, *KLK7* και *KLK14*, καθώς και σε διάφορες άλλες περιοχές μεταξύ των γονιδίων. Αξιοσημείωτο εύρημα αποτελεί ότι ο αριθμός των επαναλήψεων της αλληλουχίας MSR1 στην 3' αμετάφραστη περιοχή των γονιδίων *KLK4* και *KLK14* διαφέρει μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού προστάτη και μαστού (Lawrence et al., 2010; Diamandis and Yousef, 2002).

2.3.2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Τα γονίδια των καλλικρεϊνών, εκτός του ότι εντοπίζονται σε σειρά στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή, εμφανίζουν αρκετά κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Γενικά, το μέγεθός τους κυμαίνεται από 4,4 ως 10,5 kb και η διαφορά αυτή οφείλεται στα ποικίλα μεγέθη των εσωνίων που διαθέτουν. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε στενή διαδοχή πάνω στο χρωμόσωμα 19, με τις αποστάσεις μεταξύ δυο διαδοχικών γονιδίων να κυμαίνονται από 1,5 kb (*KLK1* και *KLK15*) ως 32,5 kb (*KLK4* και *KLK5*). Ωστόσο, έχουν παρόμοια διάταξη των εξωνίων και εσωνίων τους, εξελικτικά συντηρημένες αλληλουχίες στα εσώνια και παρόμοιο ή ταυτόσημο μήκος εξωνίων (Diamandis and Yousef, 2002; Borgoño et al., 2004). Στην Εικόνα 2.2 παρουσιάζεται η τυπική δομή ενός γονιδίου της οικογένειας των καλλικρεϊνών, η οποία περιγράφεται ακολούθως.



Εικόνα 2.2. Τυπική δομή ενός γονιδίου *KLK*. Τα κίτρινα κουτιά παριστάνουν τα κωδικά εξώνια, ενώ τα κόκκινα κουτιά τα μη κωδικά εξώνια των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών (5', 3' UTRs) (Borgoño and Diamandis, 2004).

Όλα τα γονίδια αποτελούνται από 5 κωδικά εξώνια με συντηρημένο μέγεθος και δομή και 4 παρεμβαλλόμενα εσώνια. Οι θέσεις των εσωνίων σε σχέση με τα κωδικόνια των εξωνίων είναι εξελικτικά συντηρημένες σε όλα τα γονίδια των καλλιкреϊνών και το πρότυπο τους είναι πάντα I-II-I-0 (όπου 0 είναι η θέση εσωνίου μεταξύ κωδικονίων και I, II είναι η θέση εσωνίου μετά το πρώτο ή δεύτερο νουκλεοτίδιο ενός κωδικονίου, αντίστοιχα).

Το πρώτο εξώνιο περιλαμβάνει μέρος της 5' αμετάφραστης περιοχής (5' untranslated region, 5' UTR) και σε απόσταση 8-87 bp από το τέλος του, βρίσκεται το κωδικόνιο έναρξης, ενώ το εξώνιο 5 περιλαμβάνει ολόκληρη την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' untranslated region, 3' UTR) και σε απόσταση 150-189 bp από την αρχή του βρίσκεται το κωδικόνιο λήξης. Εξαιρεση αποτελεί το γονίδιο *KLK14*, το οποίο περιέχει ένα επιπλέον μη κωδικό εξώνιο στην 3' αμετάφραστη περιοχή του. Τα περισσότερα γονίδια καλλιкреϊνών περιέχουν και ένα ή περισσότερα μη κωδικά εξώνια εντός της 5' αμετάφραστης περιοχής τους (*KLK4-KLK15*), σε αντίθεση με τα γονίδια των κλασικών καλλιкреϊνών (*KLK1, KLK2, KLK3*) που δεν διαθέτουν επιπλέον μη κωδικά εξώνια στην περιοχή αυτή. Η 3' αμετάφραστη περιοχή, που βρίσκεται μετά το κωδικόνιο λήξης, διαφέρει σε μήκος μεταξύ των *KLKs*, αφού κυμαίνεται μεταξύ 45 bp στο *KLK8* και 748 bp στο *KLK7*. Έτσι, παράγονται mRNA μετάγραφα ποικίλου μεγέθους 3' UTR από κάθε γονίδιο, τα οποία όμως κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη. Οι διαφορές στις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές επηρεάζουν τη σχετική σταθερότητα των mRNA μεταγράφων των *KLKs* και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασής τους, όπως και την ευαισθησία τους στη δράση miRNAs.

Οι θέσεις κωδικοποίησης των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας στα κωδικά εξώνια είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των *KLKs*: το κωδικόνιο της ιστοιδίνης (H/His) εντοπίζεται προς το τέλος του δεύτερου κωδικού εξωνίου, το κωδικόνιο του ασπαραγινικού οξέος (D/Asp) βρίσκεται στο μέσο του τρίτου κωδικού εξωνίου και το κωδικόνιο της σερίνης (S/Ser) στην αρχή του πέμπτου κωδικού εξωνίου. Ακόμη, αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης έχουν ταυτοποιηθεί 10-20 bp από την poly(A) ουρά όλων των mRNA μορίων (Diamandis and Yousef, 2002; Borgoño and Diamandis, 2004; Clements et al., 2004; Lawrence et al., 2010).

2.3.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Στο γενετικό τόπο των καλλικρεΐνών η παραγωγή περισσότερων από ένα mRNA μεταγράφων από κάθε γονίδιο αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό. Συνολικά, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 85 εναλλακτικές ισομορφές mRNA προερχόμενες από τα 15 γονίδια των καλλικρεΐνών. Με εξαίρεση το γονίδιο *KLK14*, όλα τα υπόλοιπα γονίδια των καλλικρεΐνών παράγουν τουλάχιστον δυο εναλλακτικά μετάγραφα, με τα *KLK4* και *KLK13* να κωδικοποιούν για 8 και το *KLK3* να κωδικοποιεί για 11 (Kurlender et al., 2005).

Τα εναλλακτικά mRNA μετάγραφα είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) του πρόδρομου mRNA σε κωδικές ή μη κωδικές περιοχές. Οι διαφορετικές θέσεις ματίσματος (splice sites), η ύπαρξη εναλλακτικών υποκινητών, εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης ή θέσεων έναρξης και λήξης της μεταγραφής, καθώς και η χρήση εναλλακτικών κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς για τη δημιουργία των εναλλακτικών mRNA μεταγράφων και πρωτεϊνικών ισομορφών στην οικογένεια των καλλικρεΐνών (Yousef and Diamandis, 2002α; Kurlender et al., 2005; Emami and Diamandis, 2007β).

Στην πλειονότητα τους τα γεγονότα του ματίσματος συμβαίνουν στις κωδικές περιοχές των γονιδίων *KLKs* και αφορούν κυρίως στην έλλειψη κάποιου ενδιάμεσου κωδικού εξωνίου (κυρίως των εξωνίων 2 και 4) και δευτερευόντως στην επέκταση ή περικοπή εξωνίων ή στη διατήρηση εσωνίου (κυρίως του εσωνίου III). Μετάγραφα mRNA που έχουν βρεθεί να διατηρούν το εσώνιο III (μεταξύ των κωδικών εξωνίων 2 και 4) προέρχονται από τα γονίδια *KLK1*, *KLK2*, *KLK3*, *KLK4*, *KLK5* και *KLK15*. Αν τα μετάγραφα αυτά μεταφράζονται, θα παράγουν κολοβωμένες πρωτεΐνες, στις οποίες λείπει το κατάλοιπο σερίνης της καταλυτικής τριάδας. Μόνο μια περίπτωση διατήρησης διαφορετικού εσωνίου έχει βρεθεί και πρόκειται για το εσώνιο I στο mRNA μετάγραφο του *KLK3/PSA*, variant 2 (GenBank AF335478.1). Περικοπή εξωνίου στο 5' άκρο έχει παρατηρηθεί στα εξώνια 3, 4 και 5, ενώ περικοπή στο 3' άκρο έχει παρατηρηθεί μόνο στο εξώνιο 3. Λίγες είναι οι περιπτώσεις στις οποίες το εναλλακτικό μάτισμα συμβαίνει εντός της 5' UTR, όπου γίνεται κυρίως περικοπή εξωνίων, όπως σε κάποια μετάγραφα του *KLK5* και καθόλου εντός της 3' UTR, στην οποία όμως έχουν εντοπιστεί εναλλακτικές

θέσεις πολυαδενυλίωσης για τα mRNA των γονιδίων *KLK2*, *KLK3/PSA*, *KLK4*, *KLK6*, *KLK7* και *KLK11*. Οι θέσεις ματίσματος GT-AG παραμένουν συνήθως συντηρημένες μεταξύ των εναλλακτικών μεταγράφων των *KLKs* με ελάχιστες εξαιρέσεις. Επίσης, εναλλακτικά μετάγραφα έχουν προκύψει από διαφορετικές θέσεις έναρξης της μεταγραφής στα γονίδια *KLK3/PSA*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7* και *KLK11*, τα οποία πιθανόν είναι προϊόντα της χρήσης εναλλακτικών υποκινητών, καθώς και από εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης στα γονίδια *KLK2*, *KLK3* και *KLK7* (Borgoño et al., 2004; Kurlender et al., 2005; Michael et al., 2005; Tan et al., 2006).

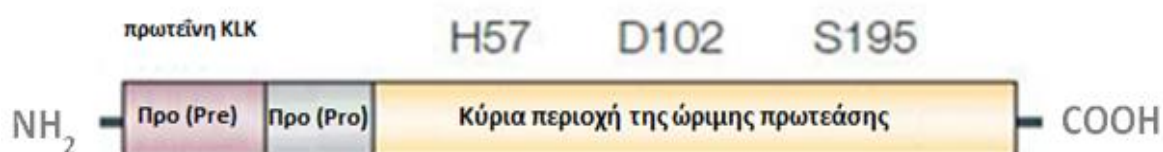
Τα περισσότερα από τα μετάγραφα που προκύπτουν με τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, θεωρητικά, κωδικοποιούν για κολοβωμένες πρωτεΐνες, από τις οποίες λείπουν ένα ή περισσότερα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας λόγω αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης (Open reading frame, ORF), με αποτέλεσμα την καταστολή της ενεργότητας πρωτεάσης σερίνης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για το πεπτίδιο σηματοδότη διατηρείται, με αποτέλεσμα οι περισσότερες ισομορφές να εκκρίνονται και θεωρητικά να προσφέρουν τη δυνατότητα ανίχνευσής τους σε βιολογικά υγρά, γεγονός που έχει μεγάλη κλινική σημασία για την ανάπτυξη νέων μοριακών δεικτών διάγνωσης, πρόγνωσης και πρόληψης ασθενειών που σχετίζονται με τις καλλικρεΐνες (Michael et al., 2005). Ωστόσο, σε μια mRNA ισομορφή του γονιδίου *KLK4*, στην οποία διατηρούνται όλα τα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας, λείπει το πεπτίδιο σηματοδότη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη που παράγεται να μην εκκρίνεται, αλλά να εντοπίζεται στον πυρήνα, όπου πιθανώς δρα ενδοκυτταρικά επιτελώντας κάποιο λειτουργικό ρόλο (Xi et al., 2004). Ακόμα και σε περιπτώσεις που η κωδική περιοχή παραμένει ακέραιη, τροποποιήσεις στις 5' ή 3' UTR επηρεάζουν τη σταθερότητα και την εντόπιση του mRNA, την ενεργοποίηση ή καταστολή της μετάφρασης αλλά και την παραγόμενη πρωτεΐνη, διότι αυτές οι περιοχές παίζουν σημαντικό ρόλο στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Tan et al., 2006).

Ορισμένα εναλλακτικά μετάγραφα των γονιδίων *KLKs* εμφανίζουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης, ενώ άλλα εμφανίζουν διαφορετική έκφραση σε διάφορες νεοπλασίες. Επιπλέον, έχουν βρεθεί εναλλακτικά μετάγραφα των γονιδίων *KLK1*, *KLK2*, *KLK3/PSA*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK11* και *KLK13*, τα οποία εκφράζονται μόνο στον καρκίνο (Dong et al., 2003; Magklara et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Tanaka et al., 2000; Kurlender

et al., 2005; Tan et al., 2006). Για παράδειγμα, έχουν εντοπιστεί τρία εναλλακτικά μετάγραφα του *KLK5* με διαφορετικές 5' UTR περιοχές, μόνο στην καρκινική κυτταρική σειρά ωοθηκών OVCAR3 αλλά όχι σε φυσιολογικό ιστό ωοθήκης, γεγονός που υποδηλώνει κάποια επιλεκτική χρήση της περιοχής 5' UTR στον καρκίνο (Dong et al., 2003). Αυτή η ιστοειδική ή καρκινο-ειδική έκφραση πολλών mRNA μεταγράφων των καλλικρεϊνών, καθώς και η διαφορική εντόπιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών (όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως για το κολοβωμένο μετάγραφο του *KLK4*) καθιστά αρκετά πιθανό τουλάχιστον ορισμένα από αυτά τα μετάγραφα να έχουν πραγματικό λειτουργικό ρόλο και όχι να είναι απλώς προϊόντα απορρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος. Το γεγονός ότι τα εναλλακτικά μετάγραφα παράγουν μοναδικές πρωτεϊνικές ισομορφές, οι οποίες εκκρίνονται σε βιολογικά υγρά, είναι ο λόγος που έχουν προταθεί επανειλημμένα ως υποψήφια μόρια για τη χρήση τους ως νέοι μοριακοί δείκτες καρκίνου (Tan et al., 2006; Borrego and Diamandis, 2004).

2.3.4. ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Όπως τα περισσότερα μέλη της οικογένειας πρωτεασών σερίνης S1A, όλες οι καλλικρεΐνες συντίθενται ως ανενεργά προ-προένζυμα (pre-proenzymes) μοριακού βάρους περίπου 30–40 kDa, που υφίστανται πρωτεολυτική ενεργοποίηση προκειμένου να αποκτήσουν την ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης. Αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που φέρει ένα πεπτίδιο σηματοδότησης (signal peptide) μήκους 16-33 αμινοξέων, ένα προπεπτίδιο ή πεπτίδιο ενεργοποίησης (propeptide) μήκους 3-9 αμινοξέων (εκτός της *KLK5* στην οποία έχει μήκος 37 αμινοξέα) και την κύρια περιοχή του ώριμου ενζύμου (223-252 αμινοξέα). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε καλλικρεΐνη διαθέτει στο ενεργό της κέντρο την εξαιρετικά συντηρημένη καταλυτική τριάδα σερίνης (S195), ιστιδίνης (H57), ασπαραγινικού (D102). Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζεται η τυπική δομή μιας πρωτεΐνης της οικογένειας των καλλικρεϊνών.



Εικόνα 2.3. Τυπική δομή των πρωτεϊνών KLKs (Borrego and Diamandis, 2004).

Η νεοσυντιθέμενη καλλικρεΐνη αρχικά κατευθύνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια ακολουθεί το εκκριτικό μονοπάτι, στο οποίο οδηγείται λόγω της παρουσίας του σηματοδοτικού πεπτιδίου. Το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόβεται από το αμινοτελικό άκρο του προ-προενζύμου πριν την έκκριση του. Μετά την αποκοπή του πεπτιδίου σηματοδότησης οι καλλικρεΐνες παραμένουν ανενεργές με την μορφή προενζύμου (ζυμογόνου) μοριακού βάρους περίπου 24-29 kDa, το οποίο έχει μήκος από 244 ως 282 αμινοξέα. Η πρωτεολυτική ενεργοποίηση του προενζύμου μπορεί να γίνει ενδοκυτταρικά στην περιοχή ωρίμανσης *trans*-Golgi ή εντός εκκριτικών κυστιδίων ή εξωκυτταρικά μετά την έκκρισή του μέσω αυτοκατάλυσης ή κατάλυσης από άλλη πρωτεάση. Έτσι, σχηματίζεται το ώριμο ένζυμο, μετά την απομάκρυνση του προπεπτιδίου μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης. Η απομάκρυνση αυτή επάγει αλλαγή της διαμόρφωσης στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ της αμινομάδας του νέου αμινο-τελικού καταλοίπου και της καρβοξυλικής ομάδας του συντηρημένου καταλοίπου Asp που βρίσκεται δίπλα στην καταλυτική Ser₁₉₅. Η διαμόρφωση αυτή είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του υποστρώματος και την καταλυτική δράση της ώριμης καλλικρεΐνης (Yousef and Diamandis, 2002α; Borrego et al., 2004; Emami and Diamandis, 2007α; Lundwall and Brattsand, 2008; Clements et al., 2004).

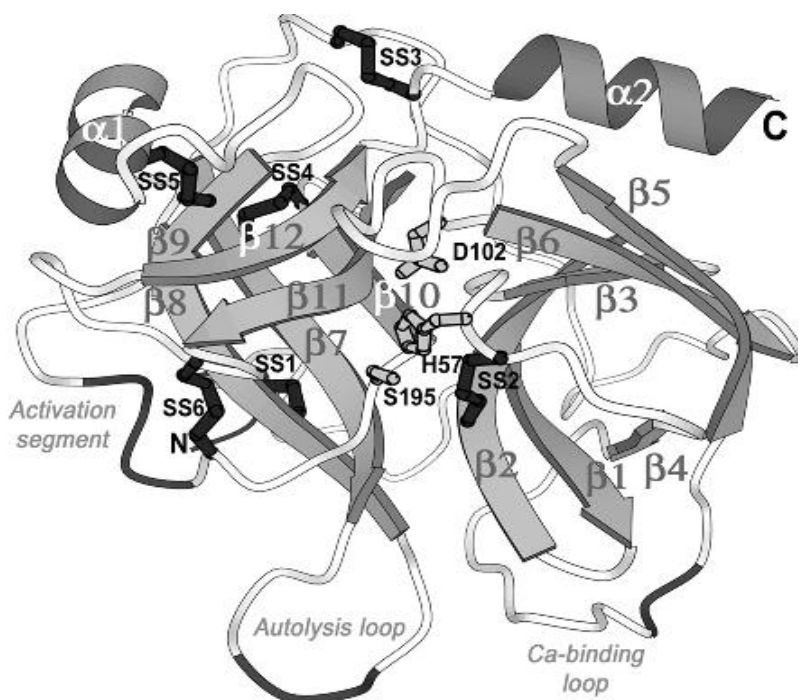
Το προπεπτίδιο αποκόπτεται μετά από τη θέση της Arg₁₆ στις KLK1, KLK2, KLK3, KLK5, KLK9, KLK10 και KLK11 ή της Lys₁₆ στις KLK6, KLK7, KLK8, KLK12, KLK13, KLK14 και KLK15, γεγονός που δείχνει ότι ενεργοποιούνται από πεπτιδάσες με ενεργότητα θρυψίνης, την οποία βέβαια διαθέτουν και ορισμένες από αυτές τις καλλικρεΐνες. Συνεπώς, θεωρήθηκε πολύ πιθανό κάποιες KLKs να ενεργοποιούν άλλες, κάτι που επιβεβαιώθηκε αργότερα με την ανακάλυψη των πρωτεολυτικών καταρρακτών στους οποίους ενέχονται. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η KLK4, η οποία διαθέτει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn₁₆), οπότε μπορεί να ενεργοποιηθεί από άλλα ένζυμα όπως η μεταλλοπρωτεάση MMP20 και η διπεπτιδυλ-πεπτιδάση I, μια κυστεϊνική πρωτεάση. Ωστόσο, πρόσφατα δείχθηκε ότι η μεταλλοπρωτεάση MMP20 μπορεί να ενεργοποιήσει 9 (pro-KLK1, pro-KLK2, pro-KLK3, pro-KLK4, pro-KLK6, pro-KLK7, pro-KLK9, pro-KLK11 και pro-KLK15) από τα 15 μέλη της οικογένειας των KLKs (Yoon et al., 2013). Γενικά, οι KLK1, KLK2, KLK3, KLK5, KLK9 και KLK11 που έχουν Arg₁₆ ενεργοποιούνται αποτελεσματικά από

άλλες καλλικρεΐνες, σε σύγκριση με εκείνες που έχουν Lys₁₆. Οι KLK2, KLK5, KLK11, KLK12 και KLK14 έχουν, επίσης, ικανότητα αυτό-ενεργοποίησης. Διάφορες πεπτιδάσες του ινοδωλυτικού μηχανισμού, όπως η πλασμίνη, ο ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου (Tissue plasminogen activator, tPA), ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (Urokinase-type plasminogen activator, uPA), ο παράγοντας Χα, η θρομβίνη και η καλλικρεΐνη του πλάσματος (KLKB1) μπορούν επίσης να αποκόψουν το προπεπτίδιο ορισμένων ιστικών καλλικρεΐνών (Yoon et al., 2007; Lawrence et al., 2010).

Μετά την ενεργοποίησή τους, οι καλλικρεΐνες δρουν ως ενδοπεπτιδάσες με την καταλυτική Ser₁₉₅ να ασκεί πυρηνόφιλη προσβολή στο άτομο άνθρακα στο καρβονυλικό ήμισυ του πεπτιδικού δεσμού του μορίου του υποστρώματος. Η ομοιότητα των καλλικρεΐνών σε αμινοξικό επίπεδο κυμαίνεται μεταξύ 40-80%, με τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στην πρωτεολυτική ενεργότητα και στην αναδίπλωση του ενζύμου στο χώρο να είναι σε υψηλό βαθμό συντηρημένα εξελικτικά μεταξύ των καλλικρεΐνών, ενώ τα κατάλοιπα που σχετίζονται με την ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα να εμφανίζουν μεγαλύτερες αποκλίσεις. Εκτός του ότι η καταλυτική τριάδα είναι ταυτόσημη μεταξύ όλων των KLKs, η μέγιστη ομολογία μεταξύ τους εμφανίζεται στις περιοχές που συνορεύουν με τα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας, αφού 39 αμινοξέα είναι πλήρως συντηρημένα σε όλες τις καλλικρεΐνες και τα 37 από αυτά υπάρχουν, επίσης, στην ανθρώπινη θρυψίνη (Lawrence et al., 2010; Emami and Diamandis, 2007a). Το αμινοξύ στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, το οποίο καθορίζει και την εξειδίκευσή τους ως προς το υπόστρωμα, εντοπίζεται έξι αμινοξικά κατάλοιπα (θέση 189) πριν το καταλυτικό κατάλοιπο Ser₁₉₅ και μπορεί να είναι Asp (KLK1, KLK2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK8, KLK12 και KLK13) το οποίο προσδίδει ειδικότητα θρυψίνης, Ser (KLK3/PSA) ή Asn (KLK7) το οποίο προσδίδει ειδικότητα χυμοθρυψίνης ή γλυκίνη (KLK9). Η KLK15, η οποία επίσης παρουσιάζει ειδικότητα θρυψίνης, έχει στη θέση 189 γλουταμινικό. Οι KLK11 και KLK14 εμφανίζουν διττή ενεργότητα θρυψίνης ή χυμοθρυψίνης (Obiezu and Diamandis, 2005; Lawrence et al., 2010; Borgoño et al., 2004; Sotiropoulou et al., 2009). Η πτύχωση των καλλικρεΐνών επιτυγχάνεται εν μέρει μέσω του σχηματισμού πέντε (για τις KLK1, KLK2, KLK3 και KLK13) ή έξι (για τις υπόλοιπες KLKs) δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ 10-12 καταλοίπων κυστεΐνης, οι θέσεις των οποίων είναι αρκετά συντηρημένες ανάμεσα στα 15 μέλη της οικογένειας (Emami and Diamandis,

2007β). Ορισμένες καλλικρεΐνες (KLK4, KLK12, KLK8 κ.α.) φέρουν ένα επιπλέον κατάλοιπο κυστεΐνης, το οποίο είναι μοναδικό σε σύγκριση με τις πεπτιδάσες σερίνης της οικογένειας S1A και πιθανόν εμπλέκεται στο σχηματισμό έβδομης δισουλφιδικής γέφυρας (Lawrence et al., 2010; Yousef et al., 2004α; Clements et al., 2004).

Ένα άλλο σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό των καλλικρεΐνών είναι η παρουσία επιφανειακών θηλειών που περιβάλλουν τη θέση δέσμωσης του υποστρώματος και εκτιμάται ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της ενεργότητας του ενζύμου, καθορίζοντας την ειδικότητα του υποστρώματος. Η τριτοταγής τους δομή αποτελείται από δύο περιοχές που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους: καθεμιά διαθέτει έξι αντιπαράλληλα β-βαρέλια και μια α-έλικα που συνδέονται μέσω του ενεργού κέντρου και των δισουλφιδικών δεσμών που σχηματίζουν τα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Εικόνα 2.4). Παρά την ποικιλομορφία που εμφανίζεται στις επιφανειακές θηλειές, η δομή του πυρήνα των καλλικρεΐνών είναι συντηρημένη, πράγμα που υποδηλώνει ότι οι καλλικρεΐνες μπορούν να διασπούν διαφορετικά υποστρώματα χρησιμοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό κατάλυσης (Gomis-Rüth et al., 2002).



Εικόνα 2.4. Η τριτοταγής δομή της pro-KLK6 με τα έξι αντιπαράλληλα β-βαρέλια (βέλη β1-β12) και τις α-έλικες (α1-α2). Κεντρικά φαίνεται το ενεργό κέντρο με την καταλυτική τριάδα αμινοξικών καταλοίπων (S195, H57, D102) και με μαύρο χρώμα απεικονίζονται οι 6 δισουλφιδικοί δεσμοί (SS1-SS6). Το καρβοξυτελικό άκρο και οι θέσεις των χαρακτηριστικών επιφανειακών θηλειών επίσης δείχνονται ως C, autolysis loop, Ca-binding loop (Gomis-Rüth et al., 2002).

2.3.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Η έκφραση των καλλικρεϊνών ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα: στο επίπεδο της μεταγραφής, της μετάφρασης και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Yousef et al., 2005α; Emami and Diamandis, 2008β).

2.3.5.1. ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Όλα γονίδια των ιστικών *KLKs* υπόκεινται σε μεταγραφική ρύθμιση από στεροειδείς ορμόνες τόσο σε ορμονοεξαρτώμενους ιστούς όσο και σε κυτταρικές σειρές. Η μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων από στεροειδείς ορμόνες ξεκινά με την πρόσδεσή τους στον κατάλληλο υποδοχέα και την απελευθέρωση της τσαπερόνης Hsp90, που είναι συνδεδεμένη με τον υποδοχέα και ρυθμίζει την ενεργότητά του. Με την απελευθέρωση της Hsp90, το σύμπλεγμα στεροειδούς ορμόνης-υποδοχέα διμερίζεται, μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται σε *cis*-ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου, με αποτέλεσμα την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης (Picard, 2006). Τέτοιες ειδικές περιοχές είναι τα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone response elements, HREs), τα οποία βρίσκονται συνήθως στον υποκινητή ή ενισχυτή του γονιδίου-στόχου. Τα συμπλέγματα στεροειδούς ορμόνης-υποδοχέα μπορούν να ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσα, το σύμπλεγμα προσδένεται στα HREs των υποκινητών ή ενισχυτών, όπου επιστρατεύει τους απαραίτητους συμπαραγόντες που θα αλληλεπιδράσουν με τους μεταγραφικούς παράγοντες. Έμμεσα, τα συμπλέγματα δεν προσδένονται στα HREs και ρυθμίζουν τη μεταγραφή μέσω αλληλεπιδράσεων με *trans*-ρυθμιστές (μεταγραφικούς παράγοντες) (Borgoño et al., 2004; Paliouras and Diamandis, 2006β; Emami and Diamandis, 2007α).

Έως σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί οι υποκινητές των γονιδίων των κλασικών καλλικρεϊνών (*KLK1*, *KLK2*, *KLK3/PSA*), όπου έχουν ανιχνευτεί αρκετά HREs σε απόσταση από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, καθώς και ο υποκινητής του *KLK10*. Συγκεκριμένα, ο υποκινητής του *KLK1* φέρει ένα στοιχείο απόκρισης σε οιστρογόνα (Estrogen response element, ERE), ενώ το *KLK2* φέρει δύο στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα (Androgen response elements, AREs), το ένα στον υποκινητή και το άλλο σε περιοχή ενισχυτή. Στο *KLK3/PSA* έχουν ταυτοποιηθεί τρία στοιχεία απόκρισης AREs, δύο

από αυτά (ARE-I και ARE-II) στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και το τρίτο (ARE-III) σε περιοχή ενισχυτή, τα οποία επάγουν την έκφρασή του στον προστάτη και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Από την άλλη πλευρά, ο υποκινητής και ο ενισχυτής του γονιδίου *KLK10* δεν διαθέτουν λειτουργικά HREs που να εμπλέκονται στην άμεση ρύθμιση μέσω συμπλεγμάτων στεροειδούς ορμόνης-υποδοχέα, ωστόσο HREs μπορεί επίσης να εδράζονται μεταξύ εξωνίων ή εντός των περιοχών UTRs του γονιδίου αυτού ή αλλού μέσα στο γενετικό τόπο των καλλικρεϊνών. Οι ρυθμιστικές περιοχές των υπόλοιπων μελών δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί λειτουργικά, όμως η ανάλυση της αλληλουχίας τους υπέδειξε την ύπαρξη AREs στους υποκινητές των *KLK4*, *KLK14* και *KLK1*. Αντίθετα, στους υποκινητές των *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK11* και *KLK13* έχουν αναγνωριστεί στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid response elements, GREs), που είναι στεροειδείς ορμόνες επαγόμενες από στρες και ρυθμίζουν τη μεταγραφή είτε επάγοντας είτε καταστέλλοντας την (Shaw and Diamandis, 2008β; Emami and Diamandis, 2007α; Paliouras and Diamandis, 2006α; Borgoño et al., 2004).

Σε ορισμένα γονίδια *KLK* έχει παρατηρηθεί διαφορετικό πρότυπο ορμονικής ρύθμισης τόσο από ανδρογόνα όσο και από οιστρογόνα. Το *KLK4* επάγεται από ανδρογόνα και προγεστίνες στον προστάτη και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, αλλά σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ενδομητρίου επάγεται από οιστρογόνα, ενώ το *KLK12* επάγεται από ανδρογόνα και προγεστίνες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη και από οιστρογόνα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού. Επίσης, σύμφωνα με μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη και μαστού, έχει παρατηρηθεί ότι, ενώ η αύξηση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των *KLK2* και *KLK3/PSA* οφείλεται σε απόκριση στα ανδρογόνα και τις προγεστίνες, στα γονίδια *KLK1*, *KLK6* και *KLK10* οφείλεται περισσότερο στα οιστρογόνα. (Diamandis and Yousef, 2002; Borgoño et al., 2004).

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι τα γονίδια *KLKs* υπόκεινται σε συνεργατική ορμονική ρύθμιση, πράγμα που υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη μηχανισμού ελέγχου από μία και μόνο περιοχή του γενετικού τόπου των καλλικρεϊνών. Για παράδειγμα, οι *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* και *KLK14* ρυθμίζονται συντονισμένα από την διυδροτεστοστερόνη και την προγεστίνη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού. Ωστόσο, κανένα από τα γονίδια αυτά δεν περιέχει χαρακτηρισμένες περιοχές HREs, γεγονός που υποδηλώνει μια

έμμεση δράση των στεροειδών ορμονών ως *trans*-ρυθμιστών της μεταγραφής των γονιδίων *KLKs* (Paliouras and Diamandis, 2006α; Paliouras and Diamandis, 2006β).

Τέλος, η μεταγραφή των *KLKs* μπορεί να ρυθμιστεί, από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης στεροειδών ορμονών με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) και της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) συμβάλλει στην ανεξάρτητη από ανδρογόνα επαγωγή της έκφρασης του *KLK3/PSA* (Borgoño et al., 2004; Paliouras and Diamandis, 2006β).

2.3.5.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Οι επιγενετικές αλλαγές είναι κληρονομούμενες τροποποιήσεις του γενετικού υλικού που δεν περιλαμβάνουν αλλαγές στην αλληλουχία του, αλλά φαινόμενα μεθυλίωσης, τροποποίησης των ιστονών και μετα-μεταγραφική αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων μέσω των miRNAs. Εκτός από το σημαντικό ρόλο των επιγενετικών τροποποιήσεων στη γονιδιακή ρύθμιση, έχει δειχθεί ότι η απορρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών συνδέεται στενά με ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Pasic et al., 2012).

Σε γενικές γραμμές, η αυξημένη μεθυλίωση (υπερ-μεθυλίωση) του DNA οδηγεί στην οργάνωση της χρωματίνης σε ετεροχρωματίνη, ενώ η μειωμένη μεθυλίωση (υπο-μεθυλίωση) προάγει το σχηματισμό ευχρωματίνης. Η μεθυλίωση του υποκινητή ενός γονιδίου σε περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης (CpG νησίδες) οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπηση της έκφρασής του (Herceg and Ushijima, 2010). Προσεγγίσεις Βιοπληροφορικής και *in silico* αναλύσεις έχουν αναδείξει 16 CpG νησίδες σε 8 γονίδια *KLKs* (Pampralakis et al., 2006). Συγκεκριμένα, υπάρχουν CpG νησίδες ανοδικά (upstream) ή μεταξύ των εσωνίων και εξωνίων στα γονίδια *KLK15*, *KLK2*, *KLK4*, *KLK5*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* και μια CpG νησίδα καθοδικά (downstream) του *KLK1*. Τα γονίδια *KLK5* και *KLK10* έχουν τις περισσότερες CpG νησίδες. Η μεγαλύτερη CpG νησίδα βρίσκεται στο τρίτο εξώνιο του *KLK10* και η υπερ-μεθυλίωσή της συνδέεται με την απώλεια της έκφρασης του γονιδίου σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης στον καρκίνο του μαστού (Kioulafa et al., 2009), στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Zhang et al., 2010) και στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Roman-Gomez et al., 2004). Σε όλες

αυτές τις αυτές περιπτώσεις η απώλεια έκφρασης του *KLK10* έχει συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και μικρότερο χρόνο επιβίωσης των ασθενών. Εντούτοις, στον καρκίνο του πνεύμονα η υπο-μεθυλίωση CpG περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *KLK13* οδηγεί σε αυξημένη κακοήθεια, ενώ στο φυσιολογικό ιστό το γονίδιο είναι υπερ-μεθυλιωμένο (Chou et al., 2011).

Πολλές CpG περιοχές στο γενετικό τόπο των καλλικρεϊνών δεν εντοπίζονται εντός των υποκινητών αλλά σε περιοχές εξωνίων και η υπερ-μεθυλίωσή τους μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα από τη μεθυλίωση του αντίστοιχου υποκινητή και να οδηγήσει στην απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου (Pasic et al., 2012).

Οι ιστόνες είναι τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά της χρωματίνης και υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες καθορίζουν τη μορφή της χρωματίνης ως ευχρωματίνη ή ετεροχρωματίνη. Για παράδειγμα, η ακετυλίωση των ιστονών καθιστά τη χρωματίνη μεταγραφικά ενεργή, διότι συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση της δομής των νουκλεοσωμάτων και διευκολύνει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτήν με αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Το αντίθετο συμβαίνει με την από-ακετυλίωση των ιστονών, που μειώνει το διάστημα μεταξύ του νουκλεοσώματος και του DNA και οδηγεί σε διαμόρφωση ετεροχρωματίνης και μεταγραφική καταστολή (Pasic et al., 2012).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όλα τα γονίδια *KLKs* ρυθμίζονται από στεροειδείς ορμόνες σε διάφορους ορμονοεξαρτώμενους ιστούς. Τα συμπλέγματα στεροειδούς ορμόνης-υποδοχέα προσδένονται στις αλληλουχίες HREs που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων αυτών, προκειμένου να επιτευχθεί η μεταγραφική ενεργοποίησή τους. Συνεπώς στις περιοχές αυτές θα πρέπει η χρωματίνη να έχει ανοικτή διαμόρφωση (ευχρωματίνη). Οι ερευνητικές ομάδες Kang και συν. (2004) και Jia και συν. (2006) μελετώντας τις τροποποιήσεις των ιστονών σε σχέση με την ορμονική ρύθμιση των γονιδίων *KLK2* και *KLK3/PSA* από ανδρογόνα σε κυτταρικές σειρές προστάτη, έδειξαν ότι η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων αυτών συνδέεται με ομοιοπολικές τροποποιήσεις ιστονών, που περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, την αυξημένη φωσφορυλίωση και τη δι- και τρι-μεθυλίωση διαφόρων καταλοίπων της ιστόνης H3 (Kang et al. 2004; Jia et al., 2006). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση του *KLK6*

στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με την ακετυλίωση της ιστόνης H4 που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου (Pampalakis and Sotiropoulou, 2006).

Η μετα-μεταγραφική αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων μέσω των miRNAs είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης διαφόρων γονιδίων, που περιλαμβάνει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των μικρού μήκους μονόκλωνων μορίων RNA (miRNAs) και του mRNA του γονιδίου μέσω ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος της νουκλεάσης RISC (RNA-induced silencing complex). Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης ή αποδόμηση του mRNA-στόχου, με αποτέλεσμα τη μείωση ή απώλεια της έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο-στόχο (Bartel, 2004).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs σχετίζεται με τον καρκίνο. Τα miRNAs μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεση του καρκίνου δρώντας είτε ως ογκο-κατασταλτικά γονίδια είτε ως ογκογονίδια. Επίσης, πολλά γονίδια miRNAs εδράζονται σε χρωμοσωμικές περιοχές που σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση καρκίνου ή σε εύθραυστες περιοχές που συχνά εμφανίζουν απώλειες ή διπλασιασμούς. Τέλος, μελέτες έχουν καταδείξει το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης αρκετών miRNAs μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπότυπων καρκίνου (Pasic et al., 2012).

In silico αναλύσεις προέβλεψαν ότι περίπου 60% των γνωστών miRNAs μπορεί να έχουν ως στόχο τα γονίδια των *KLKs*. Τα περισσότερα miRNAs προβλέφθηκε ότι στοχεύουν τα γονίδια *KLK10* και *KLK5*, ενώ τα *KLK1*, *KLK3*, *KLK8* και *KLK12* δεν φάνηκε να αποτελούν στόχο για miRNAs. Τα *KLK2*, *KLK4*, *KLK5* και *KLK10* προβλέπεται να έχουν πολλαπλές θέσεις-στόχους για miRNAs στις 3' UTR περιοχές τους. Προς επικύρωση των *in silico* αναλύσεων, έχει δειχθεί ότι το let-7f miRNA μειώνει τα επίπεδα πρωτεΐνης των *KLK6* και *KLK10* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, όπως επίσης ότι τα miRNAs let-7f, miR-224 και miR-516a στοχεύουν το *KLK10* αφού προσδεθούν στην 3' UTR περιοχή του (Yousef, 2008; White et al. 2010α). Τα ίδια miRNAs ωστόσο, επιδρούν αρνητικά στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ωθήκης, ασκώντας αντίστοιχη ρύθμιση στην έκφραση της πρωτεΐνης *KLK10* (White et al., 2010β). Αλληλεπιδράσεις miRNAs-KLKs δείχθηκαν, επίσης, στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, όπου το miR-224 καταστέλλει την έκφραση του *KLK1* και το let-7f miRNA στοχεύει και εδώ το *KLK10* (White et al. 2010α).

Φαίνεται, λοιπόν, ότι ένα γονίδιο *KLK* μπορεί να αποτελεί στόχο για αρκετά μόρια miRNAs και ότι ένα miRNA μπορεί να στοχεύει περισσότερα από ένα γονίδια *KLKs* (Pasic et al., 2012).

2.3.5.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεάσες ενεργοποιούνται συνήθως μέσω αυστηρά συντονισμένων πρωτεολυτικών καταρρακτών αντιδράσεων. Λόγω της μη αναστρέψιμης φύσης της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης, τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζονται χρονικά και χωροταξικά από κυκλικούς μηχανισμούς ανάδρασης (feedback loops) και μόρια-αναστολείς. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί πρωτεόλυσης είναι κρίσιμοι για την προστασία των κυττάρων από τα ολέθρια αποτελέσματα της ανεξέλεγκτης πρωτεολυτικής ενεργοποίησης (Emami and Diamandis, 2007β). Οι μηχανισμοί ελέγχου της ενεργότητας των πρωτεασών σερίνης περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των προενζύμων (ζυμογόνων), τους ενδογενείς αναστολείς, την απενεργοποίηση μέσω αποδόμησης τους και την αλλοστερική ρύθμιση.

Όπως προαναφέρθηκε όλα τα μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών παράγονται αρχικά ως ανενεργά προένζυμα ή ζυμογόνα που φέρουν ένα ανασταλτικό αμινο-τελικό προπεπτίδιο, το οποίο εμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Όλες οι pro-KLKs ενεργοποιούνται με περιορισμένη πρωτεόλυση του προπεπτιδίου, που επιφέρει αλλαγή της στερεοδιάταξης του ενεργού κέντρου και επιτρέπει τη δέσμευση του υποστρώματος. Η αποκοπή του προπεπτιδίου μπορεί να γίνει ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά με διάφορους μηχανισμούς ενεργοποίησης, ενζυμικούς και μη, όπως η αλλαγή του pH που οδηγεί σε αυτό-ενεργοποίηση. Για την ενεργοποίηση όλων των pro-KLKs, εκτός της pro-KLK4, απαιτείται ένζυμο με ενεργότητα θρυψίνης. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η θρυψίνη, η εντεροκινάση και KLKs με ενεργότητα θρυψίνης μπορούν να ενεργοποιήσουν pro-KLKs, κάποιες από τις οποίες, επίσης, έχουν ικανότητα αυτο-ενεργοποίησης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ενεργοποίηση της pro-KLK14 από την KLK5 και της pro-KLK3 από τις KLK2, KLK4, KLK5 και KLK15, καθώς και η αυτο-ενεργοποίηση των KLK2, KLK4, KLK6 και KLK13. Οι καλλικρεΐνες KLK2, KLK4, KLK5 και KLK14 είναι οι πιο αποτελεσματικές στην ενεργοποίηση άλλων καλλικρεϊνών (Borgoño and Diamandis, 2004; Borgoño et al., 2004; Emami and Diamandis, 2007α).

Η ενζυμική ενεργότητα των καλλικρεϊνών ελέγχεται μέσω της δέσμευσής τους σε ενδογενείς αναστολείς, όπως η α_2 -μακροσφαιρίνη (α_2 M) και οι σερπίνες (Serine protease inhibitors, SERPINS) σε βιολογικά υγρά και ιστούς. Ορισμένες καλλικρεΐνες, όπως η KLK2, σχηματίζουν μη ομοιοπολικό σύμπλοκο με την α_2 -μακροσφαιρίνη, το οποίο «παγιδεύει» την πρωτεάση και δεν της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με άλλα υποστρώματα, χωρίς όμως να χάνει την ενζυμική της ενεργότητα. Οι καλλικρεΐνες, επίσης, αλληλεπιδρούν με τις σερπίνες μέσω δυο μονοπατιών: α) με το σχηματισμό ομοιοπολικού συμπλόκου που επάγει την αποδιάταξη και τη μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση της πρωτεάσης (ανασταλτικό μονοπάτι, inhibitory pathway) και β) με την αποδόμηση της σερπίνης-αναστολέα από την KLK, που επιφέρει την απενεργοποίησή της και την παρεμπόδιση της δράσης της σε άλλα υποστρώματα (μονοπάτι του υποστρώματος, substrate pathway). Τελικά, τα σύμπλοκα KLK-σερπίνης και KLK- α_2 M απομακρύνονται από την κυκλοφορία κυρίως μέσω σύνδεσής τους με τον υποδοχέα της α_2 -μακροσφαιρίνης (α_2 M receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein) και της επακόλουθης ενδοκύτωσης ή μέσω της αποδόμησής τους από πρωτεάσες της κυκλοφορίας του αίματος. Τέλος έχει βρεθεί ότι οι αναστολείς αντιλευκοπρωτεάση (εκκρινόμενος αναστολέας πρωτεασών από λευκοκύτταρα), ελαφίνη (αντιλευκοπρωτεάση του δέρματος) και LEKTI (Lymphoepithelial Kazal-type inhibitor) πιθανόν ρυθμίζουν την ενεργότητα των KLKs στις εξωτερικές στιβάδες του δέρματος (Borgoño and Diamandis, 2004; Yousef and Diamandis, 2003β; Sotiropoulou et al., 2009).

Ένας ακόμα μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας των KLKs είναι η υδρόλυσή τους σε εσωτερική θέση του μορίου και η επακόλουθη αποδόμησή τους. Η εσωτερική διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί αυτολυτικά ή με την παρέμβαση άλλων πρωτεασών που διαθέτουν ενεργότητα θρυψίνης. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης της ενζυμικής ενεργότητας έχει παρατηρηθεί στις KLK2, KLK3, KLK6, KLK7, KLK13 και KLK14. Είναι ενδιαφέρον ότι σε κάποιες KLKs, όπως η KLK6, η ενεργότητα ρυθμίζεται με αυτό-ενεργοποίηση και στη συνέχεια με αυτό-απενεργοποίηση (Yousef and Diamandis, 2003β; Borgoño and Diamandis, 2004; Borgoño et al., 2004).

Τέλος, έχει δειχθεί ότι δισθενή κατιόντα, κυρίως ψευδαργύρου (Zn^{2+}), αναστέλλουν αντιστρεπτά τις KLK2 και KLK3/PSA μέσω της δέσμευσής τους σε δυο αλλοστερικές θέσεις των ενζύμων. Η φυσιολογική λειτουργία του προστάτη εξαρτάται από αυτόν το

μηχανισμό αλλοστερικής ρύθμισης, διότι φαίνεται ότι οι μειωμένες συγκεντρώσεις ψευδαργύρου στον καρκίνο του προστάτη σε αντίθεση με τις υψηλές συγκεντρώσεις του στο φυσιολογικό ιστό πιθανότατα εξηγούν την αυξημένη ενεργότητα των KLKs στον καρκίνο του ιστού αυτού (Yousef and Diamandis, 2002a; Borgoño and Diamandis, 2004; Borgoño et al., 2004).

2.4. ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Οι καλλικρεΐνες έχουν ανιχνευτεί σε διάφορους ιστούς και όργανα, όπως ο προστάτης, οι όρχεις, ο μαστός, οι ωοθήκες, το ενδομήτριο, ο θυρεοειδής αδένας, το πάγκρεας, οι νεφροί, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το δέρμα και οι σιελογόνοι αδένες. Στο δέρμα, στο μαστό, στον προστάτη, στο πάγκρεας και στον εγκέφαλο αρκετές καλλικρεΐνες συν-εκφράζονται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα, από όπου εκκρίνονται σε βιολογικά υγρά, όπως ο ορός του αίματος, το σπέρμα, ο ιδρώτας, το μητρικό γάλα, το σάλιο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η παρουσία των καλλικρεϊνών στα βιολογικά υγρά επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για πρωτεΐνες που εκκρίνονται *in vivo* (Borgoño and Diamandis, 2004). Ως προς την κυτταρική τους εντόπιση, σχεδόν όλες οι καλλικρεΐνες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των αδενικών επιθηλίων από όπου εκκρίνονται (Petraki et al., 2006).

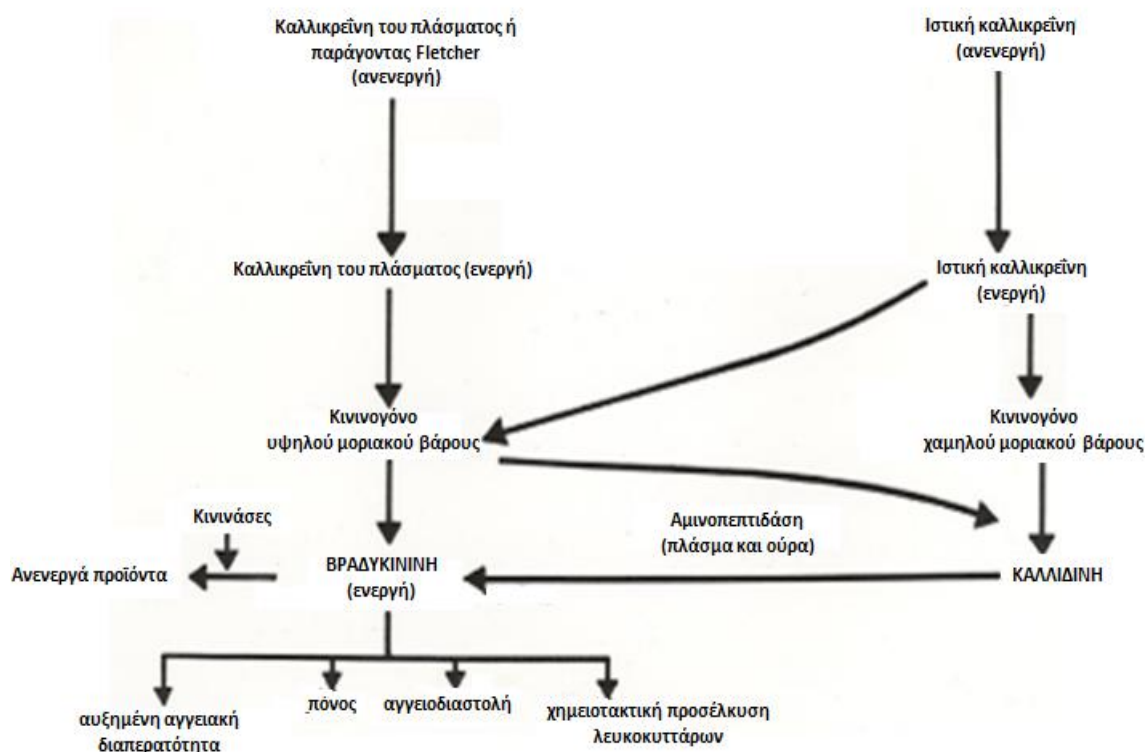
Πολλαπλές μελέτες έχουν προτείνει μεγάλο εύρος φυσιολογικών διαδικασιών στις οποίες πιθανότατα ενέχονται οι εκκρινόμενες καλλικρεΐνες και στις οποίες μπορούν να δρουν είτε ανεξάρτητα είτε συμμετέχοντας σε έναν ή περισσότερους πρωτεολυτικούς καταρράκτες αντιδράσεων (proteolytic cascades). Οι βιολογικοί ρόλοι των καλλικρεϊνών στη φυσιολογία του οργανισμού καθώς και τα φυσιολογικά τους υποστρώματα *in vivo* δεν είναι πλήρως γνωστά, αν και την τελευταία δεκαετία έχει προστεθεί αρκετή επιπλέον γνώση. Τα πιθανά υποστρώματα των καλλικρεϊνών ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες και περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες και άλλα μόρια σηματοδότησης, συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης και υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων. Πολλά από τα υποστρώματα των καλλικρεϊνών έχουν προταθεί μετά από βιοχημικές πειραματικές δοκιμασίες, στις οποίες μελετήθηκαν σε συνδυασμό με ανασυνδυασμένα μόρια καλλικρεϊνών. Συνεπώς, πολλοί από τους

ρόλους που έχουν προταθεί για τις καλλικρεΐνες σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις είναι κατά βάση θεωρητικοί. Αναμένεται να διευκρινιστούν περαιτέρω τα επόμενα χρόνια μετά από Πρωτεομικές αναλύσεις και μελέτες με μοντέλα *in vivo* (Lawrence et al., 2010). Περισσότερο έχει μελετηθεί ο βιολογικός ρόλος των κλασικών καλλικρεΐνων (KLK1, KLK2 και KLK3/PSA), οι οποίες είναι γνωστές από πολύ νωρίτερα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα 12 μέλη της οικογένειας.

2.4.1. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ-ΚΙΝΙΝΩΝ

Η KLK1 εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό ιστών, συμπεριλαμβανομένων των αγγείων, των νεφρών, του κεντρικού νευρικού συστήματος, του παγκρέατος, των σιελογόνων και ιδρωτοποιών αδένων, του σπλήνα και των επινεφριδίων και έχει παρακρινή δράση. Το μικρού μοριακού βάρους κινινογόνο (low molecular weight kininogen, LMWK) είναι το πρώτο υπόστρωμα που ταυτοποιήθηκε για την KLK1, η οποία το διασπά σε δυο θέσεις και απελευθερώνει το δεκαπεπτίδιο λυσ-βραδυκινίνη ή καλλιδίνη, το οποίο μπορεί να κοπεί περαιτέρω από άλλες πεπτιδάσες σε ένα εννιαπεπτίδιο, την des-Arg¹⁰-καλλιδίνη. Η καλλιδίνη και η des-Arg¹⁰-καλλιδίνη είναι κινίνες που μεσολαβούν στις δράσεις της KLK1 στα κύτταρα, αφού δεσμευτούν στους υποδοχείς βραδυκινίνης B1 και B2 των ιστών-στόχων. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς αυτοί, που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες, επάγουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, προσταγλανδινών και άλλων μεσολαβητικών μορίων που πυροδοτούν την αγγειοδιαστολή, τη συστολή ή διαστολή λείων μυών, τη φλεγμονή και τον πόνο, ρυθμίζοντας διαδικασίες όπως η πίεση του αίματος, η διαπερατότητα των αγγείων, η χημειοτακτική προσέλκυση ουδετερόφιλων και η ισορροπία των ηλεκτρολυτών (Moreau et al., 2005). Εκτός από την ενεργότητα κινινογενάσης, η KLK1 μπορεί να διασπά πρωτεολυτικά την προΐνσουλίνη, τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Low density lipoprotein, LDL), την προρενίνη, τη προκολλαγενάση και την αγγειοτενσίνη. Επίσης, συμμετέχει στην υδρόλυση αυξητικών παραγόντων και πεπτιδικών ορμονών στην υπόφυση, στο πάγκρεας και σε άλλους ιστούς (Borgoño et al., 2004; Rampalakis and Sotiropoulou, 2007). Είναι αξιοσημείωτο, ακόμη, ότι η KLK1 μπορεί να είναι φυσιολογικός ρυθμιστής του μεταβολισμού ασβεστίου, σύμφωνα με μελέτη των Picard και συν. (Picard et al, 2005).

Το γονίδιο της καλλικρεΐνης του πλάσματος *KLKB1*, που κωδικοποιεί για μια κινινογενάση (παράγοντας Fletcher), συμμετέχει, όπως και η ιστική KLK1, στο σύστημα καλλικρεϊνών-κινινών, απελευθερώνοντας το ενεργό πεπτικό βραδυκινίνη από ένα υψηλού μοριακού βάρους πρόδρομο μόριο (κινινογόνο) (high molecular weight kininogen, HMWK) που παράγεται στο ήπαρ. Επίσης, η καλλικρεΐνη του πλάσματος εμπλέκεται στη διαδικασία της πήξης του αίματος και της ινωδολύσης (Yousef and Diamandis, 2001). Το σύστημα καλλικρεϊνών-κινινών (Εικόνα 2.5) έχει προστατευτικό ρόλο σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στο εγκεφαλικό επεισόδιο και στη δυσλειτουργία των νεφρών, αλλά οξύνει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις όπως το άσθμα (Chao et al., 2006).



Εικόνα 2.5. Το σύστημα καλλικρεϊνών-κινινών (Kallikrein-kinin system) (Sharma and Narayanan, 2011).

2.4.2. Ο ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΟΣ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΡΟΛΟΙ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ

Το δέρμα είναι ένα πολυλειτουργικό όργανο που προστατεύει τον οργανισμό από μηχανικές πιέσεις, από την υπερϊώδη ακτινοβολία και την αφυδάτωση και από τοξίνες και παθογόνους μικροοργανισμούς. Η επιδερμίδα είναι η εξωτερική στιβάδα του

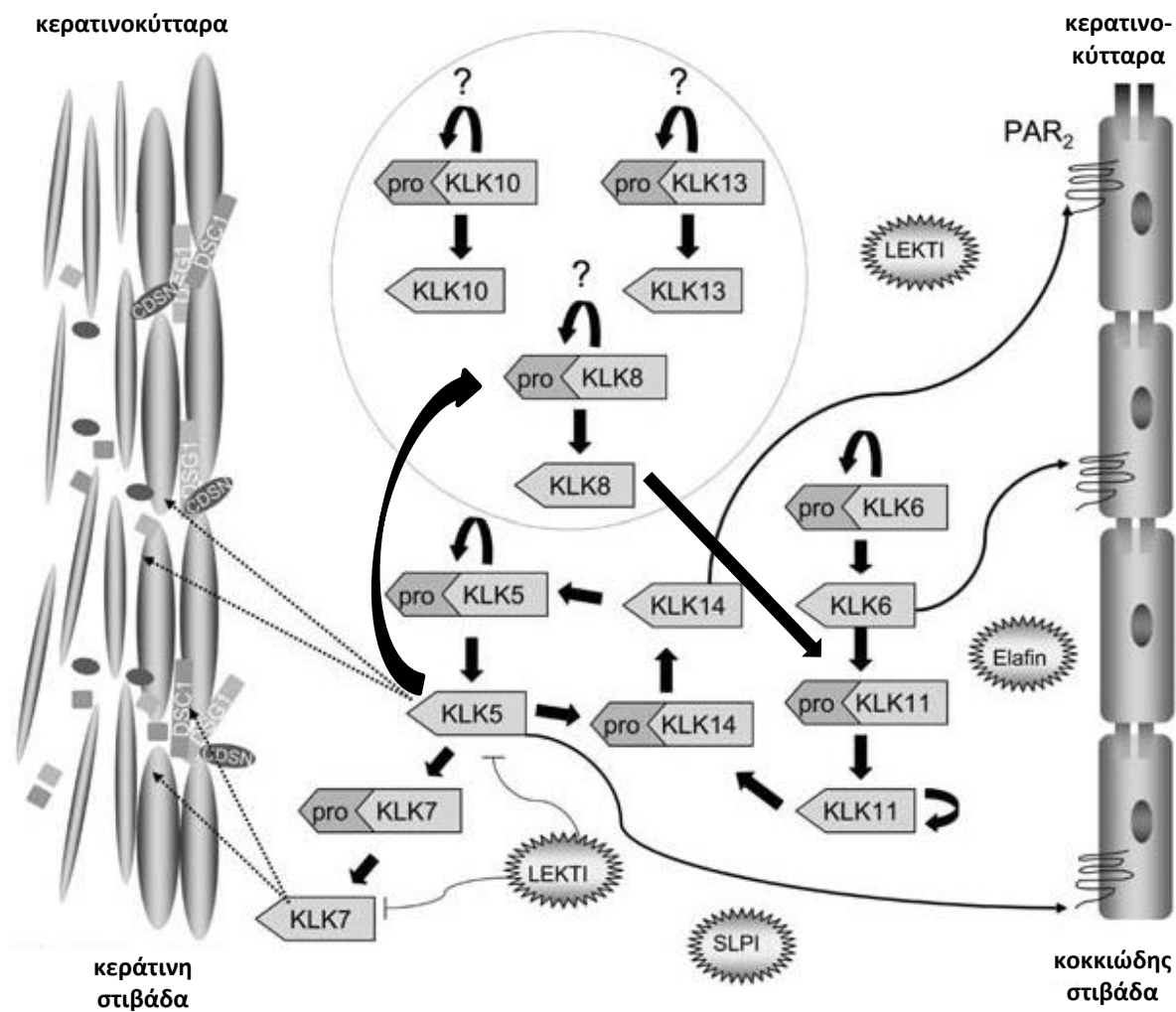
δέρματος που εξυπηρετεί τις λειτουργίες του δερματικού φραγμού. Δομείται κυρίως από κερατινοκύτταρα που σχηματίζουν μια βασική κυτταρική στιβάδα. Από τη στιβάδα αυτή τα κύτταρα μεταναστεύουν προς την επιφάνεια του δέρματος, ενώ ταυτόχρονα υφίστανται αυστηρά ελεγχόμενη διαφοροποίηση. Όταν φτάσουν στην εξωτερική επιφάνεια, δηλαδή στην κεράτινη στιβάδα του δέρματος, είναι απύρνηνα και μεταβολικά νεκρά πεπλατυσμένα κύτταρα, το κυτταρόπλασμα των οποίων είναι γεμάτο από μια σκληρή πρωτεΐνη, την κερατίνη (Candi et al., 2005). Τα κύτταρα συνήθως παραμένουν στην κεράτινη στιβάδα για 1 ως 4 εβδομάδες πριν αποπέσουν μέσω της διαδικασίας της φυσιολογικής απολέπισης του δέρματος (skin desquamation). Η διατήρηση της ομοιότητας της επιδερμίδας βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων στη βασική κυτταρική στιβάδα και της απόπτωσής τους από την κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας. Η ανισορροπία μεταξύ των δυο διαδικασιών οδηγεί σε ασθένειες, όπως η ψωρίαση (πολύ υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού) ή η ιχθύωση (πολύ αργός ρυθμός απολέπισης) (Egelrud, 2000).

Η ενεργότητα πρωτεασών είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική απολέπιση στο δέρμα. Συγκεκριμένα, η πρωτεολυτική αποδόμηση των κερατινοδεσμοσωμάτων (corneodesmosomes), που είναι δομές που συγκρατούν τα κερατινοκύτταρα μεταξύ τους, είναι αναγκαία για να συμβεί η απολέπιση *in vitro* (Suzuki et al., 1994). Τα κερατινοδεσμοσώματα έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του ιστού και στην κυτταρική προσκόλληση μέσω ασβεστιο-εξαρτώμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ δυο οικογενειών διαμεμβρανικών καδερινών (Cadherins) των δεσμοσωμάτων: των δεσμογλεϊνών 1-4 (Desmogleins 1-4, DSG1-4) και των δεσμοκολλινών 1-3 (Desmocollins 1-3, DSC1-3). Στην κεράτινη στιβάδα οι πλέον άφθονες ισομορφές τους είναι οι DSG1, DSG4 και η DSC1. Τα κερατινοδεσμοσώματα, επίσης, περιέχουν και ένα γλυκοπρωτεϊνικό συστατικό, την κερατινοδεσμοσίνη (corneodesmosin, CDSN). Διάφορες πρωτεάσες σερίνης με ενεργότητα θρυψίνης ή χυμοθρυψίνης ενέχονται στη δερματική απολέπιση, η οποία απαιτεί την πρωτεόλυση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης DSG1 και DSC1 και της CDSN και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιότητας του δέρματος (Borgoño et al., 2007α). Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας της επιδερμίδας συνθέτουν πρωτεάσες (μεταξύ των οποίων και καλλικρεΐνες) και αναστολείς τους, οι οποίοι περιέχονται σε εκκριτικά κοκκία (πεταλιώδη κοκκία) και έτσι

μεταφέρονται στον εξωκυττάριο χώρο της κεράτινης στιβάδας. Τα πεταλιώδη κοκκία συντήκονται με τις μεμβράνες της ανώτατης στιβάδας κοκκιοκυττάρων και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους σε εξωκυτταρικά διαστήματα. Η έκκριση από τα ανώτερα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επιτρέπει στις KLKs να διοχετευτούν και να στοχεύσουν τα υποστρώματά τους στα κερατινοδεσμοσώματα, με αποτέλεσμα την αποδόμηση των αντίστοιχων πρωτεϊνών προσκόλλησης και την απολέπιση της επιδερμίδας (Braff et al., 2005; Eissa and Diamandis, 2008).

Τρία ένζυμα καλλικρεϊνών έχουν απομονωθεί σε ενεργή μορφή από την κεράτινη στιβάδα του δέρματος: οι KLK5, KLK7 και KLK14. Οι KLK5 (με το αρχικό όνομα human stratum corneum tryptic enzyme, HSCTE) και KLK7 (με το αρχικό όνομα human stratum corneum chymotryptic enzyme, HSCCE) εκφράζονται και οι δυο στην επιφάνεια της κεράτινης στιβάδας, ενώ η KLK14 εκφράζεται κυρίως στους ιδρωτοποιούς αδένες, αν και χαμηλά επίπεδα έκφρασής της έχουν ανιχνευτεί και στις εξωτερικές στιβάδες της επιδερμίδας (Borgoño et al., 2007α; Lunwall and Brattsand, 2008). Οι Stefansson και συν. (2006) έδειξαν ότι η KLK14 είναι υπεύθυνη για το 50% περίπου της συνολικής ενεργότητας θρυψίνης στην κεράτινη στιβάδα (Stefansson et al., 2006).

Οι KLK5 και KLK7 εκφράζονται στο μέγιστο βαθμό στην κοκκιώδη στιβάδα της επιδερμίδας και μεταφέρονται στην κεράτινη στιβάδα, όπου συμμετέχουν σε πρωτεολυτικό καταρράκτη αντιδράσεων κατά τον οποίο η KLK5 αυτό-ενεργοποιείται και ενεργοποιεί την KLK7. Η ενεργή KLK5 διασπά τη δεσμογλεΐνη 1 (DSG1), τη δεσμοκολλίνη 1 (DSC1) και την κερατινοδεσμοσίνη (CDSN) *in vitro*, ενώ η ενεργή KLK7 μπορεί να διασπάσει τη DSC1 και την CDSN *in vitro* (Brattsand et al., 2005, Borgoño et al., 2007α). Επίσης, δείχθηκε πρόσφατα ότι η ενεργή KLK7 μπορεί να ενεργοποιεί πρωτεολυτικά την προ-κασπάση 14 σε καλλιέργεια κερατινοκυττάρων, οπότε πιθανόν εμπλέκεται στη ρύθμιση της ωρίμανσης της προ-κασπάσης 14 κατά την τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Yamamoto et al., 2012). Η KLK14 πιθανότατα συμμετέχει στον πρωτεολυτικό καταρράκτη του δέρματος μαζί με τις KLK5 και KLK7, λόγω του ότι μπορεί να ενεργοποιήσει και να ενεργοποιηθεί από την KLK5 (Borgoño et al., 2007α; Pampalakis and Sotiropoulou, 2007). Στην Εικόνα 2.6 παρουσιάζεται σχηματικά ο πρωτεολυτικός καταρράκτης αντιδράσεων που οδηγεί στην αποδόμηση των δεσμοσωμάτων και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων.



Εικόνα 2.6. Πρωτεολυτικός καταρράκτης αντιδράσεων που οδηγεί στην αποδόμηση των δεσμοσωμάτων και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων από την κεράτινη στιβάδα του δέρματος. Με έντονα μαύρα βέλη απεικονίζονται οι γνωστές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των 8 καλλικρεϊνών (KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13 και KLK14) που εκφράζονται στην κεράτινη στιβάδα και συμμετέχουν στον ιστοειδικό καταρράκτη ενεργοποίησης στο δέρμα. Οι μη γνωστές πιθανές αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται με ερωτηματικό. Μετά την ενεργοποίηση οι KLK5 και KLK7 στοχεύουν τα κερατινοδεσμοσώματα (DSG1, DSG4, DSC1 και CDSN) με αποτέλεσμα την απολέπιση του δέρματος ή οι KLK5, KLK6 και KLK14 στοχεύουν τον υποδοχέα PAR2 στα κερατινοκύτταρα. Οι αναστολείς πρωτεασών σερίνης του δέρματος (LEKTI, ελαφίνη και SLPI) ρυθμίζουν την ενεργότητα των KLKs στην επιδερμίδα (Eissa and Diamandis, 2008).

Στην επιδερμίδα εκφράζονται και άλλες καλλικρεΐνες, όπως οι KLK1, KLK4, KLK6, KLK8, KLK10, KLK11 και KLK13 (Lundwall and Brattsand, 2008). Η KLK8 είναι από τις πλέον άφθονες καλλικρεΐνες με ενεργότητα θρυψίνης στο φυσιολογική κεράτινη στιβάδα και στον ιδρώτα. Παρατηρήθηκε ότι η KLK8 εκκρίνεται ειδικά από τα κερατινοκύτταρα και όχι από τα μελανοκύτταρα και τους ινοβλάστες του δέρματος και ότι η έκκρισή της είναι αυξημένη κατά την τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Η KLK8 ενεργοποιεί

την pro-KLK11 και ενεργοποιείται από την KLK5 *in vitro* (Eissa et al., 2011). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η απουσία έκφρασης της KLK8 στο δέρμα *in vivo* οδηγεί σε υπερκεράτωση και καθυστερεί την ανάρρωση της επιδερμίδας μετά από φλεγμονή που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία (Kishibe et al., 2007; Kirihara et al., 2003). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν έναν σημαντικό ρόλο για την KLK8 στη φυσιολογία του δέρματος.

Η KLK6 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων και στην εμφάνιση ψωρίασης, συνεπώς θεωρείται ότι και αυτή συμμετέχει στον καταρράκτη αντιδράσεων των καλλικρεϊνών στο δέρμα (Lin et al., 2002; Komatsu et al., 2005). Οι KLK3 και KLK9 δεν φαίνεται να εκφράζονται στην επιδερμίδα, οπότε πιθανότατα η ενεργότητα χυμοθρυψίνης που παρατηρείται σε αυτήν οφείλεται εξολοκλήρου στην KLK7. Η KLK11 στο δέρμα έχει δειχθεί ότι αυτό-ενεργοποιείται αλλά ενεργοποιείται και από την KLK6 και μπορεί στη συνέχεια να ενεργοποιεί την pro-KLK14. Επίσης, οι Komatsu και συν. (2003) έδειξαν ότι οι καλλικρεΐνες KLK5, KLK6, KLK7 και KLK14 εκφράζονται και στη δερμίδα (στιβάδα του δέρματος που κείται κάτω από την επιδερμίδα), στους σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες, στους θύλακες των τριχών και στα νεύρα (Komatsu et al., 2003).

Το πρωτεολυτικό μονοπάτι των καλλικρεϊνών που οδηγεί στην απολέπιση της κεράτινης στιβάδας ρυθμίζεται από τον αναστολέα πρωτεασών σερίνης LEKTI (Lymphoepithelial Kazal-type inhibitor), ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο *SPINK5*. Ο παράγοντας *SPINK5* είναι μια εκκρινόμενη σερίνη που απαιτεί πρωτεολυτική διάσπαση προκειμένου να απελευθερωθούν τα ενεργά ανασταλτικά πεπτίδια. Μεταλλάξεις του γονιδίου *SPINK5* που οδηγούν σε απώλεια του LEKTI, έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα των KLK5 και KLK7 και την αυξημένη δερματική απολέπιση (π.χ. σύνδρομο Netherton) (Descargues et al., 2005). Άλλοι αναστολείς που ελέγχουν την πρωτεολυτική δραστηριότητα των καλλικρεϊνών στην επιδερμίδα είναι η ελαφίνη και η εκκρινόμενη αντιλευκοπρωτεάση SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI), οι οποίοι αναστέλλουν κυρίως την KLK7 και όχι τις KLK5, KLK6, KLK13 και KLK14 (Pampalakis and Sotiropoulou, 2007; Borgoño et al., 2007α).

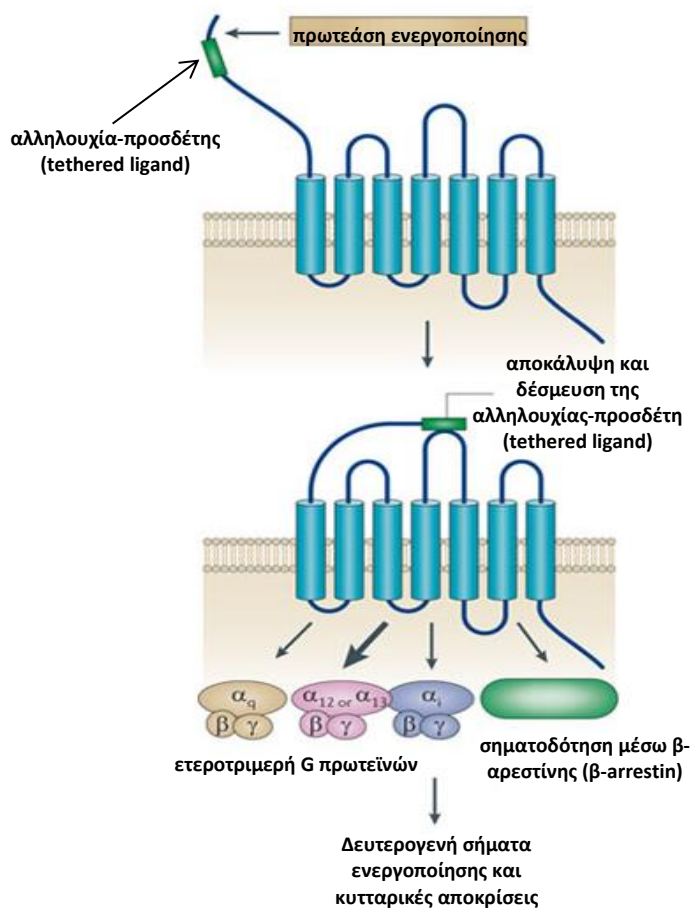
Η ενεργότητα των καλλικρεϊνών στο δέρμα ρυθμίζεται, επίσης, από τις διαβαθμίσεις του pH. Οι KLK5 και KLK7 έχουν μέγιστη ενεργότητα σε ουδέτερο pH και διατηρούν σημαντική ενεργότητα όταν το pH είναι όξινο, οπότε μπορούν να αποδομήσουν τις

DSG1, DSC1 και CDSN των κερατινοδεσμοσωμάτων. Το pH της επιδερμίδας δρα αμφίδρομα στη ρύθμιση της ενεργότητας ή της αναστολής των καλλικρεϊνών, ελέγχοντας την κινητική της αλληλεπίδρασης μεταξύ καλλικρεϊνών και ανασταλτικών πεπτιδίων LEKTI. Η ρύθμιση της ενεργότητας των KLKs από τη διαβάθμιση του pH της επιδερμίδας, υποδηλώνει ότι αυτές ενέχονται και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του δέρματος, πέραν της απολέπισης της κεράτινης στιβάδας (Eissa and Diamandis, 2008).

Πράγματι, έχει δειχθεί ότι οι καλλικρεΐνες στο δέρμα παίζουν ρόλο, επίσης, στην προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα κερατινοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα εκφράζουν τα αντιμικροβιακά πεπτίδια καθελιδίνες (cathelicidins), τα οποία έχουν κρίσιμο ρόλο στην μη ειδική άμυνα του οργανισμού έναντι της εισβολής βακτηρίων. Οι KLK5 και KLK7 ενεργοποιούν πρωτεολυτικά τα πολυπεπτίδια της οικογένειας των καθελιδινών από μια πρόδρομη ανενεργή μορφή τους (hCAP18), με αποτέλεσμα να επάγεται φλεγμονώδης αντίδραση του ξενιστή σε απόκριση σε κάποια μόλυνση (Yamasaki et al., 2006).

Όλο και περισσότερα στοιχεία μαρτυρούν το ρόλο των καλλικρεϊνών ως ρυθμιστών της σηματοδότησης μέσω υποδοχέων PARs (Proteinase-activated receptors, PARs) (Eissa and Diamandis, 2008). Οι ενεργοποιούμενοι από πρωτεάσες υποδοχείς PARs είναι μέλη μιας οικογένειας τεσσάρων διαμεμβρανικών υποδοχέων (PAR1-4) συζευγμένων με G πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες σερίνης όπως η θρυψίνη, η τρυπτάση των ιστιοκυττάρων, η καθεψίνη G και η θρομβίνη. Οι επιφανειακοί υποδοχείς PARs εκφράζονται στα κερατινοκύτταρα (PAR2), στα μελανοκύτταρα (PAR1), στους ινοβλάστες (PAR2), στους νευρώνες (PAR2) και στα τριχοειδή αγγεία της επιδερμίδας (PAR1). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων PARs πραγματοποιείται με τη μη αντιστρεπτή πρωτεολυτική αποκοπή ενός εξωκυττάρου αμινο-τελικού πεπτιδίου και την επακόλουθη αποκάλυψη μιας αμινο-τελικής αλληλουχίας-προσδέτη (tethered ligand), η οποία στη συνέχεια δεσμεύεται σε εξωκυτταρικές θηλειές του υποδοχέα και πυροδοτεί ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση οδηγεί στην αλληλεπίδραση με το ετεροτριμερές των G πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη και έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή σηματοδότησης (Ramachandran et al., 2012; Hansen et al., 2008; Stefansson et al., 2008; Rattenholl and Steinhoff, 2003). Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζεται η δομή και ο μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχέων PARs.

Ωστόσο, αν μια πρωτεάση σερίνης αποκόψει το αμινο-τελικό εξωκυττάριο άκρο του υποδοχέα σε θέση μετά (downstream) από την αλληλουχία-προσδέτη (tethered ligand), τότε ο υποδοχέας PAR «αφοπλίζεται» και δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί από το ένζυμο που τον στοχεύει (π.χ. θρομβίνη ή θρυψίνη). Για τον υποδοχέα PAR2 έχει δειχθεί ότι ένα ένζυμο, όπως η ελαστάση, που μπορεί να καταστείλει τη σηματοδότηση που προκαλεί η θρυψίνη μέσω του PAR2, μπορεί να τον ενεργοποιήσει επιλεκτικά (biased activation) μέσω του μιτογόνου μονοπατιού των MAP κινασών (MAPKs), χωρίς να πυροδοτήσει την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου που προκαλεί η κανονική ενεργοποίησή του από τη θρυψίνη (Soh et al., 2010; Ramachandran et al., 2011).



Εικόνα 2.7. Μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχέων PARs. Η πρωτεολυτική αποκοπή του αμινο-τελικού πεπτιδίου και η αποκάλυψη της αλληλουχίας-προσδέτη (tethered ligand) διεγείρει τη σηματοδότηση (Ramachandran et al., 2012).

Οι υποδοχείς PARs μπορεί να αποτελούν στόχο των ενεργών KLK5, KLK6 και KLK14 *in vitro* και *in vivo*. Οι KLK5 και KLK6 δείχθηκε ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν τον PAR2, ενώ η KLK14 μπορεί να απενεργοποιήσει τον PAR1 και να ενεργοποιήσει τους PAR2 και PAR4 (Οικονομοπούλου et al., 2006; Stefansson et al., 2008). Μεταξύ των τεσσάρων υποδοχέων PARs, ο PAR2 παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, διότι ενεργοποιείται από ένζυμα με ενεργότητα θρυψίνης και εντοπίζεται μαζί με τις ιστικές καλλικρεΐνες στα κερατινοκύτταρα και στην κοκκιώδη στιβάδα της επιδερμίδας, όπου πιθανώς λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, αλλά και στους σμηγματογόνους αδένες της δερμίδας. Επίσης, εντοπίζεται στα δερματικά δενδριτικά κύτταρα και εμπλέκεται στη φλεγμονή, δρώντας πιθανώς επαγωγικά στον πόνο.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι ρόλοι των ιστικών καλλικρεΐνών στο δέρμα εμφανίζουν αρκετά μεγαλύτερο εύρος από ότι αρχικά πιστευόταν, αφού περιλαμβάνουν τη συμμετοχή σε σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω υποδοχέων της επιφάνειας των κερατινοκυττάρων (όπως οι PARs) και την πρωτεολυτική ενεργοποίηση καταρρακτών αντιδράσεων σε αλληλεπίδραση με τις καλλικρεΐνες της επιδερμίδας και πιθανόν άλλες επιδερμικές πρωτεάσες (Eissa and Diamandis, 2008).

2.4.3. Ο ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΟΣ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΡΕΥΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Αντίθετα από την KLK1, οι ιστικές καλλικρεΐνες KLK2 και KLK3 έχουν σχετικά χαμηλή ενεργότητα κινινογενάσης. Οι ενζυμικά ενεργές KLK2 και KLK3 συμμετέχουν σε πρωτεολυτικό μονοπάτι κατά τη ρευστοποίηση του σπέρματος μετά την εκσπερμάτιση (Borgoño et al., 2004). Οι πρωτεΐνες σεμινογελίνες I και II (Seminogelins, SgI, SgII) εκκρίνονται μέσω σπερματικών κυστιδίων που περιέχονται στο ανθρώπινο σπέρμα και συσσωματώνονται με τη φμπρονεκτίνη μετά την εκσπερμάτιση, σχηματίζοντας μια ζελατινώδη μάζα που ρευστοποιείται σε 5 ως 20 λεπτά. Αποτέλεσμα της ρευστοποίησης του σπέρματος είναι η απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων, η οποία είναι απαραίτητη για την κινητικότητά τους κατά τη γονιμοποίηση. Ένας μηχανισμός συσσωμάτωσης περιλαμβάνει τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών (Malm et al., 1996).

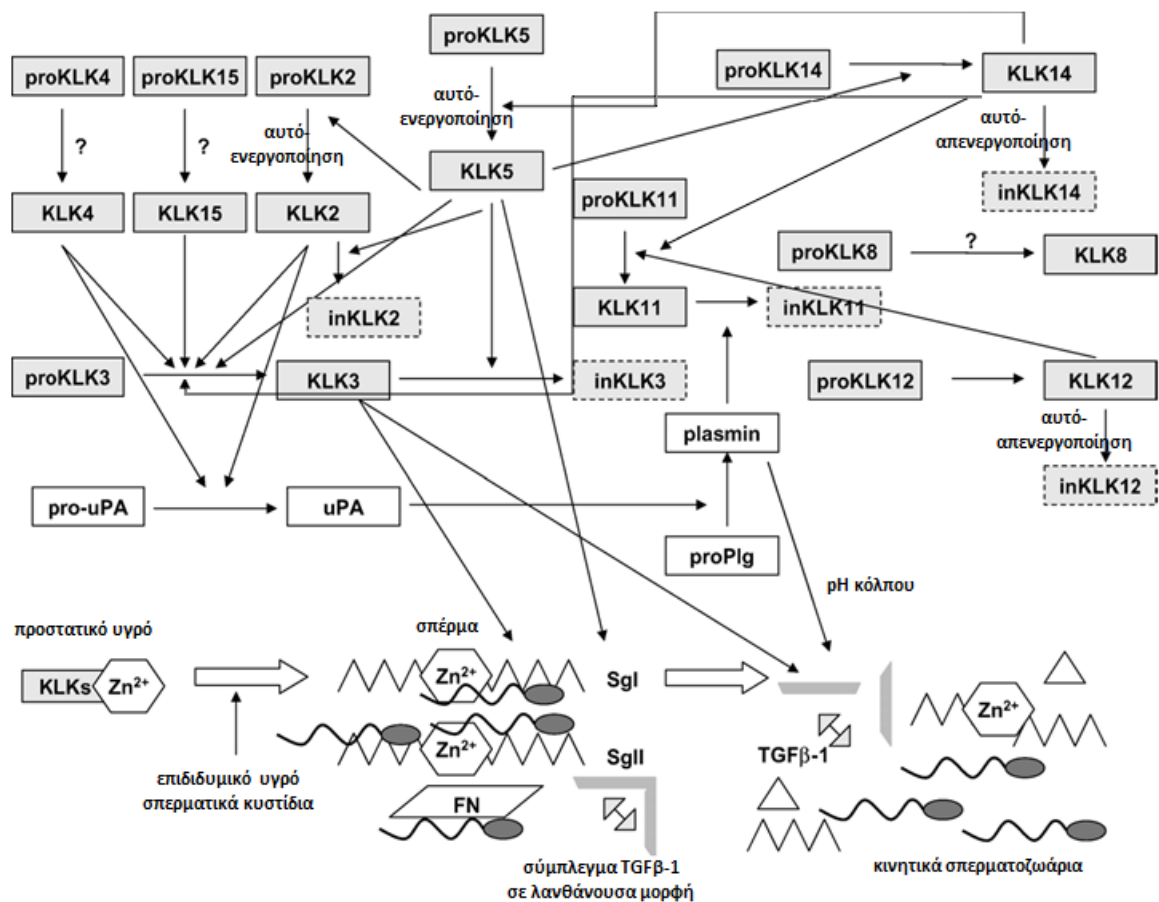
Η διαδικασία της ρευστοποίησης πραγματοποιείται κυρίως με τη δράση της KLK3/PSA, η οποία ενεργοποιείται μέσω πρωτεολυτικού καταρράκτη αντιδράσεων που πυροδοτείται μετά την εκσπερμάτιση (Εικόνα 2.8). Κατά την εκσπερμάτιση το επιδιδυμικό υγρό (πλούσιο σε σπερματοζωάρια) αναμιγνύεται με το προστατικό υγρό, που περιέχει τις KLK2, KLK3/PSA, KLK4, KLK5, KLK8, KLK11, KLK12, KLK14 και KLK15 και με τις εκκρίσεις των σπερματικών κυστιδίων που περιέχουν τις SgI και SgII. Οι SgI και SgII μαζί με τη φιμπρονεκτίνη σχηματίζουν το σπερματικό συσσωμάτωμα που «παγιδεύει» τα σπερματοζωάρια. Όλες οι καλλικρεΐνες είναι παρούσες στο σπέρμα, ωστόσο οι KLK2, KLK3/PSA και KLK11 είναι κατά πολύ πιο άφθονες. Σε φυσιολογικές συνθήκες στον προστάτη οι καλλικρεΐνες είναι ανενεργές, λόγω της αλλοστερικής αντιστρεπτής δέσμευσης ιόντων Zn^{2+} , όπως έχει ήδη αναφερθεί. Μετά την εκσπερμάτιση οι KLKs ενεργοποιούνται εξαιτίας μιας ανακατανομής των ιόντων Zn^{2+} στις σεμινογελίνες, οι οποίες δεσμεύουν αυτά τα ιόντα. Η χηλική ένωση των ιόντων Zn^{2+} με τις σεμινογελίνες, που μειώνει τη διαθεσιμότητα ελεύθερων ιόντων, πυροδοτεί πρωτεολυτικό καταρράκτη που οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλών καλλικρεϊνών (ανάμεσά τους της KLK3/PSA) και στη διάσπαση του σπερματικού συσσωματώματος με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κινητικών σπερματοζωαρίων. Αντίστροφα, τα ιόντα Zn^{2+} απελευθερώνονται σταδιακά μετά τη διάσπαση των σεμινογελινών από την KLK3/PSA (Malm et al., 2000; Emami et al., 2008; Sotiriopoulou et al., 2009; Emami et al., 2009).

Η KLK2 μπορεί να ενεργοποιήσει την pro-KLK3, όπως επίσης και οι KLK4, KLK5, KLK14 και KLK15. Η KLK14 που εκφράζεται στον προστάτη και εκκρίνεται στο σπέρμα, ενεργοποιείται από την KLK5 και η ενεργή KLK14 μπορεί να ενεργοποιήσει την pro-KLK5. Επιπλέον, η KLK14 θεωρείται ως μόριο-κλειδί στον πρωτεολυτικό καταρράκτη της ρευστοποίησης του σπέρματος, καθώς έχει δειχθεί ότι, εκτός των pro-KLK3 και pro-KLK5, μπορεί να ενεργοποιήσει *in vitro* και άλλες σημαντικές KLKs του σπερματικού πλάσματος, όπως οι pro-KLK1 και pro-KLK11, οπότε πιθανώς παίζει πολλαπλούς ρόλους στη ρύθμιση του μονοπατιού αυτού. Ως σήμερα έχει δειχθεί ότι οι KLK2, KLK3/PSA, KLK5 και KLK14 μπορούν να αποδομήσουν τις SgI και SgII, οι KLK3/PSA και KLK5 μπορούν να διασπάσουν και τη φιμπρονεκτίνη, ενώ η KLK14 μπορεί να διασπά το φιμπρινογόνο, προάγοντας τη ρευστοποίηση του σπέρματος. Από την άλλη πλευρά, η ρευστοποίηση του σπέρματος ρυθμίζεται από την αυτολυτική διάσπαση σε εσωτερική θέση των

πρωτεασών που συμμετέχουν σε αυτήν, με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργότητάς τους. Η KLK5 έχει δεχθεί ότι είναι υπεύθυνη για το κόψιμο σε εσωτερική θέση και την απενεργοποίηση της KLK3/PSA *in vitro*. Η KLK5, επίσης, απενεργοποιεί την KLK2, ενώ η KLK14 απενεργοποιείται με αυτόλυση (Pampalakis and Sotiropoulou, 2007; Emami et al., 2008; Emami et al., 2009; Lawrence et al., 2010). Η KLK11, μια καλλικρεΐνη που εκφράζεται στον προστάτη και στο σπέρμα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, ενεργοποιείται από την ώριμη KLK12, η οποία αυτο-ενεργοποιείται και αυτο-απενεργοποιείται, αλλά και από την KLK14. Πιθανός φυσιολογικός αναστολέας που απενεργοποιεί την KLK11 είναι η πλασμίνη που, επίσης, περιέχεται στο σπέρμα (Luo et al., 2006).

Έχει προταθεί μια πιθανή αλληλεπίδραση των μονοπατιών της πλασμίνης και των καλλικρεΐνών στο σπέρμα (Beaufort et al., 2006; Frenette et al., 1997). Οι KLK4 και KLK2 μπορούν να ενεργοποιήσουν τον προ-ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (pro-uPA) και να απελευθερώσουν ενεργή πλασμίνη, η οποία με τη σειρά της μπορεί να δράσει στη ρευστοποίηση του σπερματικού συσσωματώματος και να ελέγξει την ενεργότητα διαφόρων καλλικρεΐνών μέσω πρωτεολυτικής αποδόμησης. Αναστολείς της πλασμίνης έχει δειχθεί ότι παρεμποδίζουν τη ρευστοποίηση του σπέρματος (Matsuda et al., 1994).

Ένα άλλο φυσιολογικό πρωτεολυτικό μονοπάτι που σχετίζεται με τις ιστικές καλλικρεΐνες οδηγεί στην ενεργοποίηση του αυξητικού παράγοντα TGFβ-1 (Transforming growth factor beta 1), ο οποίος περιέχεται στο σπέρμα. Ο παράγοντας TGFβ-1 βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση με μορφή συμπλέγματος στο σπέρμα σε πολύ υψηλή συγκέντρωση (Robertson et al., 2002). Η ενεργοποίησή του *in vitro* πραγματοποιείται σε όξινο pH, οπότε το όξινο περιβάλλον του κόλπου πιθανότατα συμβάλλει στην ενεργοποίηση του TGFβ-1, ο οποίος με τη σειρά του ενεργεί μέσω της KLK3/PSA ή της πλασμίνης. Ο φυσιολογικός ρόλος του TGFβ-1 είναι να αλληλεπιδρά με τα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου και της μήτρας, ώστε να ενεργοποιήσει τη σύνθεση κυτοκινών με εμβρυοτροφικές ιδιότητες και να επάγει κυτταρικές και μοριακές αλλαγές όμοιες με εκείνες των κλασικών φλεγμονωδών αντιδράσεων (Pampalakis and Sotiropoulou, 2007). Στην Εικόνα 2.8 παρουσιάζεται σχηματικά ο πρωτεολυτικός καταρράκτης αντιδράσεων που οδηγεί στη ρευστοποίηση του ανθρώπινου σπέρματος.



Εικόνα 2.8. Πρωτεολυτικός καταρράκτης αντιδράσεων κατά τη ρευστοποίηση του σπέρματος. inKLK: ανενεργή KLK, FN: φιβρονεκτίνη, proP1g: προ-πλασμινογόνο, uPA: ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (Pampalakis and Sotiropoulou, 2007).

2.4.4. ΑΛΛΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΙΚΡΕΪΝΩΝ

Όλο και περισσότερα δεδομένα δηλώνουν τον πιθανό ρόλο των καλλικρεϊνών στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η KLK6 εκφράζεται έντονα στον εγκέφαλο ενηλίκων, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αλλά και στα περιφερικά νεύρα, στο επιθήλιο του χοριοειδούς πλέγματος και σε ενδοκρινή κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος και παίζει ρόλο στην ομοίωση της μυελίνης (Yousef et al., 2003a; Scarisbrick et al., 2008; Shaw and Diamandis, 2007). Η KLK6 μπορεί να διασπάσει πρωτεολυτικά τη μυελίνη *in vitro* και γι' αυτό έχει προταθεί ότι παίζει ρόλο στην απομυελίνωση και ίσως στον επανασχηματισμό της μυελίνης σε φυσιολογικές διαδικασίες ανάπτυξης και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η πολλαπλή σκλήρυνση (Bennett et al., 2002).

Η KLK6 δρα επάγοντας τη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων PARs. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί αύξηση της εισροής ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) μέσω του υποδοχέα PAR1 στους νευρώνες και μέσω των PAR1 και PAR2 στα αστροκύτταρα. Οι KLK6 και KLK1 ενεργοποιούν ή αναστέλλουν συστατικά των μονοπατιών μεταγωγής σήματος MAPK και AKT που σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση, μέσω υποδοχέων PARs αλλά και χωρίς τη μεσολάβησή τους, στους νευρώνες και στα αστροκύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε περιπτώσεις τραυματισμού ή ασθένειας του κεντρικού νευρικού συστήματος πολλές πρωτεάσες υπερ-εκφράζονται ή εξαγγειώνονται μέσω του εκτεθειμένου αιματοεγκεφαλικού φραγμού, με αποτέλεσμα την έκτοπη ενεργοποίηση των υποδοχέων PARs. Αυξημένα επίπεδα της KLK6 έχουν παρατηρηθεί στην ενεργή πολλαπλή σκλήρυνση, σε τραυματισμούς της σπονδυλικής στήλης, στο εγκεφαλικό επεισόδιο και στο γλοιοβλάστωμα (Scarlsbrick et al., 2008; Vandell et al., 2008; Burda et al., 2013).

Η KLK8 εκφράζεται μέτρια στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ενηλίκων, ιδιαίτερα στον εγκέφαλο (Shaw and Diamandis, 2007). Σε πειραματόζωα έχει δειχθεί ότι η έλλειψη του *KLK8* οδηγεί σε σοβαρή έλλειψη μακρόχρονης ενδυνάμωσης (long term potentiation), η οποία απαιτείται για το σχηματισμό της μνήμης που σχετίζεται με τον υπόκαμπο (Tamura et al., 2006). Επίσης, η KLK8 έχει προταθεί ως πιθανός ρυθμιστής της πλαστικότητας των νευρώνων και των συνάψεων (Shiosaka and Ishikawa, 2011). Ωστόσο, σε *in vitro* μελέτη του διηθητικού δυναμικού καρκινικών κυττάρων εγκεφάλου, η υπερ-έκφρασή της δεν φάνηκε να συμβάλλει σημαντικά στον καρκινικό φαινότυπο (Prezas et al., 2006β).

Τέλος, η KLK7 έχει χαμηλή έκφραση στον εγκέφαλο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενηλίκων και έχει δειχθεί ότι η υπερ-έκφρασή της σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εγκεφάλου ενισχύει σημαντικά το διηθητικό δυναμικό των κυττάρων (Shaw and Diamandis, 2007; Prezas et al., 2006β).

Αρκετά δεδομένα υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο των καλλικρεϊνών στην πρωτεολυτική ενεργοποίηση προ-ορμονών και την αποδόμηση ορμονών. Για παράδειγμα, μεγάλος αριθμός KLKs (KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13 και KLK14) εκφράζονται στην υπόφυση, μερικές από τις οποίες εντοπίζονται μαζί με την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (hGH). Οι KLK5, KLK6, KLK7, KLK8 έχει δειχθεί ότι μπορούν

να διασπάσουν την hGH *in vitro* (Komatsu et al., 2007). Ομοίως, αρκετές ανοσοϊστοχημικές μελέτες δείχνουν ότι οι KLK1, KLK6, KLK10 και KLK13 εκφράζονται έντονα στα νησίδια του Langerhans του ενδοκρινούς παγκρέατος, όπου ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των πρόδρομων μορφών της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης, της σωματοστατίνης και του παγκρεατικού πεπτιδίου (Emami and Diamandis, 2007α).

Η KLK4 απομονώθηκε αρχικά και κλωνοποιήθηκε από εκχύλισμα αδαμαντινοβλαστών χοίρου και χαρακτηρίστηκε ως πρωτεάση σερίνης στρώματος αδαμαντινοβλαστών 1 (EMSP1) (Simmer et al, 1998). Χρησιμοποιώντας καθαρή πρωτεΐνη από χοίρο, έγινε φανερό ότι η KLK4 κόβει ενζυμικά το μοριακού βάρους 32 kDa θραύσμα (enamelin) της αδαμαντίνης, το οποίο φυσιολογικά συσσωρεύεται στα βαθύτερα στρώματα αδαμαντίνης. Η KLK4 εκκρίνεται κατά την ωρίμανση της αδαμαντίνης και σχετίζεται με τη φυσιολογική ανάπτυξη των δοντιών (Bartlett and Simmer, 2014).

2.5. ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι η έκφραση των καλλικρεϊνών σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης απορρυθμίζεται στον καρκίνο. Επίσης, μελέτες που αφορούν στη λειτουργία των KLKs, δείχνουν αλλαγές στο πρότυπο ρύθμισης των γονιδίων KLK σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης και της εξέλιξης του καρκίνου, της αποδιαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων, της αγγειογένεσης και της μετάστασης. Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες συνδέουν την υπερ-έκφραση των καλλικρεϊνών με δυσμενή πρόγνωση, ορισμένες από αυτές δείχνουν ότι οι καλλικρεΐνες συνδέονται και με ευνοϊκή πρόγνωση σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου. Αυτή η παρατήρηση, που έχει επιβεβαιωθεί και για άλλες πρωτεάσες, υποδεικνύει το διττό ρόλο των KLKs στην καρκινογένεση ως επαγωγικών ή κατασταλτικών παραγόντων, οι οποίοι ασκούν ρύθμιση στα καρκινικά κύτταρα και στο μικρο-περιβάλλον τους με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο υπό την επιρροή διαφορετικής ορμονικής ισορροπίας. Οι λειτουργίες των KLKs ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων τύπου καρκίνου και τα στάδια της νόσου και πιθανόν σχετίζονται με τα επίπεδα συγκέντρωσης και ενεργότητάς τους (Borgoño and Diamandis, 2004; Emami and Diamandis, 2007α; Sotiropoulou et al., 2009).

Ως προς την ανάπτυξη του όγκου, τα στοιχεία δείχνουν ότι οι KLKs μπορεί να ενέχονται σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης ασκώντας ρύθμιση στον

πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Αυτό συμβαίνει πιθανώς μέσω των αυξητικών παραγόντων τύπου ινσουλίνης IGFs (Insulin-like growth factors, IGFs), οι οποίοι αποτελούν μόρια-κλειδιά για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Έχει δειχθεί ότι οι KLK2, KLK3/PSA, KLK5 και KLK14, οι οποίες ενεργοποιούνται μετά από μείωση της συγκέντρωσης ελεύθερων ιόντων Zn^{2+} στον προστάτη, επάγουν την εξέλιξη του καρκίνου μέσω της πρωτεολυτικής διάσπασης των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τους παράγοντες τύπου ινσουλίνης IGFs (IGF-binding proteins, IGFBPs). Οι IGFBPs ανταγωνίζονται τη δέσμευση των IGFs στους υποδοχείς τους, επιδρώντας ανασταλτικά στη μιτογόνο σηματοδότηση που αυτοί επάγουν. Η διάσπαση των IGFBPs οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση ενεργών παραγόντων IGFs, οι οποίοι δεσμεύονται και ενεργοποιούν τον υποδοχέα IGFR-1 (IGF-receptor-1, IGFR-1). Μέσω του ενεργοποιημένου IGFR-1 επάγονται ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής μιτογόνων σημάτων που ρυθμίζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αναστέλλουν την απόπτωσή τους. Η αλληλεπίδραση των KLKs με τις IGFBPs *in vivo* συμβαίνει στο μικρο-περιβάλλον του καρκινικού όγκου στον προστάτη και ρυθμίζει έμμεσα την ανάπτυξη του όγκου και των κυττάρων του στρώματος (Borgoño and Diamandis, 2004; Pampalakis and Sotiropoulou, 2007).

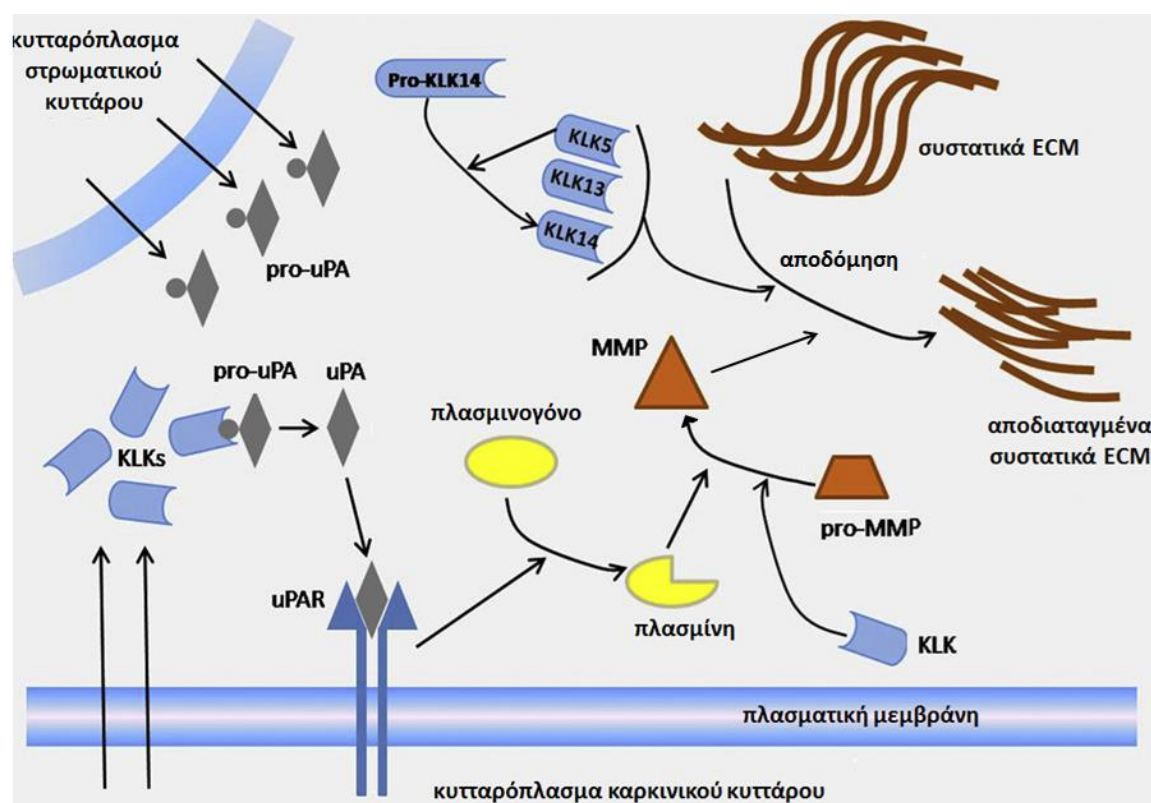
Εκτός της πρωτεολυτικής διάσπασης των IGFBPs, η KLK3/PSA είναι ικανή, επίσης, να επάγει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, ανεξάρτητα από την ενεργότητά της ως πρωτεάση σερίνης, πιθανόν μέσω δέσμευσής της σε κάποιον υποδοχέα της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων. Είναι γνωστό ότι οι ROS καταστρέφουν το DNA, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή της απόπτωσης ή σε ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως επίσης και σε οξειδωτική καταστροφή διαφόρων πρωτεϊνών και ιστών. Έτσι, η KLK3/PSA μπορεί έμμεσα να συμβάλλει και με αυτόν τον τρόπο στην καρκινογένεση (Borgoño and Diamandis, 2004).

Από την άλλη πλευρά, οι KLK3/PSA και KLK10 φαίνεται να έχουν κατασταλτική δράση στην ανάπτυξη όγκων. Σχετικές κλινικές μελέτες δείχνουν ότι αυτές οι KLKs υπο-εκφράζονται σε διάφορες κακοήθειες προχωρημένου σταδίου. Παρόλα αυτά, η γονιδιακή έκφρασή τους ποικίλει σε διάφορες μορφές καρκίνου. Για παράδειγμα, η KLK10 ενώ έχει αναφερθεί ότι υπο-εκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και του

προστάτη, αντίθετα στον καρκίνο των ωοθηκών, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου υπερ-εκφράζεται. Ομοίως, η KLK3/PSA έχει βρεθεί ότι υπο-εκφράζεται σε προχωρημένο καρκίνο μαστού και προστάτη. Η KLK3/PSA έχει δειχθεί ότι επάγει την απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα TGFβ διασπώντας τις πρωτεΐνες που τον δεσμεύουν (TGFβ-binding proteins). Ο TGFβ, στη συνέχεια, επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης. Η KLK3/PSA, επίσης, επάγει την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το *IFN-5* και καταστέλλει τους υποκινητές ογκογονιδίων, όπως τα *uPA*, *VEGF* και *Pim-1* στην καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη PC-3M. Η KLK3/PSA δείχθηκε να μειώνει τον καρκινικό όγκο σε ποντικούς, στους οποίους μεταμοσχεύτηκαν κύτταρα PC-3M. Παρομοίως, η ανεξάρτητη από υπόστρωμα ανάπτυξη όγκων σε ποντικούς φαίνεται να καταστέλλεται σε μοσχεύματα από καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 που εκφράζουν σταθερά την KLK10. Παρά την ύπαρξη δεδομένων που υποστηρίζουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο αυτών των KLKs, η παθολογική λειτουργία τους *in vivo* παραμένει αμφιλεγόμενη (Bindukumar et al, 2005; Yousef et al., 2005β; Emami and Diamandis, 2007α; Sotiropoulou et al., 2009).

Η αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) είναι ένα κρίσιμο βήμα για την αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Οι καλλικρεΐνες μπορούν να συμβάλλουν σε αυτή τη διαδικασία άμεσα, υδρολύοντας πρωτεΐνες του εξωκυττάριας χώρου που αποτελούν υποστρώματά τους (π.χ. φιβρονεκτίνη, φιβρινογόνο, λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου I, II, III, IV) ή έμμεσα με τη συμμετοχή τους σε πρωτεολυτικά μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν και άλλες πρωτεάσες με παρόμοια ή διαφορετική καταλυτική ενεργότητα από αυτές. Οι KLK2 και KLK4 μπορούν να ενεργοποιήσουν την πρόδρομη μορφή του ενεργοποιητή πλασμινογόνου uPA, ο οποίος είναι μια πρωτεάση σερίνης που μετατρέπει την πρωτεάση σερίνης πλασμινογόνο σε πλασμίνη. Επιπλέον, η KLK2 μπορεί να απενεργοποιήσει τον αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου uPA (PAI-1). Ο uPA προσδέεται *in vivo* στον υποδοχέα του uPAR (Urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια και μετατρέπει το πλασμινογόνο σε ενεργή πλασμίνη. Η πλασμίνη, στη συνέχεια, αποδομεί πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ενεργοποιεί μέλη της οικογένειας των μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Τόσο η πλασμίνη όσο και οι μεταλλοπρωτεάσες έχουν ως

υποστρώματα πληθώρα πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως η φιβρονεκτίνη, η λαμινίνη, η φιβρίνη (ινώδες), τύποι κολλαγόνου I, II, III και IV και διάφορες πρωτεογλυκάνες. Οι KLKs μπορούν, επίσης, να ενεργοποιήσουν προ-μεταλλοπρωτεάσες (pro-MMPs), αφού η ενεργοποίησή τους απαιτεί τη δράση πρωτεασών σερίνης με ενεργότητα θρυψίνης για την αποκοπή του προπεπτιδίου τους. Για παράδειγμα η KLK1 ενεργοποιεί την pro-MMP1, pro-MMP2 και pro-MMP9 (Egeblad and Werb, 2002; Borgoño et al., 2004; Karagiannis et al., 2010). Στην Εικόνα 2.9 που ακολουθεί, απεικονίζονται σχηματικά τα πρωτεολυτικά μονοπάτια, στα οποία ενέχονται οι KLKs κατά την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας.



Εικόνα 2.9. Σχηματική απεικόνιση του δικτύου της πρωτεόλυσης των KLKs κατά τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στο διάμεσο στρώμα. Ορισμένες KLKs που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανές να ενεργοποιούν τον pro-uPA (που παράγεται σε αφθονία από τα κύτταρα του στρώματος) και να παράγουν ενεργό uPA. Με τη σειρά του ο uPA προσδένεται στον υποδοχέα του uPAR στην πλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και μετατρέπει το πλασμινογόνο σε ενεργή πλασμίνη. Η πλασμίνη ενεργοποιεί διάφορες pro-MMPs και παράγονται ενεργές MMPs, οι οποίες είναι βασικοί παράγοντες της αποδόμησης της ECM. Κάποιες KLKs (π.χ KLK1) μπορεί να είναι ικανές για άμεση ενεργοποίηση pro-MMPs ή και για άμεση αποδόμηση πρωτεϊνών του ECM. Τα βέλη μεταξύ δυο μορίων δείχνουν ενεργοποίηση, τα βέλη που ξεκινούν από ένα μόριο και καταλήγουν σε άλλο βέλος δείχνουν ενζυμική αλληλεπίδραση και τα βέλη που ξεκινούν από το εσωτερικό του κυττάρου και καταλήγουν σε μόρια δείχνουν έκκριση (Karagiannis et al., 2010).

Κατά την αγγειογένεση, που είναι η κύρια διαδικασία για την τροφοδότηση του όγκου και τη μετάσταση, η βασική μεμβράνη των υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων διαρρηγνύεται και η περιβάλλουσα εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποδομείται επιτρέποντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν στο στρώμα ενός γειτονικού ιστού. Τα κύτταρα-εισβολείς μπορούν τότε να πολλαπλασιαστούν και να συνενωθούν δημιουργώντας νέους τριχοειδείς αγγειώδεις σωλήνες. Οι KLKs φαίνεται να ενέχονται άμεσα στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της αποδόμησης συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με τους τρόπους που περιγράφηκαν παραπάνω. Οι KLK1 και KLK12 εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και πιθανόν λειτουργούν μέσω του συστήματος των κινινών. Η ενεργή κίνηση προάγει την αγγειογένεση μέσω της υπερ-έκφρασης του bFGF (basic Fibroblast growth factor) ή την ενεργοποίηση του VEGF (Vascular endothelial growth factor). Τα συστήματα IGF-IGFBP και uPA-uPAR λειτουργούν σε πολλά όργανα, συνεπώς η εμπλοκή τους στον καρκίνο αφορά πολλούς τύπους της νόσου. Από την άλλη πλευρά, έχει δειχθεί ότι ορισμένες KLKs μπορούν να αναστείλουν την αγγειογένεση. Για παράδειγμα, οι KLK3/PSA, KLK5, KLK6 και KLK13 μπορούν να παράγουν θραύσματα παρόμοια με τις αγγειοστατίνες από το πλασμινογόνο (Emami and Diamandis, 2007α; Sotiropoulou et al., 2003).

Η διήθηση και η μετάσταση προϋποθέτουν, εκτός από την αποδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, την απόκτηση κινητικότητας από τα καρκινικά κύτταρα της πρωτοπαθούς εστίας, προκειμένου να εισβάλλουν στον περιβάλλοντα ιστό του όγκου και στο αγγειακό σύστημα και να μεταναστεύσουν σε άλλη θέση. Η απόκτηση ικανότητας για μετάσταση επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της μετάβασης των επιθηλιακών κυττάρων σε κύτταρα με μεσεγχυματικό φαινότυπο (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), η οποία έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Οι KLK3/PSA και KLK4 μπορεί να ενέχονται σε φαινοτυπικές αλλαγές ενδεικτικές της EMT. Έχει δειχθεί ότι η σταθερή υπερ-έκφραση αυτών των KLKs σε καρκινικά κύτταρα προστάτη ενισχύει το διηθητικό δυναμικό των κυττάρων και σχετίζεται με την απώλεια επιθηλιακού φαινότυπου και την απόκτηση χαρακτηριστικών μεσεγχυματικού φαινότυπου, όπως η απώλεια της E-καδερίνης και η έκφραση της βιμεντίνης (Veveris-Lowe et al., 2005). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η υπερ-έκφραση της KLK6 σε διαγονιδιακά ποντίκια εμπλέκεται στην απόρριψη της E-καδερίνης στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα,

ενώ η KLK7 επάγει, ομοίως, άμεση απόρριψη της E-καδερίνης *in vitro* (Sotiropoulou et al., 2009).

Υπάρχουν δεδομένα, επίσης, που υποδηλώνουν τη συμμετοχή διαφόρων KLKs στη μετάσταση στα οστά. Για παράδειγμα, η KLK3/PSA μπορεί να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οστεοβλαστών και την απόπτωση οστεοκλαστών *in vitro* και *in vivo* κατά την μετάσταση οστεοβλαστικού τύπου, η οποία είναι χαρακτηριστική του καρκίνου του προστάτη. Αντίθετα, η καταστολή της KLK3/PSA ανέστειλε την προσκόλληση καρκινικών κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών (Emami and Diamandis, 2007α).

2.6. Η ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ 3 (KLK3/PSA) ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Το ενδιαφέρον γύρω από τις καλλικρεΐνες ως βιοδείκτες καρκίνου ανάγεται στα 1980, όταν οι Papsidero και συν. προσδιόρισαν το PSA (KLK3) με ενζυμική ανοσοδοκιμασία στον ορό του αίματος ανδρών με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη (Papsidero et al., 1980). Αυτή ήταν η απαρχή της διάγνωσης του καρκίνου του προστάτη μέσω εξέτασης στο αίμα με τη μέτρηση του PSA, η οποία βρίσκεται σε κλινική χρήση ως και σήμερα.

Το PSA θεωρείται ως ο καλύτερος βιοδείκτης καρκίνου που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα για οποιαδήποτε μορφή καρκίνου, παρόλο που έχει σημαντικά μειονεκτήματα. Αρχικά, με την εισαγωγή του στην κλινική πράξη, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης παρακολούθησης της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών με καρκίνο του προστάτη, αλλά στην πορεία χρησιμοποιήθηκε και ως διαγνωστικός δείκτης. Ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του προστάτη και στο σπέρμα. Η πρωτεΐνη PSA στον ορό του αίματος μπορεί να βρίσκεται συμπλοκοποιημένη με την α_1 -αντιχυμοθρυψίνη ή με την α_2 -μακροσφαιρίνη ή ελεύθερη. Αυξημένες τιμές ολικού PSA στον ορό (> 10 $\mu\text{g/L}$) υποδεικνύουν υψηλή πιθανότητα παρουσίας καρκίνου στον προστάτη. Ωστόσο, το PSA δεν είναι ειδικό για τον καρκίνο και συσχετίζεται και με άλλες παθήσεις του προστάτη, όπως η προστατίτιδα και η καλοήθης υπερπλασία, όταν εμφανίσει συγκεντρώσεις στον ορό 4-10 $\mu\text{g/L}$ (grey zone). Αποτέλεσμα αυτού είναι να δημιουργείται πρόβλημα στη διαφορική διάγνωση στη συγκεκριμένη περιοχή τιμών. Συγκεκριμένα, 25% περίπου των ασθενών με συγκεντρώσεις PSA στον ορό 4-10 $\mu\text{g/L}$,

πάσχουν στην πραγματικότητα από καρκίνο, ενώ 15% περίπου των ασθενών με συγκεντρώσεις PSA στον ορό εντός των τιμών αναφοράς (< 4 μg/L) επίσης πάσχουν από καρκίνο. Συμπερασματικά, πλέον είναι σαφές ότι οι τιμές του PSA αντανακλούν τη σχετική πιθανότητα κινδύνου για καρκίνο του προστάτη, αλλά καμία τιμή της συγκέντρωσής του δεν μπορεί να αποκλείσει την παρουσία καρκίνου, αφού ο δείκτης δεν παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (Rao et al., 2007; Sardana et al., 2008).

Οι καλλικρεΐνες, ως εξωκυτταρικές πρωτεάσες, θεωρείται ότι εμπλέκονται στην έναρξη ή/και στην εξέλιξη της καρκινογένεσης, μέσω της συμμετοχής τους στην αναδιοργάνωση του μικρο-περιβάλλοντος του όγκου, στην ανάπτυξή του, στην αγγειογένεση, στη διήθηση και στη μετάσταση. Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει την απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων KLKs στον καρκίνο. Τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων και των πρωτεϊνών των KLKs μεταβάλλονται ιδιαίτερα σε αδενοκαρκινώματα ιστών που ρυθμίζονται από στεροειδείς ορμόνες του φύλου, αλλά και σε μη ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους. Τα τελευταία 15 χρόνια περίπου πολλές κλινικές μελέτες έχουν συσχετίσει την έκφραση των καλλικρεϊνών με την πρόγνωση του καρκίνου είτε δυσμενώς είτε ευνοϊκά. Συνεπώς, θεωρείται πια δεδομένο ότι οι πρωτεάσες αυτές ενέχονται στην καρκινική εξέλιξη με τρόπο επαγωγικό ή ανασταλτικό, αναλόγως του τύπου του ιστού και γι' αυτό έχουν προταθεί ως νέοι υποσχόμενοι βιοδείκτες καρκίνου. Επιπλέον, με την ολοένα αυξανόμενη αποκάλυψη των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν, τόσο στη φυσιολογία του οργανισμού όσο και στον καρκίνο, έχει προταθεί ότι πολλές KLKs θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους (Emami and Diamandis, 2008α; Borgoño and Diamandis, 2004; Borgoño et al., 2004).

2.7. ΟΙ ΙΣΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΕΣ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ

2.7.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Οι Shaw and Diamandis (2007) μελέτησαν την έκφραση mRNA και πρωτεΐνης των 15 ιστικών καλλικρεϊνών συνολικά σε διάφορους ιστούς και βιολογικά υγρά. Οι *KLK1*, *KLK4* και *KLK15* εμφανίζουν μέτρια ή υψηλή έκφραση mRNA στο φυσιολογικό ιστό παχέος

εντέρου, ενώ από τις υπόλοιπες 12, οι *KLK2*, *KLK9* και *KLK10* δεν εκφράζονται και οι *KLK3*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK11*, *KLK12*, *KLK13* και *KLK14* εκφράζονται ασθενώς. Το ίδιο σχεδόν πρότυπο έκφρασης παρατηρείται στην πλειοψηφία των καλλικρεϊνών και σε επίπεδο πρωτεΐνης (προσδιορισμοί με ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA) και μόνο για τις *KLK4*, *KLK9*, *KLK12* και *KLK15* δεν παρατηρήθηκε αντιστοιχία με τα επίπεδα του mRNA. Στο φυσιολογικό παχύ έντερο οι *KLK4* και *KLK15* δεν εκφράζονται, ενώ έχουν αρκετή έκφραση mRNA. Το αντίθετο συμβαίνει για τις *KLK9* και *KLK12* (Shaw and Diamandis, 2007).

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει μελετηθεί σε επίπεδο mRNA η έκφραση έξι γονιδίων της οικογένειας των καλλικρεϊνών (*KLK1*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK10* και *KLK11*). Τα επίπεδα mRNA των *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK10* και *KLK11* βρέθηκαν αυξημένα σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό, ενώ το *KLK1* mRNA βρέθηκε μειωμένο. Επίσης, προσδιορίστηκε η έκφραση 10 καλλικρεϊνών (*KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK11*, *KLK13*, *KLK14* και *KLK15*) σε επίπεδο πρωτεΐνης στον καρκίνο του παχέος εντέρου με ELISA, ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοϊστοχημεία. Οι *KLK5* και *KLK14* δεν εμφάνισαν διαφορικό πρότυπο έκφρασης στον καρκίνο. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες *KLK4*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK8*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* και *KLK15* εκφράζονται εντονότερα στον καρκίνο. Η κλινική σημασία της έκφρασης mRNA ή/και πρωτεΐνης των καλλικρεϊνών στο παχύ έντερο έχει αξιολογηθεί για τις *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK7*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13* και *KLK14* (Talieri et al., 2012; Kontos et al., 2013). Οι μελέτες που αφορούν στην έκφραση και κλινική σημασία των καλλικρεϊνών σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνοψίζονται στον Πίνακα 2.2 και τα ευρήματά τους περιγράφονται ακολούθως.

Πίνακας 2.2. Κλινική αξία της έκφρασης mRNA/πρωτεΐνης των *KLKs* στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

KLK	Προγνωστική αξία mRNA ή/και πρωτεΐνης	Βιβλιογραφία
KLK5	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Talieri, 2009β.
KLK6	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Ogawa, 2005; Talieri, 2009β; Kim, 2011; Petraki, 2012; Agesen, 2012, Vakrakou, 2014
KLK7	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Talieri, 2009α; Talieri, 2009β; Inoue, 2010.
KLK10	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Feng, 2006; Talieri et al., 2009β; Talieri, 2011; Alexopoulou et al., 2013.
KLK11	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Alexopoulou et al., 2014.
KLK13	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Talieri et al., 2009β.
KLK14	Υπερ-έκφραση → δυσμενής πρόγνωση	Talieri et al., 2009β.

KLK1. Οι Yousef και συν. (2004) ανέφεραν ότι το *KLK1* έχει μειωμένη έκφραση mRNA στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό σε *in silico* μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *KLKs* (Yousef et al., 2004β). Δεν υπάρχουν μελέτες που εξετάσει την έκφραση mRNA ή πρωτεΐνης του *KLK1* στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

KLK4. Οι Gratio και συν. (2010) κατέδειξαν την παρουσία της πρωτεΐνης *KLK4* στον καρκινικό ιστό και την απουσία της σε φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο με ανοσοϊστοχημεία (Gratio et al., 2010). Οι Kontos και συν. (2013) έδειξαν ότι η mRNA έκφραση του *KLK4* συσχετίζεται σημαντικά με το στάδιο Duke's της νόσου, το βαθμό διήθησης, το βαθμό αποδιαφοροποίησης και το μέγεθος του όγκου. Επίσης, συσχετίζεται σημαντικά με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και αποτελεί δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ανεξάρτητα από την κατάσταση των λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου. Τέλος, η mRNA έκφραση του *KLK4* μπορεί να προβλέψει βραχυπρόθεσμα την πιθανότητα υποτροπής ασθενών που δεν έχουν διηθημένους λεμφαδένες ή ασθενών σε αρχικό στάδιο Duke's της νόσου (Kontos et al., 2013).

KLK5. Έως σήμερα, μία δημοσιευμένη μελέτη έχει εξετάσει την έκφραση και την κλινική σημασία της *KLK5* στον καρκίνο του παχέος εντέρου μόνο σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η *KLK5* μελετήθηκε σε κυττοσόλια από καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς με ELISA και δείχθηκε ότι η παρουσία της είναι περίπου στα ίδια επίπεδα τόσο στο φυσιολογικό όσο και στον καρκινικό ιστό. Ωστόσο, η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης σε καρκινικούς ιστούς αποτελεί δείκτη μικρότερου χρόνου ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης των ασθενών (Taliari et al., 2009β). Η mRNA έκφραση του *KLK5* δεν έχει προσδιοριστεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

KLK6. Οι Yousef και συν. (2004) ανέφεραν ότι το γονίδιο *KLK6* έχει αυξημένη έκφραση mRNA στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό σε *in silico* μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *KLKs* (Yousef et al., 2004β). Στη συνέχεια, ακολούθησαν 6 ανεξάρτητες δημοσιευμένες μελέτες που εξέτασαν την κλινική χρησιμότητα της έκφρασης του *KLK6*. Οι Ogawa και συν. (2005) εξέτασαν την έκφραση mRNA του *KLK6* με ποσοτική real time PCR και ανέφεραν σημαντική υπερ-έκφραση του γονιδίου στον καρκίνο σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό, κάτι που κατέδειξαν επίσης και στο επίπεδο της πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία. Η υψηλή έκφραση *KLK6* mRNA συσχετίζεται με τη μετάσταση στο

ήπαρ και με μικρότερο χρόνο ολικής επιβίωσης των ασθενών (Ogawa et al., 2005). Οι Talieri και συν. (2009), μελετώντας την έκφραση της πρωτεΐνης KLK6 σε κυττοσόλια από καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς με ELISA, έδειξαν μεγάλη αύξηση της έκφρασης στον καρκίνο και συσχέτιση με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης των ασθενών (Talieri et al., 2009β). Οι Kim και συν. (2011) αργότερα επιβεβαίωσαν την υπερ-έκφραση mRNA και πρωτεΐνης KLK6 με ανοσοϊστοχημεία στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με το φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο και πρόσθεσαν ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση και σε δυσπλαστικούς προ-καρκινικούς ιστούς. Επίσης, ανέφεραν συσχέτιση της έκφρασης πρωτεΐνης KLK6 με την ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση των ασθενών, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα των Talieri και συν. (Kim et al., 2011; Talieri et al., 2009β). Εφαρμόζοντας ανοσοϊστοχημεία, επίσης, οι Petraki και συν. (2012) έδειξαν τη συσχέτιση της θετικής έκφρασης της KLK6 με την ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση των ασθενών. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι στη μελέτη αυτή το 1/3 περίπου των ασθενών εμφάνισε έκφραση της KLK6 στους καρκινικούς ιστούς τους και οι περισσότεροι από αυτούς είχαν νόσο προχωρημένου σταδίου (Petraki et al., 2012). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες, λοιπόν, οι Petraki και συν. (2012) ανέφεραν μείωση της έκφρασης της KLK6 στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό. Αυτή η αντίθεση, συνεπώς, μπορεί να υποδηλώνει τις πιθανές διαφορετικές λειτουργίες του KLK6 στα διάφορα στάδια της έναρξης και της εξέλιξης του καρκίνου. Πρόσφατα οι Vakrakou και συν. (2014) έδειξαν περισσότερο αυξημένη έκφραση mRNA του *KLK6* (qPCR) σε αρχικό στάδιο καρκινογένεσης στο παχύ έντερο (αδενώματα) σε σύγκριση με τους καρκινικούς ιστούς, αν και γενικά το γονίδιο υπερ-εκφράζεται με συνεχή τρόπο αυξανόμενου του σταδίου του καρκίνου (Vakrakou et al., 2014). Οι Agesen και συν. (2012) ανέπτυξαν έναν ταξινομητή 13 γονιδίων (ColoGuideEx), καθένα από τα οποία παρέχει ανεξάρτητη ειδική προγνωστική πληροφορία για την πορεία της νόσου σταδίου II (Agesen et al., 2012). Η αυξημένη έκφραση mRNA σε 8 από τα 13 γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του *KLK6*, συσχετίζεται με μικρό χρόνο ελεύθερης νόσου επιβίωσης για τους ασθενείς σταδίου II, αλλά όχι για ασθενείς σταδίου III. Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι με το σύστημα ColoGuideEx είναι δυνατή η εξατομικευμένη προγνωστική κατηγοριοποίηση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, προκειμένου να αποφασιστεί η μετεγχειρητική αντιμετώπιση της νόσου. Ωστόσο, η

χρήση του ταξινομητή πρέπει να συνδυάζεται με άλλες ανεξάρτητες δοκιμασίες, όπως τα τεστ ColoPrint και Oncotype DX Colon.

KLK7. Τέσσερις δημοσιευμένες μελέτες αξιολόγησαν την κλινική χρησιμότητα της έκφρασης του *KLK7* ως δείκτη για την πρόβλεψη της πορείας της νόσου (Inoue et al., 2010; Talieri et al., 2009α; Talieri et al., 2009β; Devetzi et al., 2013). Όλες οι μελέτες συμφωνούν ως προς την υπερ-έκφραση του *KLK7* στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε επίπεδο mRNA (Inoue et al., 2010; Talieri et al., 2009β; Devetzi et al., 2013) και πρωτεΐνης (Talieri et al., 2009α και β) με τη χρήση ELISA και ανοσοϊστοχημείας. Η αυξημένη έκφραση του *KLK7* mRNA και πρωτεΐνης συσχετίζεται με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης των ασθενών, κυρίως με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης προχωρημένου σταδίου, καθώς και με τη μετάσταση στο ήπαρ (Talieri et al., 2009β; Inoue et al., 2010).

KLK8. Οι Yousef και συν. (2004) ανέφεραν ότι το γονίδιο *KLK8* έχει αυξημένη έκφραση mRNA στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό σε *in silico* μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *KLKs* (Yousef et al., 2004β). Οι Talieri και συν. (2009), εξετάζοντας την κλινική χρησιμότητα της πρωτεΐνης *KLK8* (ELISA) στην πρόβλεψη της επιβίωσης των ασθενών, ανέφεραν ότι παρά την αυξημένη έκφρασή της στον καρκίνο, δεν συσχετίζεται με την πορεία της νόσου (Talieri et al., 2009β). Η έκφραση του *KLK8* mRNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν έχει μελετηθεί.

KLK10. Οι Yousef και συν. (2004) σε *in silico* μελέτη, ανέφεραν ότι το γονίδιο *KLK10* έχει αυξημένη έκφραση mRNA στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό (Yousef et al., 2004β). Το δεδομένο αυτό επαληθεύτηκε, στη συνέχεια, από τους Feng και συν., οι οποίοι προσδιόρισαν την έκφραση mRNA (qPCR) και πρωτεΐνης του *KLK10* (Western blot, ανοσοϊστοχημεία) και ανέφεραν συσχέτισή της με προχωρημένο στάδιο της νόσου (Feng et al., 2006). Αργότερα, οι μελέτες των Talieri και συν. (2009, 2011) έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση mRNA (semi-qPCR) και πρωτεΐνης του *KLK10* (ELISA) στον καρκίνο συσχετίζονται με την ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση των ασθενών, αρχικών ή προχωρημένων σταδίων (Talieri et al., 2009β; Talieri et al., 2011). Πρόσφατα οι Alexoroulou και συν. (2013) επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών, προσδιορίζοντας με ποσοτική qPCR την έκφραση mRNA του *KLK10* στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Alexoroulou et al., 2013).

KLK11. Οι Talieri και συν. (2009) προσδιόρισαν την έκφραση της πρωτεΐνης KLK11 και την κλινική της σημασία στον καρκίνο του παχέος εντέρου με ELISA (Talieri et al., 2009β). Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της KLK11 σε κυττοσόλια καρκινικών ιστών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς, εντούτοις δεν σημειώθηκε σημαντική προγνωστική αξία της καλλικρεΐνης αυτής για την πορεία της νόσου. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μελέτη από τους Alexorouliou και συν. (2014) που εξετάζει την έκφραση mRNA (qPCR) του γονιδίου *KLK11* σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου. Η μελέτη ανέφερε σημαντική υπερ-έκφραση του γονιδίου στον καρκίνο και συσχέτιση της έκφρασής του με το βαθμό αποδιαφοροποίησης και το βαθμό διήθησης του όγκου. Επίσης, η υψηλή έκφραση του *KLK11* mRNA συσχετίζεται με μικρότερη ελεύθερη νόσου και ολική επιβίωση των ασθενών, ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου, το βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου και άλλες κλινικές παραμέτρους (Alexorouliou et al., 2014).

KLK13. Έως σήμερα η μόνη μελέτη που αφορά στην κλινική σημασία της KLK13 στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι αυτή των Talieri και συν. (2009), στην οποία προσδιορίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης KLK13 με ELISA (Talieri et al., 2009β). Παρατηρήθηκε αυξημένη παρουσία της KLK13 σε κυττοσόλια καρκινικών ιστών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς, η οποία συσχετίζεται με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης των ασθενών. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *KLK13* στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν έχουν προσδιοριστεί.

KLK14. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές της έκφρασης της KLK14 μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττοσολίων από ιστούς παχέος εντέρου (Talieri et al., 2009β). Ωστόσο, η παρουσία αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης KLK14 σε καρκινικούς ιστούς συσχετίζεται με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης των ασθενών. Οι Gratio και συν. (2011) έδειξαν με ανοσοϊστοχημεία τη διαφορική εντόπιση της KLK14 μεταξύ καρκινικών ιστών και φυσιολογικών εντερικών βλεννογόνων, συγκεκριμένα την απουσία της στο φυσιολογικό βλεννογόνο και την έντονη παρουσία της στον καρκίνο (Gratio et al., 2011). Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK14* και η κλινική σημασία της για την πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στην παρούσα Διατριβή (Devetzi et al., 2013).

KLK15. Οι Talieri και συν. (2009) εξέτασαν την κλινική αξία της πρωτεΐνης KLK15 (ELISA) στην πρόβλεψη της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο στο παχύ έντερο (Talieri et al., 2009β). Η KLK15 έχει αυξημένη έκφραση σε κυττοσόλια από καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με εκείνα από φυσιολογικούς ιστούς, όμως η αύξηση αυτή δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με την πορεία της νόσου. Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK15* δεν έχει μελετηθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

2.7.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Οι ρόλοι των καλλικρεϊνών, οι οποίες έχουν μελετηθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου, είναι πολύ λίγο γνωστοί. Από όλες τις καλλικρεΐνες περισσότερο έχει μελετηθεί ο ρόλος της KLK6. Ακολούθως, αναφέρονται όλες οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες μελέτες, που έχουν διερευνήσει τη συμβολή των καλλικρεϊνών στον καρκίνο του παχέος εντέρου, με τα ευρήματά τους.

Το γονίδιο *KLK6* υπερ-εκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης και σχετίζεται με τη διήθηση και τη μετάσταση (Ogawa et al., 2005; Kim et al., 2011; Petraki et al., 2012; Henkhaus et al., 2008α). Η πρωτεάση KLK6 μπορεί να αποδομεί τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας φιβρίνη, φιβρινογόνο, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη, κολλαγόνο τύπου I και κολλαγόνο τύπου IV, που αποτελεί σημαντικό συστατικό της βασικής μεμβράνης. Τα ευρήματα αυτά επισημαίνουν το γεγονός ότι η KLK6 παίζει ρόλο στην περικυτταρική πρωτεόλυση και αναδόμηση των ιστών, με αποτέλεσμα να διευκολύνει τη διήθηση (Magklara et al., 2003). Οι Ignatenko και συν. (2004) κατέδειξαν την υπερ-έκφραση του *KLK6* mRNA σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου που είχαν διαμολυνθεί με ένα αλληλόμορφο του *K-ras* (*K-RAS*^{G12V}) που φέρει μετάλλαξη ενεργοποίησης (Ignatenko et al., 2004). Κατόπιν, δείχθηκε ότι η εξαρτώμενη από το *K-ras* υπερ-έκφραση του *KLK6* επάγεται από τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος PI3K και p42/44 MAPK και η έντονη έκκριση της KLK6 ενισχύει τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (Henkhaus et al., 2008α). Οι Henkhaus και συν. (2008) έδειξαν ότι η έκκριση της KLK6 από καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου μεσολαβείται από τη δράση της μεμβρανικής πρωτεΐνης καβεολίνης-1 (CAV-1), η οποία είναι παρούσα σε όλους τους τύπους κυττάρων και εμπλέκεται στην

ανεξάρτητη από υποδοχείς ενδοκύτωση. Η έκφραση και η έκκριση της KLK6 επάγεται τόσο από την καβεολίνη-1 όσο και από το AKT (Henkhaus et al., 2008β). Πρόσφατα δείχθηκε ότι η έκφραση mRNA του *KLK6* αυξάνεται περισσότερο στα αδενώματα του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τον καρκίνο, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει ότι το γονίδιο συμβάλλει στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης (Vakrakou et al., 2014).

Το γονίδιο *KLK7*, επίσης, υπερ-εκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, όπως έχει ήδη αναφερθεί και η υπερ-έκφρασή του σχετίζεται με τη μετάσταση στο ήπαρ (Inoue et al., 2010; Talieri et al., 2009α; Talieri et al., 2009β; Devetzi et al., 2013). Σε πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι η υπερ-έκφραση της *KLK7* ενισχύει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου *in vitro* και συμβάλλει στην εξάπλωση του καρκινικού όγκου *in vivo* σε πειραματόζωα, στα οποία μεταμοσχεύτηκαν καρκινικά κύτταρα που υπερ-εκφράζουν την *KLK7* (Walker et al., 2014).

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι καλλικρεΐνες μπορούν να δράσουν ως ρυθμιστές της μεταγωγής σήματος μέσω υποδοχέων PARs. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα PAR1 (υποδοχέας της θρομβίνης) οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (Darmoul et al., 2003). Αργότερα, οι Gratio και συν. (2010) έδειξαν την ικανότητα της *KLK4* να επάγει επιλεκτικά τη μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα PAR1 σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, ανέφεραν ότι η *KLK4* προάγει την κινητοποίηση ιόντων Ca^{2+} μέσω του υποδοχέα PAR1, ο οποίος εκφράζεται έκτοπα στον καρκίνο και την επακόλουθη ενεργοποίηση των ERK1/2 MAP κινασών (Gratio et al., 2010). Η ενεργοποίηση του PAR1 από την *KLK4* πιθανόν επάγει τη σύζευξη του υποδοχέα με άλλους παράγοντες και οδηγεί σε διαφορετική σηματοδότηση από ότι η θρομβίνη. Συνεπώς, η *KLK4* θα μπορούσε να είναι ένας ενδογενής ενεργοποιητής του PAR1 στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Kontos et al., 2013). Επίσης, η *KLK4* μπορεί να ενεργοποιήσει τον προ-ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (pro-uPA), ο οποίος εκφράζεται έντονα στον καρκίνο του παχέος εντέρου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συστήματος του πλασμινογόνου. Το μονοπάτι αυτό οδηγεί στην πρωτεόλυση συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μέσω της

ενεργοποίησης μεταλλοπρωτεασών και σε απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων (Beaufort et al., 2010).

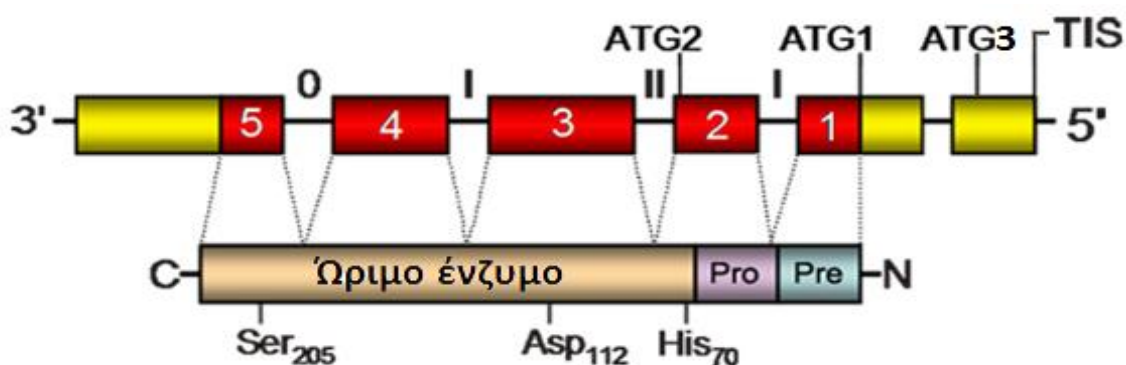
Η KLK14, ως πρωτεάση με ενεργότητα θρυψίνης, μπορεί να απενεργοποιήσει τον υποδοχέα PAR1 και να ενεργοποιήσει τους PAR2 (υποδοχέας θρυψίνης) και PAR4 *in vitro* (Oikonomopoulou et al., 2006; Stefansson et al., 2008). Οι Gratio και συν. (2011) έδειξαν ότι η KLK14 έχει την ικανότητα να επάγει την ενδοκύτωση του υποδοχέα PAR2, η οποία συνοδεύεται από αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} και αυξημένη φωσφορυλίωση των κινασών MEK1/2 και ERK1/2, με αποτέλεσμα την επαγωγή μιτογόνων σημάτων (Gratio et al., 2011). Αργότερα οι Chung και συν. (2012) επιβεβαίωσαν την αυξημένη παραγωγή της KLK14 από τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και την επαγωγή της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα PAR2. Ανέφεραν, επίσης, ότι η ενεργοποίηση του PAR2 προκαλεί ενδοκύτωσή του, αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} ενδοκυτταρικά, επαγωγή της φωσφορυλίωσης των κινασών ERK1,2/MAP και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι, πρότειναν ότι η KLK14 μέσω της ενεργοποίησης του PAR2, αποτελεί πιθανώς έναν αυτοκρινή και παρακρινή ρυθμιστή της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο (Chung et al., 2012).

2.8. Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ 7 (KLK7)

Η ανθρώπινη ιστική καλλικρεΐνη 7 (KLK7) εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην κεράτινη στιβάδα του ανθρώπινου πέλματος, κατά τη μελέτη του μηχανισμού απολέπισης του δέρματος *in vitro*. Τότε περιγράφηκε ως πρωτεάση τύπου χυμοθρυψίνης με κάποιο πιθανό ρόλο στη φυσιολογική απολέπιση και γι' αυτό της δόθηκε η ονομασία χυμοθρυπτικό ένζυμο της ανθρώπινης κεράτινης στιβάδας (Human stratum corneum chymotryptic enzyme, HSCCE) (Lundström and Egelrud, 1990).

Το cDNA του γονιδίου *KLK7* (*PRSS6/ HSCCE*) απομονώθηκε για πρώτη φορά, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε από cDNA βιβλιοθήκη κερατινοκυττάρων (Hansson et al., 1994). Το γονίδιο *KLK7* (GenBank AF166330.2) εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων *KLK6* και *KLK8* και εκτείνεται σε μια γονιδιωματική περιοχή μήκους περίπου 9,9 kbp του χρωμοσώματος 19q13.3-q13.4. Αποτελείται από 6 εξώνια και 5 παρεμβαλλόμενα εσώνια και μεταγράφεται με κατεύθυνση από το τελομερές προς το κεντρομερές του

χρωμοσώματος 19. Η κωδική περιοχή, μήκους 762 bp, περιλαμβάνει τμήματα 5 εξωνίων, ενώ το πρώτο εξώνιο καθώς και τμήμα του δεύτερου εξωνίου εντοπίζονται στη μη κωδική 5' UTR περιοχή του mRNA του γονιδίου. Τα μήκη των εξωνίων που απαρτίζουν την κωδική περιοχή είναι 73 bp, 148 bp, 248 bp, 137 bp και 156 bp αντίστοιχα. Υπάρχουν κωδικόνια έναρξης ATG στις θέσεις: 59 του δεύτερου εξωνίου, 144 του τρίτου εξωνίου και 146 του πρώτου εξωνίου, καθώς και μια θέση πολυαδενυλίωσης 168 βάσεις καθοδικά (downstream) του κωδικονίου λήξης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας (His₇₀, Asp₁₁₂, Ser₂₀₅) του ενεργού κέντρου της KLK7 κωδικοποιούνται από τα εξώνια 3, 4 και 6 αντίστοιχα. Οι θέσεις των εσωνίων σε σχέση με τα κωδικόνια των εξωνίων είναι εξελικτικά συντηρημένες, όπως σε όλα τα γονίδια *KLK* και το πρότυπο τους είναι I-II-I-0. Στον υποκινητή του *KLK7* υπάρχουν στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (EREs) και στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs), μέσω των οποίων ρυθμίζεται η έκφρασή του (Yousef et al., 2000β; Dong et al., 2003; Holzscheiter et al., 2006; Shaw and Diamandis, 2008β). Στην Εικόνα 2.10 παρουσιάζεται η δομή του γονιδίου *KLK7* και του ανενεργού προενζύμου που κωδικοποιείται από αυτό.

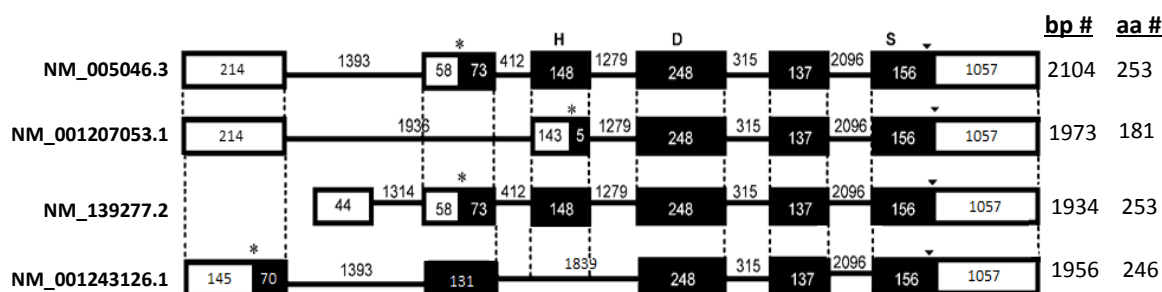


Εικόνα 2.10. Σχηματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου *KLK7* και του ανενεργού προενζύμου που παράγεται από τη μετάφραση του *KLK7* mRNA. Πέντε κωδικά εξώνια (κόκκινο χρώμα) και τέσσερα ενδιάμεσα εσώνια με συντηρημένο πρότυπο I-II-I-0. TIS (transcription initiation site): η κλασική θέση έναρξης της μεταγραφής, ATG1: κλασικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ATG2, ATG3: εναλλακτικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης. Η αρίθμηση των αμινοξικών καταλοίπων της καταλυτικής τριάδας (His₇₀, Asp₁₁₂, Ser₂₀₅) αφορά στην κλασική πρωτεϊνική ισομορφή *KLK7*, που μεταφράζεται από το ATG1 (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology).

Μέχρι σήμερα είναι γνωστά τέσσερα προϊόντα εναλλακτικής συρραφής του πρόδρομου ετετρογενούς RNA (hnRNA) του *KLK7*: *KLK7* mRNA μετάγραφο 1 (GenBank NM_005046.3), *KLK7* mRNA μετάγραφο 2 (GenBank NM_139277.2), *KLK7* mRNA

μετάγραφο 3 (GenBank NM_001207053.1) και *KLK7* mRNA μετάγραφο 4 (GenBank NM_001243126.1). Στην Εικόνα 2.11 απεικονίζεται η δομή των τεσσάρων εναλλακτικών mRNA μεταγράφων του *KLK7*, η οποία ακολούθως περιγράφεται αναλυτικά.

Τα *KLK7* mRNA μετάγραφα 1 (2104 βάσεις) και 2 (1934 βάσεις) διαφέρουν δομικά μεταξύ τους μόνο ως προς το μήκος της 5' UTR, λόγω του διαφορετικού μήκους του πρώτου μη κωδικού εξωνίου. Το μη κωδικό εξώνιο της 5' UTR του mRNA μεταγράφου 1 έχει μήκος 214 βάσεις, ενώ εκείνο του mRNA μεταγράφου 2 έχει μήκος μόλις 44 βάσεις. Τα *KLK7* mRNA μετάγραφα 1 και 2 έχουν το ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο μεταφράζεται παράγοντας ανενεργό προένζυμο με μήκος 253 αμινοξικά κατάλοιπα (μοριακό βάρος 27,5 kDa). Το ανενεργό προένζυμο στο αμινο-τελικό του άκρο περιέχει υδρόφοβο σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) μήκους 22 αμινοξικών καταλοίπων και προπεπτίδιο ενεργοποίησης μήκους 7 αμινοξικών καταλοίπων, του οποίου η πρωτεολυτική απομάκρυνση ενεργοποιεί το ένζυμο. Η τελική μορφή του ώριμου ενζύμου έχει μήκος 224 αμινοξικά κατάλοιπα (μοριακό βάρος 25kDa) (Hansson et al., 1994; Yousef et al., 2000β; Kurlender et al., 2005).



Εικόνα 2.11. Σχηματική απεικόνιση των mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7*. Στην πρώτη στήλη αναγράφονται οι αριθμοί κατάθεσης των αντίστοιχων αλληλουχιών στη βάση δεδομένων GenBank. Τα κουτιά παριστάνουν τα εξώνια και με μαύρο χρώμα παριστάνονται τα εξώνια της κωδικής περιοχής του mRNA, ενώ οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τα εσώνια. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα μήκη των εξωνίων και εσωνίων σε βάσεις. bp: ζεύγη βάσεων, aa: αριθμός αμινοξικών καταλοίπων της προβλεπόμενης πρωτεϊνικής ισομορφής, * κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ▼ κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης, H: ιστοιδίνη, D: ασπαραγινικό, S: σερίνη (αμινοξικά κατάλοιπα καταλυτικής τριάδας).

Το *KLK7* mRNA μετάγραφο 3 (1973 βάσεις) ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα ωθήκης, στα οποία εμφάνισε εντονότερη έκφραση συγκριτικά με καρκινικά κύτταρα ωθήκης (Dong et al., 2003). Το μετάγραφο αυτό δεν

διαθέτει μέρος της 5' κωδικής περιοχής, αφού του λείπει το κωδικό εξώνιο 2 και η μετάφρασή του ξεκινά από κωδικόνιο έναρξης ATG που βρίσκεται εντός του εξωνίου 3. Συνεπώς, πραγματοποιείται μετάφραση ενός καθοδικού (downstream) ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης σε σύγκριση με τα μετάγραφα 1 και 2. Η προβλεπόμενη πρωτεϊνική ισομορφή, που παράγεται από το μετάγραφο 3, έχει μικρότερο μήκος (181 αμινοξικά κατάλοιπα) από την κλασική ισομορφή, λόγω της έλλειψης του τμήματος που προαναφέρθηκε από την 5' κωδική περιοχή του mRNA. Συγκεκριμένα, λείπει το σηματοδοτικό πεπτίδιο και το προπεπτίδιο, καθώς και 43 αμινοξικά κατάλοιπα του αμινο-τελικού τμήματος. Μεταξύ των αμινοξέων που απουσιάζουν είναι και η ιστιδίνη της καταλυτικής τριάδας του ενεργού κέντρου του ενζύμου, συνεπώς η ισομορφή αυτή θα είναι πρωτεολυτικά ανενεργή (Kurlender et al., 2005; Dong et al., 2003).

Το *KLK7* mRNA μετάγραφο 4 (1956 βάσεις) διαφέρει δομικά από το μετάγραφο 1 ως προς το ενδιάμεσο κωδικό εξώνιο 3, το οποίο λείπει. Η μετάφραση του *KLK7* mRNA μεταγράφου 4 ξεκινά από εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης ATG που εντοπίζεται ανοδικά (upstream) του αντίστοιχου κωδικονίου έναρξης του μεταγράφου 1. Συγκεκριμένα, το κωδικόνιο έναρξης εντοπίζεται εντός του εξωνίου 1, το οποίο είναι μη κωδικό για τα άλλα τρία mRNA μετάγραφα. Έτσι, το mRNA μετάγραφο 4 έχει διαφορετικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης σε σύγκριση με το μετάγραφο 1. Η προβλεπόμενη πρωτεϊνική ισομορφή, που πιθανώς παράγεται από το μετάγραφο 4, έχει λίγο μικρότερο μήκος (246 αμινοξικά κατάλοιπα) από την κλασική ισομορφή και εντελώς διαφορετικό αμινο-τελικό άκρο, λόγω της τροποποίησης του πλαισίου ανάγνωσης. Επίσης, αφού απουσιάζει το κωδικό εξώνιο 3 που κωδικοποιεί την ιστιδίνη της καταλυτικής τριάδας του ενεργού κέντρου, και αυτή η πρωτεϊνική ισομορφή θα είναι πρωτεολυτικά ανενεργή.

Η *KLK7* είναι μια εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης με ειδικότητα χυμοθρυψίνης, η οποία παράγεται ως ανενεργό προένζυμο και ενεργοποιείται με πρωτεολυτική αποκοπή του προπεπτιδίου μετά από τη θέση της Lys₁₆ από πεπτιδάσες με ενεργότητα θρυψίνης, όπως για παράδειγμα η *KLK5* και η μεταλλοπρωτεάση *MMP20*. Η ενεργότητα όμοια με της χυμοθρυψίνης του ώριμου ενζύμου οφείλεται στο αμινοξύ Asp₁₉₆, που εντοπίζεται πριν το καταλυτικό κατάλοιπο Ser₂₀₅ στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος. Στο ώριμο ένζυμο υπάρχουν 12 κυστεϊνικά κατάλοιπα, από τα οποία 10 είναι συντηρημένα και σχηματίζουν δισουλφιδικές γέφυρες. Τα δυο επιπλέον κυστεϊνικά κατάλοιπα (Cys₁₃₇ και

Cys₂₃₉) δεν υπάρχουν στις κλασικές καλλικρεΐνες (KLK1, KLK2, KLK3/PSA), αλλά βρίσκονται σε παρόμοια θέση στις KLK4, KLK11, KLK6, KLK8 και KLK15 και πιθανότατα σχηματίζουν έναν επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό. Γνωστά υποστρώματα της KLK7 είναι η Ε-καδερίνη, η δεσμοκολλίνη 1 και η κερατινοδεσμοσίνη των κερατινοδεσμοσωμάτων, η προ-κασπάση 14, η μεταλλοπρωτεάση MMP9 και η φμπρονεκτίνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, συνεπώς θεωρείται ότι ενέχεται αντίστοιχα στη μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα κατά την καρκινογένεση, στη φυσιολογική απολέπιση του δέρματος και στην πέψη συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, διαδικασίες που έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε προηγούμενα κεφάλαια (Debela et al., 2008; Johnson et al., 2007; Mo et al., 2010; Brattsand et al., 2005; Ramani et al., 2011; Yamamoto et al., 2012).

Το γονίδιο *KLK7* εκφράζεται φυσιολογικά σε διάφορους ιστούς του οργανισμού και βιολογικά υγρά του οργανισμού και εμφανίζει τη μέγιστη έκφραση mRNA στο δέρμα, στο νεφρό, στο μαστό και στον κόλπο, αλλά και υψηλή έκφραση στον οισοφάγο, στον τράχηλο της μήτρας, στις ωοθήκες, στους όρχεις, στον πνεύμονα, στη σπονδυλική στήλη, στους σιελογόνους αδένες, στον θυροειδή αδένα, στον σπλήνα και στο στομάχι. Ωστόσο, σε πρωτεϊνικό επίπεδο η *KLK7* εκφράζεται φυσιολογικά κυρίως στο δέρμα, όπου έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, αλλά και στον οισοφάγο, στην καρδιά και στο ήπαρ, όπου εντοπίστηκε σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, η *KLK7* είναι παρούσα σε πολύ υψηλή συγκέντρωση στο κολποτραχηλικό έκκριμα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο μητρικό γάλα, στο πλάσμα του σπέρματος, στο σάλιο, στο ασκитικό υγρό και σε κυτοσόλια καρκινικών ιστών μαστού (Shaw and Diamandis, 2007).

Η καλλικρεΐνη 7 έχει μελετηθεί ως προς την κλινική σημασία της σε αρκετές μορφές καρκίνου, πέραν του καρκίνου του παχέος εντέρου για τον οποίο έγινε εκτενής αναφορά σε προηγούμενο κεφάλαιο. Μελέτες αποκάλυψαν μεταβολές της έκφρασης του *KLK7* σε ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους, όπως του μαστού, των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας (Talieri et al., 2004; Dong et al., 2003; Santin et al., 2004; Holzscheiter et al., 2006; Dorn et al., 2014; Li et al., 2014), καθώς και ότι η υπερ-έκφραση του γονιδίου *KLK7* συντελεί στον μεταστατικό φαινότυπο του καρκίνου των ωοθηκών (Prezas et al., 2006α). Επίσης, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *KLK7* υπερ-εκφράζεται και σε μη ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους, όπως του εγκεφάλου (Prezas et al., 2006β), του παγκρέατος

(Dong et al., 2008; Iakovlev et al., 2012), του στόματος (Zhao et al., 2011) και του πνεύμονα, όπου υπερ-εκφράζεται ωστόσο μόνο στις περιπτώσεις μη μεταστατικής νόσου (Planque et al., 2005). Αντίθετα, πολύ πρόσφατα δείχθηκε ότι η KLK7 υπο-εκφράζεται στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (Planque et al., 2005) και στον καρκίνο του προστάτη σε σύγκριση με καλοήθεις και φυσιολογικούς προστατικούς ιστούς και ότι η χαμηλή έκφρασή της συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα KLK3/PSA (Zhang et al., 2014). Στη συντριπτική πλειοψηφία των μελετών που προαναφέρθηκαν η KLK7 δείχθηκε να υπερ-εκφράζεται στους διάφορους τύπους καρκίνου και να συσχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση.

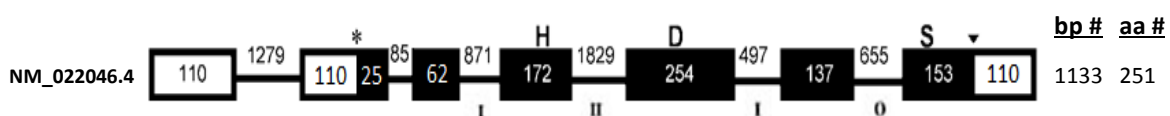
2.9. Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΣΤΙΚΗ ΚΑΛΙΚΡΕΪΝΗ 14 (KLK14)

Το γονίδιο της ανθρώπινης ιστικής καλικρεΐνης 14 (*KLK14*) κλωνοποιήθηκε από τους Yousef και συν. (2001) και χαρακτηρίστηκε από τους Hooper και συν. (2001). Είναι το ακραίο τελομερικό γονίδιο της οικογένειας των *KLKs* και εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων *KLK13* και *Siglec-9*. Καλύπτει μια περιοχή του γονιδιώματος με μήκος περίπου 6,35 kbp στο χρωμόσωμα 19q13.3-q13.4 και μεταγράφεται από το τελομερές προς το κεντρομερές, αντίθετα από το *Siglec-9* και όμοια το *KLK13* (Yousef et al., 2001β; Hooper et al., 2001).

Το *KLK14* (*KLK-L6*) (GenBank AF283669.1) αποτελείται από επτά εξώνια και έξι παρεμβαλλόμενα εσώνια, εκ των οποίων τα έξι εξώνια περιέχουν κωδικές αλληλουχίες. Το πρώτο εξώνιο καθώς και το μεγαλύτερο τμήμα του δεύτερου εξωνίου αποτελούν τη μη κωδική 5' UTR. Η κωδική περιοχή του mRNA του γονιδίου έχει μήκος 804 bp και απαρτίζεται από τα κωδικά εξώνια μήκους 26 bp, 62 bp, 172 bp, 254 bp, 137 bp και 153 bp (Εικόνα 2.12). Υπάρχουν τρία κωδικόνια έναρξης ATG στις θέσεις 110 του δεύτερου εξωνίου, 23 του τρίτου εξωνίου και 22 του τέταρτου εξωνίου, από τα οποία θα μπορούσε να ξεκινά η μετάφραση. Ωστόσο, υπάρχει μόνο ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πλήρους πολυπεπτιδικής αλυσίδας με την παρουσία και των τριών αμινοξικών καταλοίπων της καταλυτικής τριάδας και τα συντηρημένα αμινοξέα που την περιβάλλουν. Τα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας (His₆₇, Asp₁₁₁, Ser₂₀₄) του ενεργού κέντρου της KLK14 κωδικοποιούνται από κωδικόνια των εξωνίων 4, 5 και 7 αντίστοιχα. Οι θέσεις των εσωνίων σε σχέση με τα

κωδικόνια των εξωνίων είναι εξελικτικά συντηρημένες, όπως σε όλα τα γονίδια *KLK* και το πρότυπο τους είναι I-II-I-0. Κωδικόνιο λήξης εντοπίζεται 153 bp καθοδικά (downstream) της αρχής του τελευταίου κωδικού εξωνίου, το οποίο περιέχει το κωδικόνιο της σερίνης του ενεργού κέντρου. Υπάρχουν δυο πιθανές θέσεις πολυαδενυλίωσης σε παρόμοια απόσταση καθοδικά από το κωδικόνιο λήξης με εκείνες των *KLK3/PSA* και *KLK2*. Στον υποκινητή του *KLK14* υπάρχουν στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα (AREs), μέσω των οποίων ρυθμίζεται η έκφρασή του. Η *KLK14* υπερ-εκφράζεται υπό την επίδραση ανδρογόνων και σε μικρότερο βαθμό από προγεστίνες στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών (Yousef et al., 2001β; Yousef et al., 2003β; Hooper et al., 2001; Borrego et al., 2007β).

Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ένα μοναδικό προϊόν συρραφής του πρόδρομου ετερογενούς RNA (hnRNA) του *KLK14* (GenBank NM_022046.4) (Εικόνα 2.12). Το *KLK14* mRNA μετάγραφο μεταφράζεται παράγοντας ένα ανενεργό προένζυμο μήκους 251 αμινοξικών καταλοίπων (μοριακό βάρος 27,5 kDa). Το ανενεργό προένζυμο περιέχει στο αμινο-τελικό άκρο του το υδρόφοβο σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) μήκους 18 αμινοξικών καταλοίπων και το προπεπτίδιο ενεργοποίησης μήκους 6 αμινοξικών καταλοίπων, του οποίου η πρωτεολυτική απομάκρυνση ενεργοποιεί το ένζυμο. Η τελική μορφή του ώριμου ενζύμου έχει μήκος 227 αμινοξικά κατάλοιπα (Yousef et al., 2001β; Borrego et al., 2007β).



Εικόνα 2.12. Σχηματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου *KLK14*. Στην πρώτη στήλη αναγράφεται ο αριθμός κατάθεσης της αντίστοιχης αλληλουχίας στη βάση δεδομένων GenBank. Τα κουτιά παριστάνουν τα εξώνια και με μαύρο χρώμα παριστάνονται τα εξώνια της κωδικής περιοχής του mRNA, ενώ οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τα εσώνια. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα μήκη των εξωνίων και εσωνίων σε βάσεις. bp: ζεύγη βάσεων, aa: αριθμός αμινοξικών καταλοίπων της προβλεπόμενης πρωτεϊνικής ισομορφής, * κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ▼ κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης, H: ιστιδίνη, D: ασπαραγινικό, S: σερίνη (αμινοξικά κατάλοιπα καταλυτικής τριάδας).

Η *KLK14* είναι μια εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης με διττή ειδικότητα: θρυψίνης κυρίως και χυμοθρυψίνης δευτερευόντως. Παράγεται ως ανενεργό προένζυμο και ενεργοποιείται με πρωτεολυτική αποκοπή του προπεπτιδίου στη θέση Lys₂₄ - Ile₂₅ από

πεπτιδάσες με ενεργότητα θρυψίνης, όπως η KLK5, αλλά και με αυτοκατάλυση. Η παρουσία ενός ασπαραγινικού κατάλοιπου (Asp₁₉₈) έξι θέσεις πριν τη σερίνη του ενεργού κέντρου υποδηλώνει την ενεργότητα θρυψίνης της KLK14, η οποία διασπά το υπόστρωμα μετά από κατάλοιπο αργινίνης ή λυσίνης. Έχει δειχθεί, όμως επίσης, ότι η KLK14 μπορεί να διασπά το υπόστρωμα και σε θέσεις όπου υπάρχουν υδρόφοβα αμινοξέα (π.χ. φαινυλαλανίνη), συνεπώς εκδηλώνει και ενεργότητα όμοια με της χυμοθρυψίνης. Στο ώριμο ένζυμο υπάρχουν 12 κυστεϊνικά κατάλοιπα, από τα οποία 10 είναι απόλυτα συντηρημένα σε όλες τις KLKs και σχηματίζουν 5 δισουλφιδικές γέφυρες. Τα δυο επιπλέον κυστεϊνικά κατάλοιπα (Cys₁₃₆ και Cys₂₃₈) δεν υπάρχουν στις κλασικές καλικρεΐνες (KLK1, KLK2, KLK3/PSA), αλλά υπάρχουν και βρίσκονται σε παρόμοια θέση στις KLK5, KLK7, KLK6, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12 και KLK15 και πιθανότατα σχηματίζουν έναν επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό (Hooper et al., 2001; Yousef et al., 2001β; Felber et al., 2005; Borgeño et al., 2007β).

Υποστρώματα της KLK14 αποτελούν τα ανενεργά προένζυμα pro-KLK5, pro-KLK3, pro-KLK1 και pro-KLK11 *in vitro*, τα οποία συμμετέχουν στον πρωτεολυτικό καταρράκτη της ρευστοποίησης του ανθρώπινου σπέρματος μετά την ενεργοποίησή τους και γι' αυτό η KLK14 θεωρείται ως μόριο-κλειδί στον καταρράκτη αυτόν. Άλλωστε, έχει δειχθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ των διαταραχών της ρευστοποίησης του σπέρματος και της ασθενοσπερμίας με τα επίπεδα έκφρασης της KLK14 στο σπερματικό πλάσμα, αφού η αναστολή της KLK14 καθυστερεί σημαντικά τη ρευστοποίηση του σπέρματος, χωρίς όμως να την αναστέλλει πλήρως (Emami and Diamandis, 2008α; Emami et al., 2008). Επίσης, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η KLK14 στοχεύει, εκτός από το ανενεργό pro-KLK5, τον υποδοχέα PAR2 στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας και συμμετέχει στον πρωτεολυτικό καταρράκτη κατά τη φυσιολογική απολέπιση του δέρματος (Eissa and Diamandis, 2008).

Τα πρωτεϊνικά συστατικά φιβρονεκτίνη και κολλαγόνο τύπου I, II και III της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, καθώς και η λαμίνη και το κολλαγόνο τύπου IV της βασικής μεμβράνης, υδρολύονται αποτελεσματικά από την KLK14, συνεπώς η πρωτεάση αυτή είναι πολύ πιθανό να ενέχεται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας κατά τη διήθηση και μετάσταση του καρκίνου. Όμως, επειδή δείχθηκε ότι η KLK14 μπορεί να αποδομήσει μόνο την αποδιαταγμένη μορφή του κολλαγόνου *in vitro*, είναι πιθανό να

δρα μετά τις κολλαγενάσες (π.χ. μεταλλοπρωτεάσες), οι οποίες αποδιατάσσουν πρωτεολυτικά την φυσιολογική ενδογενή μορφή του κολλαγόνου *in vivo* (Felber et al., 2005; Borgoño et al., 2007β). Επίσης, η KLK14 μπορεί να διασπάσει τις πρωτεΐνες IGFBP-2 και IGFBP-3 που δεσμεύουν τους αυξητικούς παράγοντες τύπου ινσουλίνης IGFs, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των IGF-I και IGF-II, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η KLK14 μπορεί να ασκεί και αντικαρκινική επίδραση, λόγω της αποκάλυψης κρυμμένων θέσεων υδρόλυσης σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και του πλάσματος (π.χ. πλασμινογόνο), από τις οποίες μπορούν να παραχθούν πεπτιδικά θραύσματα με δράση παρόμοια με τις αγγειοστατίνες (Borgoño et al., 2007β).

Ένας ακόμη ρόλος της KLK14 έχει προταθεί στην προώθηση της εξέλιξης της αρθρίτιδας είτε άμεσα με την αποδόμηση δομικών συστατικών του χόνδρου των αρθρώσεων, στον οποίο η KLK14 εμφανίζει υψηλή έκφραση, είτε έμμεσα επάγοντας την έκφραση μεταλλοπρωτεασών, οι οποίες παράγουν πεπτιδικά θραύσματα της φμπρονεκτίνης και καταστρέφουν τους χόνδρους (Borgoño et al., 2007β). Τέλος, οι Οϊκονομοπούλου και συν. (2013) έδειξαν πρόσφατα έναν πιθανό ρόλο της KLK14 στη μη ειδική ανοσία του οργανισμού, αφού μπορεί να διασπά *in vitro* το συστατικό C3 του συμπληρώματος, παράγοντας την αναφυλατοξίνη C3a και μπορεί να συμβάλλει στο σχηματισμό οιδήματος κατά τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα της C3a (C3aR) *in vivo* (Οϊκονομοπούλου et al., 2013).

Το γονίδιο *KLK14* εκφράζεται φυσιολογικά σε διάφορους ιστούς και βιολογικά υγρά του οργανισμού και εμφανίζει τη μέγιστη έκφραση mRNA στον εγκέφαλο, στο μαστό, στον προστάτη, στον θυρεοειδή αδένα και στον κόλπο. Επίσης, εκφράζεται στη σπονδυλική στήλη, στο δέρμα, στον σπλήνα, στο στομάχι, στο λεπτό και παχύ έντερο, στον πνεύμονα και στους σιελογόνους αδένες. Ωστόσο, σε πρωτεϊνικό επίπεδο η KLK14 εκφράζεται φυσιολογικά κυρίως στο δέρμα και στους χόνδρους, όπου έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, αλλά και στο μαστό, στον κόλπο και στην ουροδόχο κύστη, όπου εντοπίστηκε σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ σχεδόν απουσιάζει από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η αναντιστοιχία που παρατηρήθηκε μεταξύ των πολύ υψηλών επιπέδων έκφρασης mRNA και των πολύ χαμηλών επιπέδων έκφρασης πρωτεΐνης KLK14 στους ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος έχει αποδοθεί στην

ταχεία αποδόμηση του mRNA μετά τη μεταγραφή (ασταθές mRNA και μικρός χρόνος ημιζωής) ή στην ταχεία αποδόμηση της πρωτεΐνης μετά τη μετάφραση. Η KLK14 είναι, επίσης, παρούσα σε υψηλή συγκέντρωση στο κολποτραχηλικό έκκριμα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα του σπέρματος, στο αμνιακό υγρό και στο σάλιο (Shaw and Diamandis, 2007; Borgoño et al., 2003).

Η KLK14 έχει μελετηθεί για την κλινική σημασία της σε αρκετές μορφές καρκίνου, πέραν του καρκίνου του παχέος εντέρου για τον οποίο έγινε εκτενής αναφορά σε προηγούμενο κεφάλαιο. Δεδομένου ότι το γονίδιο *KLK14* υπόκειται σε ορμονική ρύθμιση, μελετήθηκε σε ορμονο-εξαρτούμενους καρκίνους, όπως του μαστού, των ωοθηκών και του προστάτη και παρατηρήθηκε διαφορική έκφρασή του σε σύγκριση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό (Yousef et al., 2002; Borgoño et al., 2003; Yousef et al., 2003β; Yousef et al., 2003γ; Fritzsche et al., 2006; Borgoño et al., 2007β; Rabien et al., 2008; Papachristopolou et al., 2011). Συγκεκριμένα, στον καρκίνο των ωοθηκών έχει παρατηρηθεί αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης KLK14 τόσο σε καρκινικούς ιστούς όσο και στον ορό ασθενών, η οποία σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου και έχει δειχθεί ότι η αποσιώπηση της έκφρασής του *KLK14* με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNAs) οδηγεί σε σημαντική καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και διήθησης των καρκινικών κυττάρων (Borgoño et al., 2003; Zhang et al., 2012). Στον καρκίνο του προστάτη τα αυξημένα επίπεδα mRNA *KLK14* σε ιστούς και πρωτεΐνης στον ορό ασθενών έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση και έχει προταθεί η πιθανή χρησιμότητα του KLK14 ως συμπληρωματικού δείκτη στο ήδη χρησιμοποιούμενο KLK3/PSA (Yousef et al., 2003γ; Borgoño et al., 2007β; Rabien et al., 2008). Στον καρκίνο του μαστού το *KLK14* υπερ-εκφράζεται σε επίπεδο mRNA σε σύγκριση με φυσιολογικούς και καλοήθεις ιστούς, αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης και έχει προταθεί ως πιθανός διαγνωστικός δείκτης σε βιοψίες νεοπλασιών του μαστού για τη διάκριση μεταξύ καλοήθειας και κακοήθειας (Yousef et al., 2002; Fritzsche et al., 2006; Papachristopolou et al., 2011). Επίσης, η KLK14 έχει μελετηθεί σε μη ορμονο-εξαρτούμενους καρκίνους, όπως οι σιελογόνοι αδένες (Hashem et al., 2010) και ο πνεύμονας (Planque et al., 2008).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες στις Η.Π.Α. και είναι ένας από τους κυρίαρχους τύπους καρκίνου στις δυτικές βιομηχανοποιημένες χώρες. Ιστικοί καρκινικοί δείκτες έχουν προταθεί ως πιθανοί προγνωστικοί δείκτες καθώς και δείκτες για εξατομικευμένες θεραπείες. Οι πρωτεάσες αποτελούν καλούς υποψήφιους προγνωστικούς ή διαγνωστικούς δείκτες, διότι ενέχονται στην εξέλιξη του καρκίνου είτε προάγοντας είτε αναστέλλοντας την.

Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες (KLKs) αποτελούν μια υποοικογένεια 15 εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης, οι οποίες εντοπίζονται κατά βάση στο κυτταρόπλασμα αδενικών επιθηλιακών κυττάρων διαφόρων οργάνων και ιστών, από όπου εκκρίνονται. Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των ιστικών καλλικρεϊνών σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης απορρυθμίζεται στον καρκίνο και έχει συσχετιστεί με την πρόγνωση, γι' αυτό οι καλλικρεΐνες έχουν προταθεί ως νέοι υποσχόμενοι βιοδείκτες καρκίνου ή ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι.

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η μελέτη και η κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στο πλαίσιο της ταυτοποίησης νέων πιθανών μοριακών προγνωστικών δεικτών για τον καρκίνο αυτόν αλλά και πιθανών θεραπευτικών στόχων. Συλλέχθηκε στατιστικά σημαντικό δείγμα καρκινικών και μη καρκινικών ιστοτεμαχίων παχέος εντέρου από ασθενείς, για τους οποίους δημιουργήθηκε βάση δεδομένων με κλινικοπαθολογικά στοιχεία για κάθε ασθενή. Αναπτύχθηκε μεθοδολογία RT-PCR και PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) για τη μελέτη της έκφρασης mRNA των *KLK7* και *KLK14*, καθώς και ανοσοϊστοχημείας για τη μελέτη της έκφρασης και της κυτταρικής εντόπισης των πρωτεϊνών *KLK7* και *KLK14*.

Επίσης, σκοπός ήταν η ανάλυση των mRNA μεταγράφων των δυο αυτών γονιδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και ιστούς, ώστε να διερευνηθεί η παρουσία νέων ισομορφών που πιθανά συνδέονται με τον καρκινικό φαινότυπο. Αναπτύχθηκε μεθοδολογία RT-PCR για την ανίχνευση των διαφόρων εναλλακτικών

mRNA μεταγράφων των *KLK7* και *KLK14*, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με αλληλουχοποίηση (sequencing).

Τέλος, σκοπός ήταν η διερεύνηση του βιολογικού ρόλου των *KLK7* και *KLK14* στον καρκίνο του παχέος εντέρου, κατόπιν αποσιώπησής τους με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNAs) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και μελέτη των συνεπειών στην διηθητικότητα των κυττάρων με την εφαρμογή της δοκιμασίας διηθητικότητας *in vitro* σε υπόστρωμα MatrigelTM (Invasion assay).

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

3.1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Για την παρούσα Διδακτορική Διατριβή συλλέχθηκαν συνολικά 245 δείγματα ιστού παχέος εντέρου από 175 ασθενείς του Αντικαρκινικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας». Τα καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου προέρχονταν από 101 ασθενείς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση πρωτοπαθούς διηθητικού καρκίνου παχέος εντέρου κατά την περίοδο 2002-2011. Για τα 70 από τα 101 δείγματα υπήρχε διαθέσιμος και φυσιολογικός εντερικός βλεννογόνος από τον ίδιο ασθενή (ζεύγος ιστών), επαρκώς διαχωρισμένος από τον όγκο, σε απόσταση τουλάχιστον 10 cm. Ως φυσιολογικό ιστό θεωρούμε τον παρακείμενο μη καρκινικό ιστό του όγκου. Οι ασθενείς δεν είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία πριν από την επέμβαση. Μελετήθηκαν, επίσης, 74 αδενώματα παχέος εντέρου, τα οποία αφαιρέθηκαν με εκτομή κατά την διάρκεια κολonosκόπησης, αλλά δεν συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση επιβίωσης. Η μέση ηλικία των ασθενών με καρκίνο ήταν τα $68,4 \pm 1,2$ έτη, ενώ των ασθενών με αδένωμα τα $67,76 \pm 1,34$ έτη. Τα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της έκφρασης των δυο υπό μελέτη γονιδίων σε επίπεδο mRNA με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real time qPCR).

Όλοι οι ιστοί του παχέος εντέρου (καρκινικοί, αδενωμάτωδεις και φυσιολογικοί) αξιολογήθηκαν από Παθολογοανατόμους με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης σε τομές παραφίνης. Τα δείγματα συνοδεύονταν από μια ενημερωμένη βάση δεδομένων που περιελάμβανε κλινικά και ιστολογικά στοιχεία σχετικά με τον κάθε όγκο (μέγεθος, βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο, κ.α.), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η σταδιοποίηση των καρκινικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σύστημα TNM, όπως καταρτίστηκε από την Αμερικανική Συντονιστική Επιτροπή για τον Καρκίνο (AJCC) (Edge et al., 2010).

Μετά την χειρουργική επέμβαση καταγράφηκαν δυο σημαντικά στοιχεία: ο ελεύθερος νόσου χρόνος επιβίωσης (Disease-free Survival, DFS) και ο χρόνος ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) των ασθενών. Ως ελεύθερος νόσου χρόνος επιβίωσης (DFS) ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ της ημερομηνίας της χειρουργικής αφαίρεσης του πρωτοπαθούς καρκινικού όγκου και της ημερομηνίας της πρώτης

διαγνωσμένης ένδειξης υποτροπής του ασθενούς. Ως χρόνος ολικής επιβίωσης (OS) ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ της ημερομηνίας χειρουργικής αφαίρεσης του όγκου και της ημερομηνίας θανάτου του ασθενούς ή της ημερομηνίας της τελευταίας παρακολούθησης για τους ασθενείς που ζούσαν ως το τέλος της μελέτης. Ο χρόνος μετεγχειρητικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και την συνολική επιβίωση (OS) κυμάνθηκε από 1 μήνα έως 111 μήνες.

Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τα ηθικά κριτήρια της Διακήρυξης του Ελσίνκι το 1995, όπως αναθεωρήθηκε στο Τόκιο το 2004. Όλοι οι ασθενείς ήταν ενημερωμένοι για την έρευνα και συγκατατέθηκαν εγγράφως για τη συμμετοχή τους. Η επιστημονική μελέτη των ιστών πραγματοποιήθηκε με την έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Αντικαρκινικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας».

3.1.2. ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Συλλέχθηκαν, της, 84 τομές παραφίνης (πάχους 5 μm) από καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου, καθώς και 4 τομές φυσιολογικού βλεννογόνου παχέος εντέρου (επαρκώς διαχωρισμένου από τον όγκο σε απόσταση τουλάχιστον 10 cm) και 4 τομές αδενωματώδους ιστού με σκοπό τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14. Τα δείγματα είχαν υποστεί την κλασική ιστολογική τεχνική, η οποία περιλαμβάνει μονιμοποίηση, πλύσιμο και αφυδάτωση, διάγυαση, εμπότιση με παραφίνη και τομή στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Αντικαρκινικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας». Της οι τομές παχέος εντέρου αξιολογήθηκαν ιστολογικά από Παθολογοανατόμους με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Τα δείγματα συνοδεύονταν από μια ενημερωμένη βάση δεδομένων που περιελάμβανε κλινικά και ιστολογικά στοιχεία των ασθενών (μέγεθος και βαθμός αποδιαφοροποίησης του όγκου, στάδιο της νόσου, κ.α.), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η μέση ηλικία των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν $68,8 \pm 1,17$ έτη με εύρος από 31 έως 85 έτη και ο χρόνος μετεγχειρητικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών κυμαινόταν από 1 έως 127 μήνες. Οι ασθενείς δεν είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία πριν από την επέμβαση.

Η επιστημονική μελέτη των ιστών πραγματοποιήθηκε με την έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου.

3.1.3. ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου HT-29, DLD-1 (*Duke's type C*), LS 180 (*Duke's type B*), Caco-2 και HCT 116, οι οποίες προέρχονται από ορθοκολικά αδενοκαρκινώματα διαφόρων σταδίων και αποτελούνται από προσκολλώμενα επιθηλιακά κύτταρα. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης των δυο γονιδίων σε επίπεδο mRNA σε όλες τις κυτταρικές σειρές και επιλέχθηκαν εκείνες που εμφανίζουν τη μέγιστη έκφραση mRNA για το κάθε γονίδιο. Στις σειρές αυτές πραγματοποιήθηκε καταστολή της έκφρασης και αξιολογήθηκε ο ρόλος κάθε γονιδίου στη διηθητική ικανότητα των αντίστοιχων κυττάρων *in vitro*. Ακολούθησε Πρωτεομική ανάλυση στα κυτταρολύματα που απομονώθηκαν μετά την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *KLK7*.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Τα κύτταρα DLD-1 και HCT 116 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS, Gibco®, Life Technologies, USA) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Pen Strep, Life Technologies, USA). Τα κύτταρα HT-29, LS 180 και Caco-2 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, USA) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Pen Strep, Life Technologies, USA). Οι καλλιέργειες έγιναν εντός πλαστικής φιάλης, με επιφάνεια (εμβαδού 25 cm² ή 75 cm²) η οποία καλυπτόταν από μονόστιβο κυτταρικό ταπήτιο σε ποσοστό περίπου 80% μέχρι τα κύτταρα να ανακαλλιεργηθούν ή να διασπαρούν σε νέες φιάλες σε αραιώση 1:2. Για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φιάλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης (0,025% Trypsin/EDTA, Gibco®, Life Technologies, USA), μετά από πλύση με στείρο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline, PBS). Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και η

επώασή τους έγινε σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO₂.

3.2.2. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Μετά την συλλογή τους, τα δείγματα φρέσκου ιστού εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα RNA_{later} (Ambion®, LifeTechnologies, USA) και διατηρήθηκαν στους – 80°C μέχρι να γίνει η απομόνωση του RNA. Ο ιστός κόπηκε και ομογενοποιήθηκε με τη χρήση του ομογενοποιητή Mikro-Dismembrator U (Sartorius, Germany).

3.2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Ολικό RNA τόσο από τα δείγματα ιστού όσο και από τα κύτταρα εκχυλίστηκε με τη χρήση του πακέτου αντιδραστηρίων NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Germany), το οποίο αποδίδει εξαιρετικά καθαρό RNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκαν με φωτομέτρηση στη συσκευή NanoDrop 1000 με τη βοήθεια του λογισμικού ND-1000 v3.3.0 (NanoDrop Technologies Inc, DE, USA). Οι λόγοι απορρόφησης των δειγμάτων ήταν $2.15 > A_{260}/A_{280} > 1.8$ και $A_{260}/A_{230} > 1.8$.

Με εκμαγείο το ολικό RNA έγινε σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή 1 μg ολικού RNA, το οποίο μετατράπηκε σε μονόκλωνο cDNA, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης (oligo-dTs, Invitrogen, Life Technologies, USA) και το σύστημα της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript™ II Reverse-Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, USA). Τα ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των ευκαρυωτικών ώριμων mRNA μορίων, οπότε προκύπτουν μόρια cDNA μόνο από τα mRNA μετάγραφα που περιέχονται στο μίγμα του ολικού RNA που εκχυλίστηκε από τον ιστό. Το πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο υβριδοποίησης του εκκινητή oligo-dT στην poly(A) ουρά των μορίων mRNA στους 70°C για 10 λεπτά, κατόπιν ένα στάδιο πολυμερισμού στους 42°C για 55 λεπτά και στους 70°C για 15 λεπτά και τέλος ένα στάδιο επώασης με RNase H (Invitrogen, Life Technologies, USA) στους 37°C για 20 λεπτά, κατά το οποίο το ένζυμο ριβονουκλεάση H καταστρέφει το mRNA από τα υβριδικά μόρια mRNA-cDNA και μένει ως τελικό προϊόν μονόκλωνο cDNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., USA).

3.2.4. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) καθιστά δυνατή την παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA μέσω του *in vitro* ενζυμικού πολλαπλασιασμού της. Ο σχεδιασμός ειδικών συνθετικών DNA εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων (primers), καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικό προς τη μια από τις δυο αλυσίδες του δίκλωνου DNA και υβριδοποιούνται μόνο στην αλληλουχία-στόχο, καθορίζει τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η επιμήκυνση των νέων αλυσίδων γίνεται από την ειδική DNA πολυμεράση *Taq* που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus Aquaticus* και αντέχει σε θερμοκρασίες μέχρι 95°C (Gibbs, 1990).

Χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια (primers) και τις βέλτιστες συνθήκες πολυμερισμού (αριθμός κύκλων, θερμοκρασία υβριδοποίησης T_{an} , χρόνος επιμήκυνσης) πολλαπλασιάστηκαν εκθετικά αλληλουχίες cDNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14*, καθώς και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* (β -ακτίνη) σε δείγματα καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου, ώστε να διαπιστωθεί σε ποιες από αυτές εκφράζονται και σε ποιες όχι (ποιοτικός προσδιορισμός). Οι εκκινητές για το *KLK7* mRNA υβριδοποιούνται σε κοινή περιοχή των τεσσάρων mRNA μεταγράφων του γονιδίου: *KLK7* mRNA μετάγραφο 1 (GenBank NM_005046.3), *KLK7* mRNA μετάγραφο 2 (GenBank NM_139277.2), *KLK7* mRNA μετάγραφο 3 (GenBank NM_001207053.1) και *KLK7* mRNA μετάγραφο 4 (GenBank NM_001243126.1). Οι εκκινητές για το *KLK14* mRNA υβριδοποιούνται στο μοναδικό γνωστό mRNA μετάγραφο (GenBank NM_022046.4). Τα εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια που σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου Primer3 (University of Massachusetts Medical School, USA), αναγράφονται στον Πίνακα 3.1.

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μ l ανά δείγμα περιέχονταν: 100 ng cDNA, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP), 0,25 μ M από κάθε εκκινητή και 2 μονάδες Platinum® *Taq* DNA πολυμεράση (Invitrogen, Life Technologies, USA). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., USA).

Πίνακας 3.1. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση των αλληλουχιών των γονιδίων *KLK7* και *KLK14*, καθώς και του γονιδίου αναφοράς *ACTB*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση υβριδοποίησης
K7ex3F	5'–GAATGAGTACACCGTGCACC–3'	20	55,0	56,0	491-510 ¹ (εξ. 3)
K7ex5R	5'–TGCCAGCGCACAGCATGGAA–3'	20	60,0	63,0	830-849 ¹ (εξ. 5)
Προϊόν PCR		359			
K14ex3F	5'–GCCCTCAGCCCTAAAATGTTCC–3'	23	56,5	60,3	252-275 ² (εξ. 3)
K14ex7R	5'–AGCTTCTGTACTTGCACAGGTTGG–3'	24	50,0	59,4	971-994 ² (εξ. 7)
Προϊόν PCR		743			
ACTB F	5'–ATCTCGCACCACACCTTCTA–3'	20	55,0	60,1	337-356 ³ (εξ. 3)
ACTB R	5'–CGTCATACTCCTGCTTGCTG–3'	21	47,6	56,1	1155-1174 ³ (εξ. 6)
Προϊόν PCR		837			

¹ στην καταγραφή NM_005046.3 (*GenBank*), ² στην καταγραφή NM_022046.4 (*GenBank*), ³ στην καταγραφή NM_001101.3 (*GenBank*).

Η αντίδραση PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών του γονιδίου *KLK7* περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη (denaturation) του DNA στους 94°C για 9 λεπτά και κατόπιν 35 επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη της μήτρας δίκλωνου DNA: 94°C για 30 sec.
2. Υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες: 68°C για 1 λεπτό.
3. Επιμήκυνση (extension) των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5' → 3': 72°C για 1 λεπτό.

Τελική επιμήκυνση (final extension): 72°C για 10 λεπτά.

Η αντίδραση PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών του γονιδίου *KLK14* περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 9 λεπτά και κατόπιν 36 επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από:

1. Αποδιάταξη της μήτρας δίκλωνου DNA: 94°C για 30 sec.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες: 68°C για 50 sec.

3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5' → 3': 72°C για 1 λεπτό.

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 8 λεπτά.

Η αντίδραση PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών του γονιδίου *ACTB* περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 9 λεπτά και κατόπιν 30 επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη της μήτρας δίκλωνου DNA: 94°C για 30 sec.

2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες: 62°C για 1 λεπτό.

3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5' → 3': 72°C για 1 λεπτό.

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 λεπτά.

3.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική και παρασκευαστική μέθοδος που στηρίζεται στην ιδιότητα των φορτισμένων σωματιδίων να κινούνται προς τον αντίθετο από το φορτίο τους πόλο σε υδατικά διαλύματα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Με τον τρόπο αυτόν οι διαφορές στη μάζα και το φορτίο των διαφορετικών μορίων μεταφράζονται σε διαφορές της κινητικότητάς τους εντός ηλεκτρικού πεδίου. Για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ενός πολυσακχαρίτη ο οποίος ως ηλεκτροφορητικό υλικό σχηματίζει πυκνό δίκτυο ουδέτερων επαναλαμβανόμενων μονάδων. Οι αλυσίδες της αγαρόζης σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό του πηκτώματος, μέσω των οποίων μπορεί να γίνει ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων (Maniatis et al., 1982).

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει τη φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, είναι ο απλούστερος τρόπος ποιοτικού προσδιορισμού των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Τα πολλαπλασιασμένα δίκλινα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους και εμφανίζονται ως διακριτές ζώνες που φθορίζουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία, λόγω της πρόσδεσης της χρωστικής στις βάσεις του DNA.

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v), που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (C_{TEB} 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και εμβαπτίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE pH 8,0 (0,45 M Tris base, 0,45 M Boric acid και 0,5 M EDTA). Σε 15 μL δείγματος προστέθηκαν 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης Gel Loading Dye, Blue 6X (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν ταυτόχρονα με πρότυπα μοριακών βαρών (50bp DNA ladder, New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA), ώστε να προσδιοριστεί το μέγεθός τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας στο πήκτωμα σταθερή τάση 100 Volts μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE για 45 λεπτά σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Hybaid, Thermo Fisher Scientific, Malaysia). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε με σύστημα κάμερας Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

3.2.6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14*

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν, ομαδοποιήθηκαν ανά ιστολογικό τύπο σε φυσιολογικά, αδενωματώδη, καρκινώματα *in situ* και καρκινώματα σταδίου TNM I, II, III και IV, ανάλογα με το στάδιο εξέλιξης της νόσου. Με ανάμιξη ίσης ποσότητας cDNA (200 ng) από 10 δείγματα του ίδιου ιστολογικού τύπου δημιουργήθηκαν δεξαμενές cDNA (cDNA pools) για κάθε τύπο, με σκοπό την ανίχνευση των διαφόρων mRNA μεταγράφων των δυο γονιδίων σε αυτές με την μέθοδο RT-PCR, η οποία παρέχει μια ένδειξη για το ποια mRNA μετάγραφα εκφράζονται σε κάθε στάδιο της νόσου. Αφού ταυτοποιήθηκε η παρουσία συγκεκριμένων μεταγράφων στις αντίστοιχες δεξαμενές cDNA με αλληλουχοποίηση (sequencing) των ζωνών DNA που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε ημι-ποσοτικός (semi-quantitative) προσδιορισμός της έκφρασής τους. Επίσης, προσδιορίστηκε η έκφρασή τους ποιοτικά και στις διαθέσιμες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου.

Σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι ειδικοί εκκινητές (primers), οι οποίοι μπορούν να διακρίνουν τα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *KLK7*, με τη βοήθεια του αλγορίθμου Primer3 (University of Massachusetts Medical School, USA).

Πίνακας 3.2. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση των αλληλουχιών των μεταγράφων του γονιδίου *KLK7*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση υβριδοποίησης
K7F1,2,4	5'–GGAGAGGCCCTTCCTCGCCT–3'	20	70,0	63,9	223-242 ¹ (εξ. 2)
K7R1,2,4	5'–TAGCCGGGGTGGCGGAATGA–3'	20	65,0	63,8	564-583 ² (εξ. 4)
Προϊόντα PCR	KLK7 μετάγραφα 1 και 2	361			
	KLK7 μετάγραφο 4	231			
K7F1,3	5' –AAATGCAGGCGGGGGTGTCC–3'	20	65,0	63,3	43-62 ³ (εξ. 1)
K7R1,3	5' –TGCACATGGGGCGCCATCAA–3'	20	60,0	63,0	364-383 ² (εξ. 3)
Προϊόντα PCR	KLK7 μετάγραφο 1	341			
	KLK7 μετάγραφο 3	210			

¹στις καταγραφές *NM_005046.3* και *NM_001243126.1* (*GenBank*), ²στην καταγραφή *NM_005046.3* (*GenBank*), ³στις καταγραφές *NM_005046.3* και *NM_001207053.1* (*GenBank*).

Για το γονίδιο *KLK14* χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και για τις κυτταρικές σειρές, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αφού υπάρχει ένα μόνο γνωστό mRNA μετάγραφο (*GenBank* *NM_022046.4*) του γονιδίου *KLK14*. Οι αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή PTC-200 Gradient Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., USA).

Οι ζώνες που προέκυψαν μετά την ηλεκροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR, απομονώθηκαν και αλληλουχοποιήθηκαν (sequencing), με σκοπό την ταυτοποίησή τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πυκνομέτρηση (densitometry) των ζωνών cDNA των μεταγράφων καθώς και των ζωνών cDNA του γονιδίου αναφοράς *ACTB* με τη βοήθεια του λογισμικού 1D Image Analysis Software, version 3.6 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης κάθε μεταγράφου πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό του λόγου της τιμής πυκνομέτρησης κάθε μεταγράφου προς την τιμή πυκνομέτρησης του γονιδίου αναφοράς σε κάθε δεξαμενή cDNA.

3.2.7. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

3.2.7.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΠΙΟ ΣΤΑΘΕΡΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η επιλογή ενός γονιδίου αναφοράς που έχει πολύ σταθερή έκφραση στα δείγματα είναι καθοριστική για την αντικειμενικότερη δυνατή μέτρηση της έκφρασης ενός υπό μελέτη γονιδίου σε ένα πλήθος δειγμάτων. Προκειμένου να επιλεγεί το πιο σταθερά

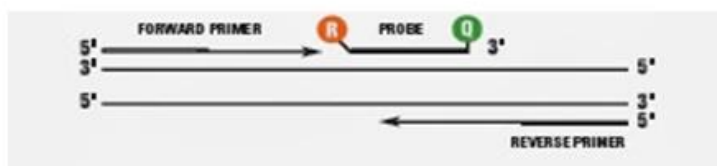
εκφραζόμενο γονίδιο αναφοράς, που δεν παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφρασή του μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών παχέος εντέρου, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια geNorm™ Reference Gene Selection Kit with PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK) που συμπεριλαμβάνουν έξι υποψήφια γονίδια αναφοράς (*GAPDH*, *18SRNA*, *B2M*, *EIF4A2*, *YWHAZ*, *CYC1*) προς εξέταση. Η έκφραση mRNA των έξι υποψήφιων γονιδίων αναφοράς προσδιορίστηκε ποσοτικά σε 20 δείγματα cDNA φυσιολογικού ιστού και σε 20 δείγματα cDNA καρκινικού ιστού με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK) στη συσκευή ABI Prism7500 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό geNorm™, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το Κυτόχρωμα c-1 (*CYC1*) βρέθηκε ότι είναι το περισσότερο σταθερό ως προς την έκφρασή του γονίδιο αναφοράς μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων, οπότε και επιλέχθηκε για την κανονικοποίηση της έκφρασης του mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14*.

3.2.7.2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* στα δείγματα του παχέος εντέρου προσδιορίστηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR) στη συσκευή ABI Prism7500 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του προϊόντος της αντίδρασης PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου. Η διαδικασία της ενίσχυσης του DNA παράγει σήμα φθορισμού (fluorescence) ανάλογο του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών, το οποίο αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου στο δείγμα. Η τεχνική είναι πολύ ταχύτερη από τη συμβατική PCR, αφού παρακολουθείται η πορεία της αντίδρασης και καταγράφονται τα αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο (Kubista, et al., 2006). Η ανίχνευση των προϊόντων στην qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιείται με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές (probes). Τα ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές δεν επιμηκύνονται και είναι διπλά σημασμένα με μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (reporter dye) στο 5' άκρο και μια χρωστική αποσβέτη (quencher dye) στο μέσο ή στο 3' άκρο της αλληλουχίας. Αυτά

υβριδοποιούνται στο προϊόν της αντίδρασης και εκπέμπουν σήμα φθορισμού, όταν κοπούν από την Taq πολυμεράση λόγω της δράσης της ως 5'→3' εξωνουκλεάση. Η απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής αναφοράς από τη χρωστική αποσβέτη, λόγω υδρόλυσης του 5' άκρου του ανιχνευτή, έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή σήματος φθορισμού, το οποίο καταγράφεται από το οπτικό σύστημα της ειδικής συσκευής real-time PCR (Lie and Petropoulos, 1998).

1. Πολυμερισμός: Η φθορίζουσα χρωστική (R) και η χρωστική αποσβέτης (Q) είναι προσδεμένες στο 5' και 3' άκρο του ανιχνευτή TaqMan αντίστοιχα.



2. Εκτόπιση ανιχνευτή: Όταν ο ανιχνευτής είναι ανέπαφος, η φθορίζουσα χρωστική (R) δεν εκπέμπει σήμα φθορισμού διότι αυτό αποσβάζεται.



3. Διάσπαση: Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου επιμήκυνσης η DNA πολυμεράση κόβει τη φθορίζουσα χρωστική από τον ανιχνευτή.



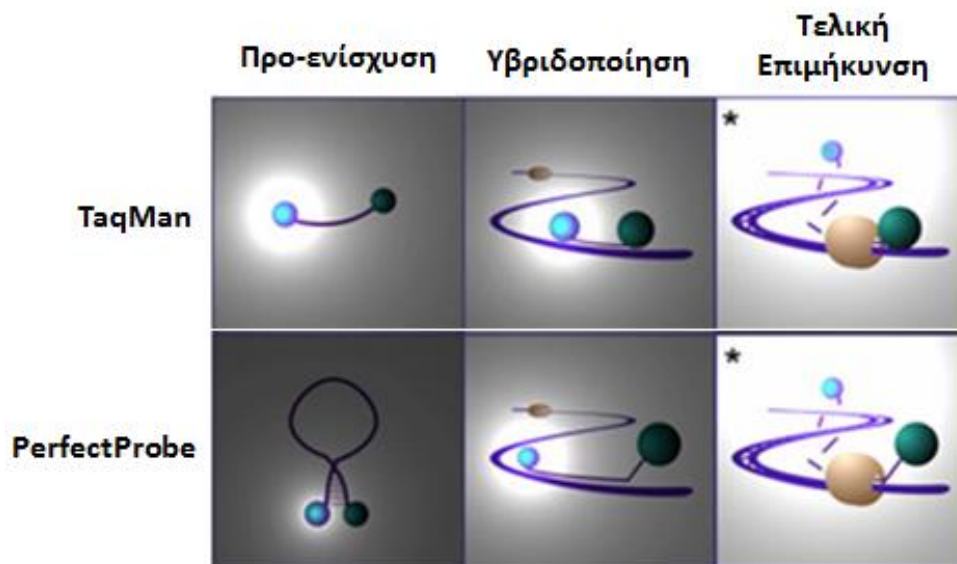
4. Ολοκλήρωση του πολυμερισμού: Μετά την απομάκρυνσή της από τη χρωστική αποσβέτη, η φθορίζουσα χρωστική εκπέμπει το χαρακτηριστικό σήμα φθορισμού.



Εικόνα 3.1. Χημεία TaqMan®.

Στη Διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία προσδιορισμού PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK), η οποία λειτουργεί παρόμοια με τους ανιχνευτές TaqMan, αλλά παρέχει μια πιο ευαίσθητη ανίχνευση. Οι ανιχνευτές PerfectProbe™ έχουν δευτεροταγή δομή φουρκέτας, η οποία μειώνει χωροταξικά την απόσταση μεταξύ

των χρωστικών αναφοράς και αποσβέτη και έτσι ελαχιστοποιείται ο θόρυβος (background) μη ειδικού φθορισμού. Επιπλέον, οι ιχνηθέτες PerfectProbe™, ως ανιχνευτές υδρόλυσης, εκλύουν έντονο σήμα φθορισμού κατά τη σύνθεση του προϊόντος, όπως και οι ανιχνευτές TaqMan.



Εικόνα 3.2. Χημεία PerfectProbe (Πηγή primerdesign.co.uk).

Σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για το κάθε γονίδιο με σκοπό την ανίχνευση των τεσσάρων εναλλακτικών μεταγράφων mRNA του *KLK7* (NCBI Ref. Sequences: NM_005046.3 *KLK7* μετάγραφο 1, NM_139277.2 *KLK7* μετάγραφο 2, NM_001207053.1 *KLK7* μετάγραφο 3 και NM_001243126.1 *KLK7* μετάγραφο 4) και του ενός γνωστού mRNA μεταγράφου του *KLK14* (NCBI Ref Sequence: NM_022046.4). Οι εκκινητές για το γονίδιο *KLK7* υβριδοποιούνται σε κοινή περιοχή των τεσσάρων γνωστών mRNA μεταγράφων. Η έκφραση του ενδογενούς γονιδίου ελέγχου *CYC1* προσδιορίστηκε με τη χρήση έτοιμων εκκινητών PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK). Οι αλληλουχίες των ειδικών εκκινητών αναγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα.

Πίνακας 3.3. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση των αλληλουχιών των μεταγράφων των γονιδίων *KLK7* και *KLK14*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	Ποσοστό GC (%)	Tm (°C)	Θέση υβριδοποίησης
K7F PerfectProbe™	5'–GCACTCTCAAACACTGGACT–3'	20	50,0	54,9	1256-1273 ¹ (εξ. 6)
K7R PerfectProbe™	5'–CCTAAGATTAGAGTTACTGGGTCAA–3'	25	40,0	53,7	1343-1367 ¹ (εξ. 6)
Προϊόν PCR		112			
K14F PerfectProbe™	5'–AGAAGCTGGATTGAGGAAACG–3'	21	47,6	55,0	988-1008 ² (εξ. 7)
K14R PerfectProbe™	5'–TCCTGGGTCCTGAGTAGAGA–3'	20	55,0	56,3	1071-1090 ² (εξ. 7)
Προϊόν PCR		103			

¹ στην καταγραφή NM_005046.3 (GenBank), ² στην καταγραφή NM_022046.4 (GenBank).

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl ανά δείγμα περιέχονταν 10 µl Gene Expression PCR MasterMix (Applied Biosystems, Life Technologies, USA), 1 µl διαλύματος εκκινητή PerfectProbe™, 4 µl νερού (UltraPure™ DEPC-treated H₂O, Invitrogen, Life Technologies, USA) και 5 µl διαλύματος cDNA που περιείχε 100 ng cDNA. Το πρωτόκολλο δύο βημάτων PerfectProbe™ περιλαμβάνει ένα βήμα ενζυμικής ενεργοποίησης στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενο από 50 κύκλους όπου έχουμε: αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση και συλλογή δεδομένων στους 50°C για 30 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα. Τα γονίδια-στόχοι *KLK7* και *KLK14* καθώς και το γονίδιο αναφοράς *CYC1* ενισχύθηκαν σε ξεχωριστές αντιδράσεις, εις τριπλούν για κάθε δείγμα και υπολογίστηκε η μέση τιμή του οριακού κύκλου ενίσχυσης C_T για κάθε γονίδιο-στόχο. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *CYC1* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* στα δείγματα και στην καρκινική κυτταρική σειρά HT29, η οποία ήταν ο βαθμονομητής.

3.2.7.3. ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ C_T (2^{-ΔΔCT})

Η έκφραση mRNA των *KLK7* και *KLK14* προσδιορίστηκε με σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantitation) με τη χρήση της συγκριτικής μεθόδου 2^{-ΔΔCT} (comparative method), όπως αυτή περιγράφηκε από τους Livak και Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001). Η καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HT-29, στην οποία εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα και τα δυο γονίδια, χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα βαθμονόμησης για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των δυο γονιδίων στα δείγματα.

Η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης κάθε γονιδίου-στόχου πραγματοποιήθηκε μέσω σύγκρισης των οριακών κύκλων (C_T) ενίσχυσης του κάθε γονιδίου-στόχου με τον οριακό κύκλο ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς ($CYC1$), τόσο στα δείγματα και όσο και στον βαθμονομητή. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η διαφορά (ΔC_T) της έκφρασης του γονιδίου-στόχου από την έκφραση του γονιδίου αναφοράς σε κάθε δείγμα και στον βαθμονομητή και στη συνέχεια υπολογίστηκε η διαφορά μεταξύ των δυο διαφορών ($\Delta\Delta C_T$), του δείγματος και του βαθμονομητή, σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους:

$$\Delta C_{T, \text{δείγματος}} = C_{T, \text{γονιδίου-στόχου}} - C_{T, \text{γονιδίου αναφοράς}}$$

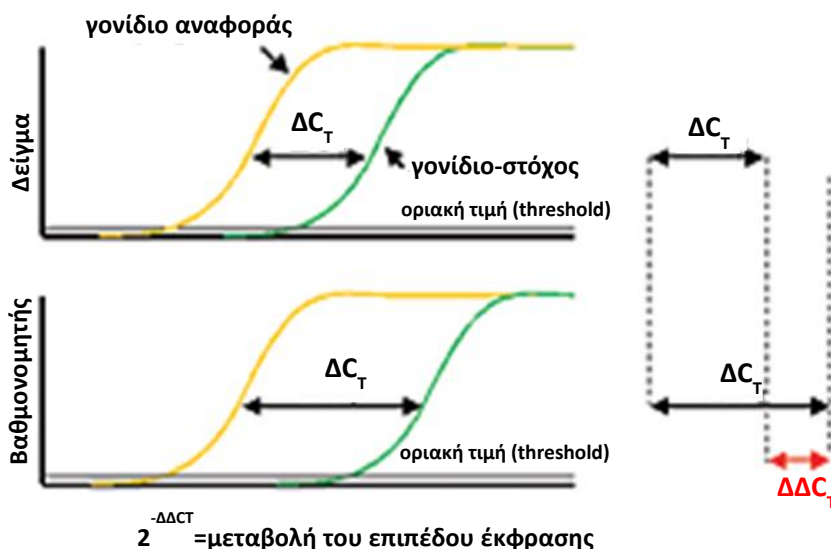
$$\Delta C_{T, \text{βαθμονομητή}} = C_{T, \text{γονιδίου-στόχου}} - C_{T, \text{γονιδίου αναφοράς}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T, \text{δείγματος}} - \Delta C_{T, \text{βαθμονομητή}}$$

Όταν η απόδοση (efficiency) της αντίδρασης PCR πλησιάζει το 1, η ποσότητα της έκφρασης του γονιδίου-στόχου κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς και σε σχέση με τον βαθμονομητή δίνεται από τον τύπο:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = RQ_{\text{δείγματος}}$$

Έτσι, η έκφραση κάθε γονιδίου μετρήθηκε σε μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantitation units, RQ units) ίσες με την τιμή $2^{-\Delta\Delta C_T}$ σε κάθε δείγμα. Η τιμή RQ για τον βαθμονομητή είναι $RQ_{(HT-29)}=1$.



Εικόνα 3.3. Αρχή του σχετικού προσδιορισμού της έκφρασης ενός γονιδίου με την συγκριτική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

3.2.7.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Επειδή δεν υπάρχει καθορισμένη τιμή ενός οριακού σημείου (cut-off point) για την κατηγοριοποίηση της έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* στον καρκίνο του παχέος εντέρου, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος X-tile για να προσδιοριστεί ένα βέλτιστο σημείο cut-off για κάθε γονίδιο, μετά από διόρθωση ως προς τη χρήση της στατιστικά ελάχιστης τιμής p (p -value) (Camp et al., 2004). Υπολογίστηκε ότι το βέλτιστο cut-off για την έκφραση του *KLK7* είναι 0,18 μονάδες RQ, ίσο με τη διάμεση τιμή της έκφρασης mRNA του *KLK7* στα δείγματα. Για την έκφραση του *KLK14* το βέλτιστο cut-off είναι 2,28 μονάδες RQ, ίσο με το 25^ο εκατοστημόριο της έκφρασης mRNA του *KLK14* στα δείγματα. Σύμφωνα με αυτά τα σημεία cut-off, η έκφραση mRNA των *KLK7* και *KLK14* σε κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε ως υψηλή ή χαμηλή, ανάλογα με το αν ήταν μεγαλύτερη ή μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή cut-off.

Η διαφορική έκφραση κάθε γονιδίου μεταξύ των πρωτοπαθών καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου (70 ζεύγη) αξιολογήθηκε με την στατιστική δοκιμασία Wilcoxon (Wilcoxon Signed Ranks test). Επίσης, διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης κάθε γονιδίου με ποιοτικές κλινικές και παθολογικές παραμέτρους των ασθενών (κατάσταση λεμφαδένων, βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο TNM της νόσου) χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία Fisher (Fisher's Exact test). Αναπτύχθηκαν μοντέλα λογιστικής μονομεταβλητής (univariate) και πολυμεταβλητής (multivariate) παλινδρόμησης, με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Έτσι, εκτιμήθηκε η σχέση μεταξύ κάθε δυνητικού δείκτη πρόγνωσης (έκφραση mRNA *KLK7* και *KLK14*) καθώς και άλλων κλινικών και παθολογικών παραμέτρων (βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο TNM, μέγεθος όγκου) με τον αναλογικό κίνδυνο (Hazard ratio, HR) εμφάνισης υποτροπής ή θανάτου των ασθενών. Η μονομεταβλητή ανάλυση εκτιμά αν υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης mRNA του *KLK7* και του *KLK14* καθώς και άλλων κλινικών και παθολογικών παραμέτρων (βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο TNM, μέγεθος όγκου) με το χρόνο επιβίωσης (DFS ή OS) των ασθενών με καρκίνο. Η πολυμεταβλητή ανάλυση εξετάζει συγχρόνως διάφορες ανεξάρτητες μεταβλητές: στην περίπτωσή μας την έκφραση mRNA κάθε γονιδίου με τον βαθμό αποδιαφοροποίησης του ιστού (grade), με το στάδιο TNM της νόσου, την κατάσταση των λεμφαδένων και το

μέγεθος του όγκου. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση περιελήφθησαν μόνο οι ασθενείς για τους οποίους υπήρχαν πλήρη στοιχεία για τις τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan–Meier (Kaplan, 1958) για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και την ολική επιβίωση (OS) των ασθενών που εμφάνισαν υψηλή ή χαμηλή έκφραση του κάθε γονιδίου. Με τη δοκιμασία Wilcoxon Signed log – rank έγινε σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των υποομάδων των ασθενών.

Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA κάθε γονιδίου με το είδος του ιστού – καρκινικού ή αδενωματώδους – υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney. Επίσης, με τον συντελεστή συσχέτισης του Spearman (Spearman's correlation coefficient) αξιολογήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA των δυο γονιδίων στα τρία είδη ιστού παχέος εντέρου: καρκινώματα, αδενώματα και φυσιολογικούς ιστούς.

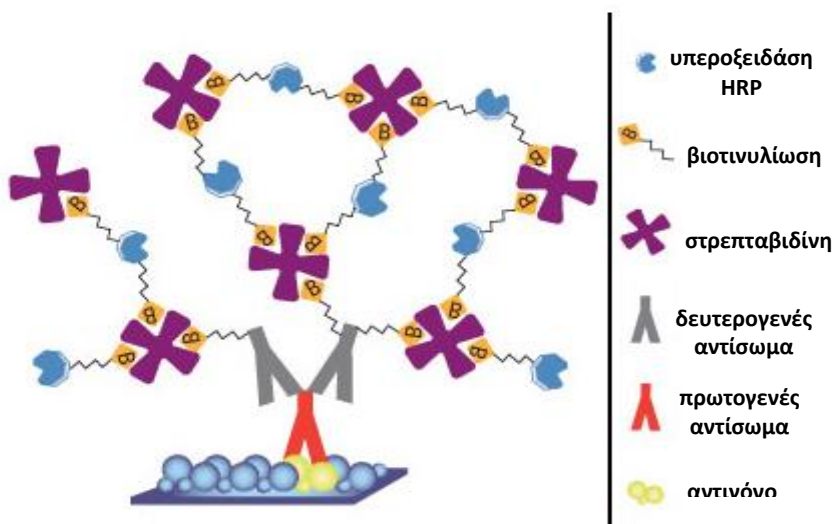
Για την εκτίμηση της ικανότητας ενός μοριακού δείκτη να διακρίνει τους διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους (discriminatory value) χρησιμοποιείται η ανάλυση ROC (Receiver Operating Characteristic, ROC). Η ανάλυση ROC βασίζεται στην κατασκευή καμπυλών που απεικονίζουν τη σχέση μεταξύ ευαισθησίας (θετικό αποτέλεσμα στους πάσχοντες) και (1 – ειδικότητας) (αρνητικό αποτέλεσμα στους υγιείς) μιας διαγνωστικής μεθόδου (Σκορίλας, 2009). Εξετάστηκε η ικανότητα της έκφρασης mRNA του κάθε γονιδίου να διακρίνει μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού. Το εμβαδό της περιοχής που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη ROC (Area under curve, AUC) δείχνει την προγνωστική αξία ενός πιθανού μοριακού δείκτη. Η περιοχή AUC μπορεί να λάβει τιμές από 0 έως 1. Όσο οι τιμές τείνουν στο 1, τόσο σημαντικότερη θεωρείται η προγνωστική αξία του πιθανού δείκτη, δηλαδή μπορεί να προβλέψει το γεγονός με αποτελεσματικότητα. Οι περιοχές AUC αναλύθηκαν με τη μέθοδο Hanley και McNeil (Hanley and McNeil, 1982). Για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Οι υπολογισμοί έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 15.0.

3.2.8. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

3.2.8.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στόχος των ανοσοϊστοχημικών τεχνικών είναι η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αντιγόνων που βρίσκονται σε βιολογικά υλικά. Οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Στην άμεση ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιείται πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι σημασμένο. Στην έμμεση μέθοδο γίνεται σήμανση ενός δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο έχει παραχθεί σε άλλο είδος ζώου έναντι των ανοσοσφαιρινών του ζώου στο οποίο παράχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα.

Για τη μελέτη της κυτταρικής εντόπισης και της κατανομής των καλλικρεϊνών 7 και 14 στους ιστούς εφαρμόστηκε η μέθοδος της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας με το σύστημα στρεπταβιδίνης–βιοτίνης–υπεροξειδάσης. Το σύστημα αυτό βασίζεται στην ενδογενή τάση σύζευξης της βιταμίνης βιοτίνης με τη γλυκοπρωτεΐνη στρεπταβιδίνη, η οποία απομονώνεται από τον στρεπτόκοκκο *Streptomyces avidinii*. Εξαιτίας των τεσσάρων θέσεων δέσμευσης που διαθέτει η στρεπταβιδίνη, το σύστημα στρεπταβιδίνης–βιοτίνης–υπεροξειδάσης προκαλεί μεγάλη αύξηση του αντιγονικού σήματος, αφού σε κάθε αντιγονική θέση μπορούν να συνδεθούν πολλά μόρια βιοτινυλιωμένης υπερξειδάσης της αγριοραφανίδας (Horseradish peroxidase, HRP). Η βιοτινυλιωμένη υπερξειδάση HRP, συνδεόμενη μέσω της στρεπταβιδίνης στο βιοτυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα, ανιχνεύεται με χρωματική αντίδραση (Μαργαρίτης και συν., 2008). Στο ακόλουθο σχήμα φαίνεται η αρχή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου.



Εικόνα 3.4. Αρχή της μεθόδου της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας με το σύστημα υπερξειδάσης – στρεπταβιδίνης – βιοτίνης (Πηγή: ThermoScientific).

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει αρχικά την αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών με θέρμανση στους 60°C για 1 ώρα και στη συνέχεια με διαδοχικές διπλές εμβαπτίσεις 5 λεπτά σε λουτρά ξυλόλης και αιθανόλης διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (100%, 90% και 70%). Κατόπιν, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,001 M, pH 6,0 και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων επί 5 λεπτά για τρεις συνεχόμενες φορές, ενδιάμεσα στις οποίες προστέθηκε ποσότητα διαλύματος κιτρικού νατρίου προκειμένου να συμπληρωθεί όσο εξατμίστηκε κατά τη θέρμανση. Με αυτόν τον τρόπο έγινε η ανάκτηση της αντιγονικότητας των επιτόπων με αποκάλυψή τους (unmasking) πάνω στις τομές, όπου θα δεσμευτεί το πρωτογενές αντίσωμα. Η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης, η οποία περιέχεται στα υπεροξεισώματα των ιστών, παρεμποδίστηκε με εμβάπτιση σε λουτρό που περιέχει διάλυμα H₂O₂ 30% για 5 λεπτά και ακολούθησε ξέπλυμα των τομών σε λουτρό που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7,4 (phosphate buffered saline, PBS).

Σε κάθε τομή προστέθηκαν ξεχωριστά 200 μL διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος anti-KLK7 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε αραιώση 1:200 και anti-KLK14 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε αραιώση 1:400 για 1 ώρα. Ως πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από ορό κουνελιού (rabbit anti-human KLK7 και rabbit anti-human KLK14) έναντι των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14, τα οποία παράχθηκαν και ελέγχθηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Τορόντο, Καναδά και αποτελούν ευγενική παραχώρηση του Καθηγητή Ελευθέριου Π. Διαμαντή. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και προστέθηκε το αντιδραστήριο EnVision™/HRP DAKO ChemMate™ (Dako, Denmark) για 40 λεπτά, που περιέχει βιοτινυλωμένο δευτερογενές αντίσωμα και σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης – υπεροξειδάσης της αγριοραφανίδας (Horseradish peroxidase, HRP). Έτσι, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο που αποτελείται από το πρωτογενές αντίσωμα, το βιοτινυλωμένο δευτερογενές αντίσωμα, βιοτίνη, στρεπταβιδίνη και υπεροξειδάση HRP. Μετά από ξέπλυμα των τομών, προστέθηκαν 150 μL διαλύματος τετραϋδροχλωρικής 3,3 – διάμινο – βενζιδίνης (DAB σε substrate buffer, Dako, Denmark) σε αραιώση 1:50 για 10 λεπτά σε κάθε τομή. Η υπεροξειδάση HRP οξειδώνει το

υπόστρωμα DAB και παράγεται έγχρωμο προϊόν που καταπίπτει ως ίζημα με καφέ χρώμα. Με τον τρόπο αυτόν ανιχνεύεται η παρουσία του επιλεγμένου αντιγόνου (Boenisch, et al., 1989). Αφού ξεπλύθηκαν και πάλι με PBS, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό, αφυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε λουτρά αιθανόλης και ξυλόλης και καλύφθηκαν με κόλλα DPX και καλυπτρίδα.

Η μελέτη της κυτταρικής εντόπισης και η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε ποιοτικά με παρατήρηση των βαμμένων τομών σε μικροσκόπιο που διαθέτει ενσωματωμένο σύστημα ψηφιακής φωτογράφησης Nikon Eclipse E800. Φωτογραφήθηκαν επιλεγμένες περιοχές των τομών.

3.2.8.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την κλίμακα 0-3+ ως αρνητική (0-1+, καθόλου ή χαμηλή έκφραση) ή ως θετική (2-3+, μέτρια ή υψηλή έκφραση). Για τα ποιοτικά αποτελέσματα της έκφρασης των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14 σε τομές καρκίνου παχεός εντέρου διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις τους με ορισμένες ποιοτικές κλινικο-παθολογικές παραμέτρους (μέγεθος όγκου, κατάσταση λεμφαδένων, βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο TNM της νόσου) χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία Fisher (Fisher's Exact test).

Με το μοντέλο μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου του Cox (Cox proportional hazard regression model) (Cox, 1972) εκτιμήθηκε η πιθανή σχέση μεταξύ κάθε δυνητικού δείκτη πρόγνωσης (KLK7 και KLK14) και του σχετικού κινδύνου (Hazard ratio, HR) εμφάνισης υποτροπής ή θανάτου των ασθενών. Στην μονομεταβλητή ανάλυση εκτιμάται αν υπάρχει συσχέτιση καθεμίας κλινικο-παθολογικής παραμέτρου με τον χρόνο επιβίωσης (DFS ή OS) των ασθενών. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση εξετάστηκαν συγχρόνως οι εξής ανεξάρτητες μεταβλητές: η έκφραση πρωτεΐνης κάθε γονιδίου με την κατάσταση των λεμφαδένων, το βαθμό αποδιαφοροποίησης του ιστού (grade), το στάδιο TNM της νόσου και το μέγεθος του όγκου. Στην ανάλυση αυτήν περιελήφθησαν μόνον οι ασθενείς για τους οποίους υπήρχαν πλήρη στοιχεία για τις τιμές των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Επιπλέον, έγινε ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan–Meier με την κατασκευή καμπυλών ελεύθερης νόσου επιβίωσης (DFS) και ολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών

που είχαν υψηλή ή χαμηλή έκφραση του κάθε γονιδίου. Για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Οι υπολογισμοί έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 15.0.

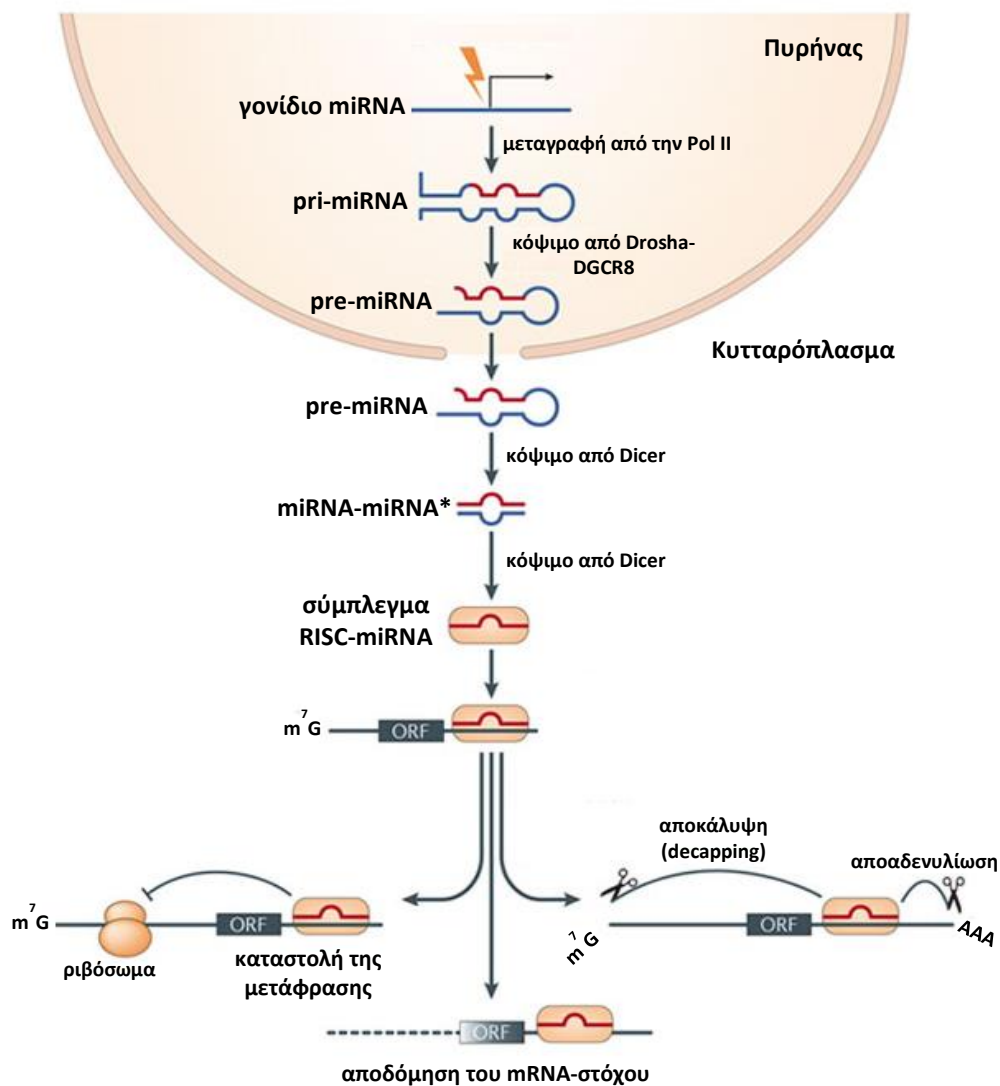
3.2.9. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ RNA

3.2.9.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η παρεμβολή RNA (RNAi), που ονομάζεται και μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (Post-transcriptional gene silencing, PTGS), είναι ένας φυσιολογικός ενδογενής, εξαιρετικά συντηρημένος εξελικτικά, μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στα θηλαστικά και στον άνθρωπο που οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων, με αποτέλεσμα να μην συντίθεται η αντίστοιχη πρωτεΐνη (Bender, 2014).

Τα γονίδια των μικρών RNAs (microRNAs, miRNAs) μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II για να σχηματίσουν ένα 5'-καλυμμένο (5'-capped) και πολυαδενυλιωμένο μετάγραφο. Το πρωτογενές αυτό μετάγραφο (pri-miRNA) έχει διαμόρφωση φουρκέτας και κόβεται ενζυμικά από το σύμπλεγμα της RNase III Drosha με τον παράγοντα DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8, DGCR8) και άλλους συμπαράγοντες, δημιουργώντας ένα πρόδρομο μόριο miRNA (pre-miRNA) με μορφή φουρκέτας μήκους περίπου 70 νουκλεοτιδίων. Το πρόδρομο pre-miRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου κόβεται και πάλι ενζυμικά από το ένζυμο Dicer της οικογένειας των RNAσών III. Έτσι, δημιουργείται ένα «ατελές» δίκλωνο μόριο miRNA μήκους 21 – 22 bp, το οποίο δεν έχει πλήρη συμπληρωματικότητα των δυο κλώνων του. Παρόλο που και οι δυο κλώνοι μπορούν να δράσουν ως λειτουργικά miRNAs, μόνο ο ένας συνήθως ενσωματώνεται στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της νουκλεάσης RISC (RNA-induced silencing complex) και αναγνωρίζει το στόχο του, που είναι κάποια αλληλουχία RNA μήκους 2-7 νουκλεοτιδίων. Το σύμπλεγμα RISC-miRNA υβριδοποιείται λόγω συμπληρωματικότητας αλληλουχίας της 5' περιοχής («seed region») του ώριμου miRNA στο μόριο mRNA-στόχο, κυρίως σε αλληλουχίες που βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή του. Η σύνδεση του miRNA με το mRNA-στόχο έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μετάφρασης πριν ή μετά την πρόσδεση του ριβοσώματος ή τον κατακερματισμό του mRNA από τη νουκλεάση του RISC. Όλοι οι τρόποι έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη μείωση ή απώλεια της έκφρασης

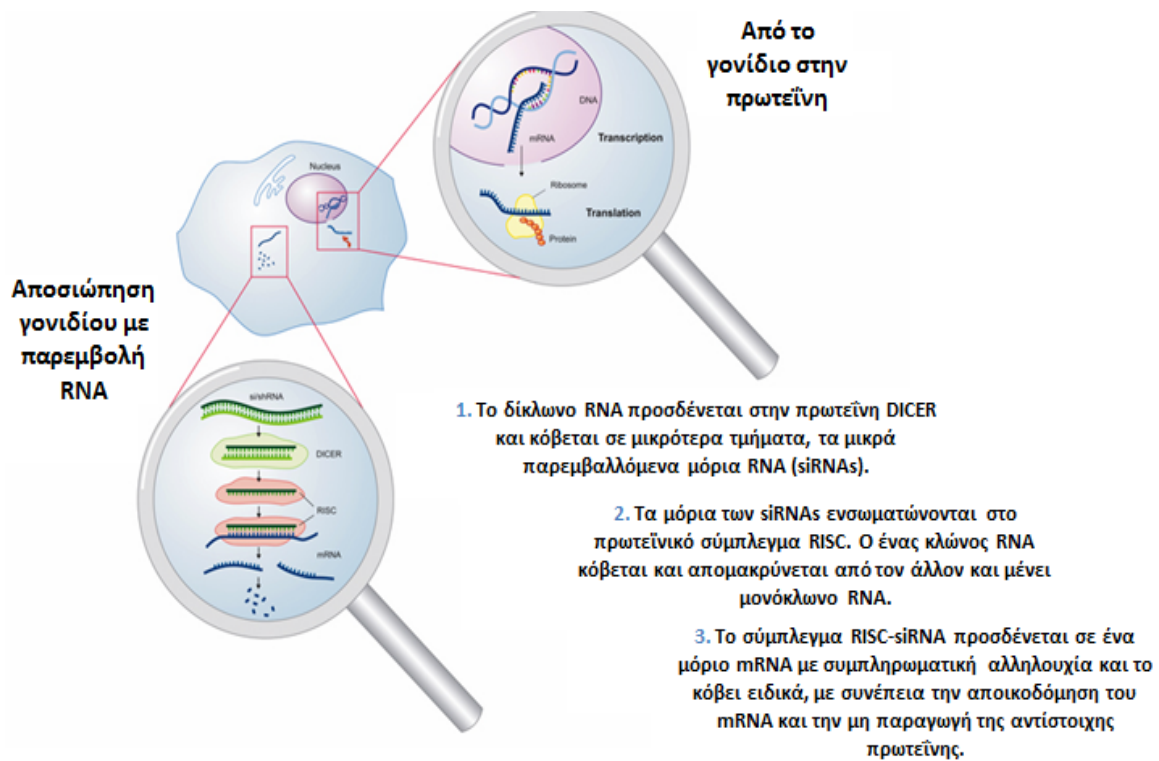
της αντίστοιχης πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό (Bartel, 2004; Meister and Tuschl, 2004; Rooij and Olson, 2012). Ο ενδογενής μηχανισμός λειτουργίας των miRNAs φαίνεται στην Εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5. Βιογένεση και μηχανισμός δράσης των miRNAs. m⁷G: κάλυμμα 7-μεθυλογουανυλικού (τροποποιημένη μορφή της γουανωσίνης του 5' άκρου των mRNAs); ORF: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Rooij and Olson, 2012).

Η απόδειξη ότι ο μηχανισμός της παρεμβολής RNA υπάρχει ενδογενώς σε κύτταρα θηλαστικών έδωσε στους ερευνητές ένα πολύ σημαντικό εργαλείο με το οποίο μπορούν να καταστείλουν την έκφραση ενός επιλεγμένου γονιδίου χρησιμοποιώντας συνθετικά δίκλινα μόρια RNA, τα οποία κόβονται από τον ενδογενή μηχανισμό σε δίκλινα μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (small interfering RNAs, siRNAs). Η παρουσία αυτών των

δίκλωνων μορίων RNA εντός του κυττάρου ενεργοποιεί τη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω της οδού RNAi. Έτσι είναι δυνατή η μελέτη μιας σειράς βιολογικών παραμέτρων σε σχέση με την υπερ-έκφραση ενός γονιδίου-στόχου, καθώς και της πρωτεΐνης που αυτό εκφράζει. Η τεχνική RNAi με εισαγωγή συνθετικών δίκλωνων siRNAs σε καλλιεργούμενα ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.6.



Εικόνα 3.6. Αρχή της μεθόδου RNAi (Πηγή www.ip-right.org).

Στην παρούσα Διατριβή η αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης (gene silencing) έγινε με παροδική διαμόλυνση (transient transfection) καρκινικών κυττάρων με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (siRNAs) στην κυτταρική σειρά HCT 116 για το γονίδιο *KLK7* και στην κυτταρική σειρά DLD-1 για το γονίδιο *KLK14*. Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου επιλέχθηκαν για τη μελέτη της διηθητικής ικανότητας των κυττάρων *in vitro*, επειδή υπερ-εκφράζουν τα αντίστοιχα γονίδια. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής siRNAs: siGENOME human *KLK7* siRNA SMARTpool®, siGENOME human *KLK14* siRNA SMARTpool® και siGENOME Non-targeting siRNA® (ThermoScientific, USA). Καθένα από

τα αντιδραστήρια που προαναφέρθηκαν αποτελεί μίγμα τεσσάρων διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων siRNA, τα οποία στοχεύουν στο ίδιο mRNA με σκοπό τη μέγιστη δυνατή αποσιώπηση της έκφρασης του κάθε γονιδίου. Ως δείγματα ελέγχου για τη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* που ακολούθησε, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν παροδικά με το αντιδραστήριο siGENOME Non-targeting siRNA®, το οποίο αποτελεί μίγμα μη στοχευόντων σε κανένα mRNA ολιγονουκλεοτιδίων siRNA. Για την εξασφάλιση της λειτουργικότητας των κυττάρων HCT 116 και DLD-1 που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* που περιγράφεται ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα κύτταρα.

Σε πιάτο 6 φρεατίων (6-well plate) καλλιεργήθηκαν 5×10^4 ζωντανά κύτταρα HCT 116 ή DLD-1 σε 2 mL πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM ανά φρεάτιο για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα αφαιρέθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 2 mL στείρου ρυθμιστικού διαλύματος PBS και προστέθηκαν σε αυτά 2,3 mL πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM. Σε 100 μ L θρεπτικού μέσου DMEM που δεν περιείχε ορό FBS ούτε αντιβιοτικά προστέθηκαν 300 ng siRNA (τελική συγκέντρωση siRNA 10 nM ανά φρεάτιο) και 12 μ L διαλύματος κατιονικών και ουδέτερων λιπιδίων HiPerFect (HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen, USA). Το διάλυμα αναδεύτηκε με vortex και επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστούν τα συμπλέγματα των λιπιδίων με τα ολιγονουκλεοτίδια των siRNAs. Στη συνέχεια, προστέθηκε το διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων siRNAs στάγδην σε κάθε φρεάτιο καλλιέργειας. Τα κύτταρα HCT 116 επώαστηκαν για 48 ώρες, ενώ τα κύτταρα DLD-1 επώαστηκαν για 24 ώρες με το διάλυμα των siRNAs σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO₂.

Σε κάθε πείραμα διαμολύνθηκαν κύτταρα HCT 116 επιστρωμένα σε τρία φρεάτια με *KLK7* siRNAs και σε άλλα τρία φρεάτια με Non-targeting siRNAs. Ομοίως, σε κάθε πείραμα διαμολύνθηκαν κύτταρα DLD-1 επιστρωμένα σε τρία φρεάτια με *KLK14* siRNAs και σε άλλα τρία φρεάτια με Non-targeting siRNAs. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

3.2.9.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14*

Ο έλεγχος του ποσοστού καταστολής της έκφρασης του κάθε γονιδίου στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν παροδικά με siRNAs έγινε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real time qPCR) σε επίπεδο mRNA και με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε επίπεδο παραγόμενης πρωτεΐνης. Ο έλεγχος καταστολής της έκφρασης με real time qPCR έγινε με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA των γονιδίων στα δείγματα των ιστών και έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

α. Λύση κυττάρων και απομόνωση ολικής πρωτεΐνης

Η λύση των κυττάρων έγινε με 200 – 400 μ L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που περιείχε 0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M NaCl, 0,0025 M $MgCl_2$, 10% γλυκερόλη, απορρυπαντικό 1% NP-40 και αναστολείς πρωτεασών (cOmplete® Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Το κυτταρόλυμα ομογενοποιήθηκε περαιτέρω με τη βοήθεια σύριγγας 1 mL 18G και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα, ώστε να κατακρημνιστούν τα μεμβρανώδη κυτταρικά συστατικά. Το υπερκείμενο περιείχε την ολική πρωτεΐνη.

β. Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 στις πρωτεΐνες σε όξινα υδατικά διαλύματα, η οποία οδηγεί στην δημιουργία σταθερού έγχρωμου προϊόντος που παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Το προϊόν σχηματίζεται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 2 λεπτά) και είναι σταθερό απουσία φωτός για 60 λεπτά περίπου. Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η μεγάλη ευαισθησία της, η εξοικονόμηση χρόνου που προσφέρει καθώς και η ανοχή της σε άλλες χημικές ουσίες που συχνά εμπεριέχονται στα κυτταρικά εκχυλίσματα (π.χ. αναγωγικοί παράγοντες) (Bradford, 1976).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός πρωτεϊνικού διαλύματος γίνεται μέσω σύγκρισης με πρότυπη καμπύλη, η οποία αναπαριστά τις τιμές οπτικής πυκνότητας πρότυπων πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης ως συνάρτηση της

συγκέντρωσής τους. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγιναν διαδοχικά αυξανόμενες αραιώσεις (0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 0,9 mg/mL) ενός αρχικού πρότυπου διαλύματος αλβουμίνης βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 1% NP-40. Στα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα προστέθηκε 1,5 mL αντιδραστηρίου Bradford (Bradford reagent, BioRad, CA, USA), το μίγμα επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκιά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm.

γ. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS–πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS–πολυακρυλαμιδίου είναι ασυνεχής και αποτελείται από δυο διαδοχικά πήκτωμα: το πήκτωμα φόρτωσης του δείγματος (stacking gel) με περιεκτικότητα 5% ακρυλαμιδίου και το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel ή separating gel), το οποίο στην περίπτωσή μας είχε περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 10%. Κάθε πήκτωμα διαθέτει πόρους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από την αναλογία των συγκεντρώσεων μεταξύ του ακρυλαμιδίου και του συνδετικού παράγοντα bis-ακρυλαμίδιο. Για την παρασκευή των πηκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε μίγμα 30% ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου (BioRad, CA, USA) και 10% ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο, Sodium Dodecyl Sulfate, SDS). Επίσης, στα πηκτώματα προστέθηκε 10% υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, APS), το οποίο επάγει τον τρισδιάστατο πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου για το σχηματισμό του πηκτώματος και τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED), η οποία δρα υποβοηθώντας τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα φόρτωσης, που περιέχει 1,5 M Tris-HCl pH 6,8, έχει μεγαλύτερους πόρους και εξυπηρετεί τη «συμπύκνωση» του δείγματος σε μια λεπτή ζώνη πολυπεπτιδίων, ώστε να εξασφαλιστεί η ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδός τους στο πήκτωμα διαχωρισμού και να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Το πήκτωμα διαχωρισμού έχει μικρότερους πόρους και περιέχει 1 M Tris-HCl pH 8,8.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εντός ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης pH 8,3, που περιείχε 0,025 M Tris base, 0,192 M Γλυκίνη και 0,1% (w/v) SDS. Πριν τη φόρτωση στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος, έγινε προετοιμασία των

δειγμάτων με την προσθήκη διαλύματος Laemmli 6x, το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, ώστε όλες να κινούνται προς την άνοδο του ηλεκτρικού πεδίου. Το διάλυμα Laemmli 6x περιείχε 10% (w/v) SDS, 36% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.35 M Tris-HCl, pH 6,8 και 0.005% (w/v) Μπλε της βρωμοφαινόλης. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 98°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Μετά την επεξεργασία, 14 μL δείγματος που περιείχε 25 μg πρωτεΐνης φορτώθηκαν στις ειδικές θέσεις του πήκτωματος και ηλεκτροφορήθηκαν ταυτόχρονα με πρότυπα μοριακών βαρών (Prestained protein marker, Nippon Genetics Europe), ώστε να προσδιοριστεί το μέγεθός τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας στο πήκτωμα ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης 15 mA για 1½ ώρα στη συσκευή mini PROTEAN III cell (BioRad, CA, USA), η οποία συναρμολογήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

δ. Ημι-ξηρή μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρώση Ponceau S

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και αφού απομακρύνθηκε το πήκτωμα φόρτωσης, έγινε ημι-ξηρή μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran® nitrocellulose membranes - Whatman®, Sigma-Aldrich, USA). Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν εξαιτίας του SDS που περιέχεται στο διάλυμα Laemmli και κινούνται προς την άνοδο, όπου έχει τοποθετηθεί η μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, το πήκτωμα διαχωρισμού εφαρμόστηκε σε επαφή με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, εκατέρωθεν των οποίων τοποθετήθηκαν 3 φίλτρα Whatman 3M σε κάθε πλευρά, εντός ρυθμιστικού διαλύματος ημι-ξηρής μεταφοράς που περιείχε 0,038 M Γλυκίνη, 0,05 M Tris base, 20% (v/v) μεθανόλη και 0,04% SDS pH 8,0-9,0 σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (BioRad Laboratories, USA). Εφαρμόστηκε σταθερή ένταση ρεύματος 1,5 mA/cm² επιφάνειας μεμβράνης για 1 ώρα.

Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίστηκε σε διάλυμα Ponceau S, που περιείχε 2% (w/v) χρωστικής Ponceau S σε 30% (v/v) τριχλωρο-οξικό οξύ, για 1 λεπτό υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση της μεμβράνης εξυπηρετεί τον έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών και το ισόποσο

φόρτωμα των δειγμάτων. Κατόπιν, η μεμβράνη αποχρωματίστηκε σταδιακά με πλύσεις υπό ανάδευση σε απεσταγμένο νερό.

ε. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Με την ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) εντοπίζονται οι επίτοποι μιας πρωτεΐνης, αφού προσδεθεί σε αυτούς ειδικό αντίσωμα. Η τεχνική αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της υψηλής αναλυτικής ικανότητας της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυμικών μεθόδων.

Αρχικά, καλύφθηκαν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος με επώαση της μεμβράνης σε πρωτεϊνικό διάλυμα 5% (w/v) άπαχου γάλακτος σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween [TBS: 0,025 M Tris-HCl, 0,137 M NaCl και 0,0027 M KCl, pH 7,4 και 0,1% (v/v) απορρυπαντικό Tween-20] για 30 λεπτά υπό ανάδευση. Κατόπιν, η μεμβράνη επώαστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα που δεσμεύεται ειδικά στους επιτόπους της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Για τον εντοπισμό των καλλικρεϊνών 7 και 14 στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος σε 5% (w/v) διαλύματος άπαχου γάλακτος με αραιώση 1:200 για την KLK7 και 1:1000 για την KLK14 για 16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Ως πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από ορό κουνελιού (rabbit anti-human KLK7 και rabbit anti-human KLK14) έναντι των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14, τα οποία παράχθηκαν και ελέγχθηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Τορόντο Καναδά και αποτελούν ευγενική παραχώρηση του Καθηγητή Ελευθέριου Π. Διαμαντή.

Αφού η μεμβράνη ξεπλύθηκε 3 φορές για 10 λεπτά κάθε φορά υπό ανάδευση με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween, επώαστηκε στη συνέχεια για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε αραιώση 1:10.000 σε 5% (w/v) άπαχο γάλα, το οποίο έχει τη σύσταση που περιγράφηκε προηγουμένως. Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κασίκας έναντι ορού κουνελιού συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας HRP (Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate, BioRad Laboratories, USA), το οποίο δεσμεύεται στη σταθερή περιοχή Fc του πρωτογενούς αντισώματος. Το ένζυμο υπεροξειδάση HRP του δευτερογενούς αντισώματος αντιδρά με υπόστρωμα, το οποίο περιέχεται στο σύστημα αντιδραστηρίων

ECL plus (ECL plus Western blotting substrate, Pierce, ThermoScientific, USA) και παράγει σήμα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

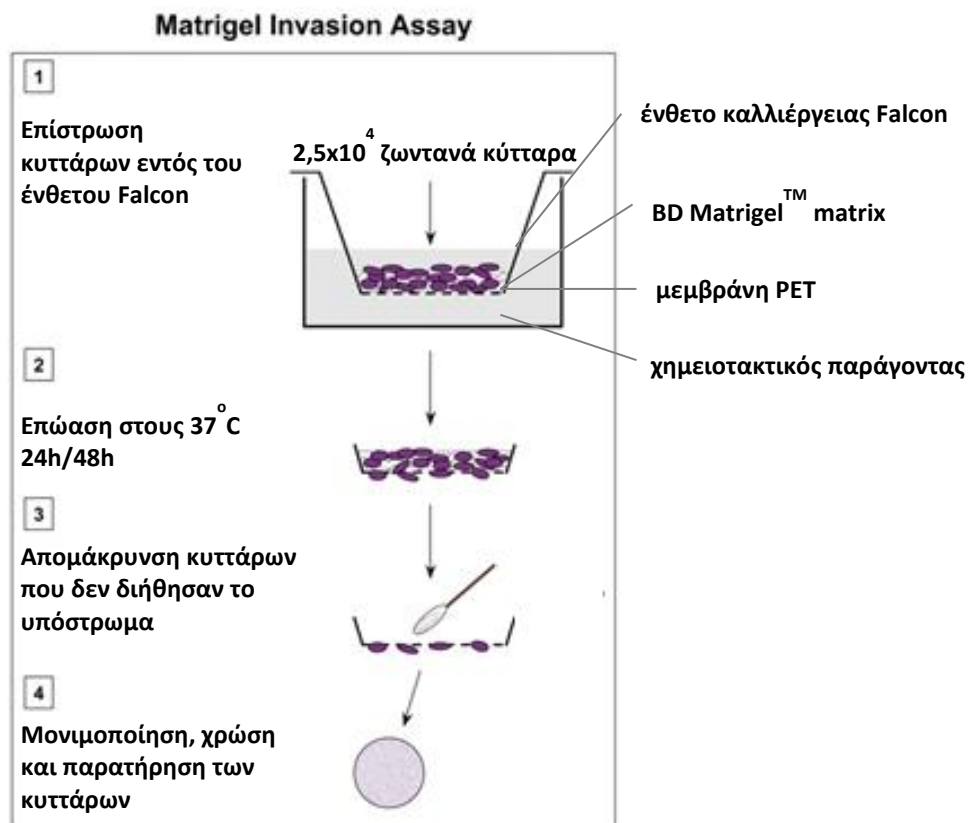
Μετά από 3 πλύσεις της μεμβράνης για 10 λεπτά κάθε φορά υπό ανάδευση σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween, έγινε η ανίχνευση του σήματος σε ειδικό φιλμ (Fuji Medical Xray Film, Fujifilm, Japan) με διαφορετικούς χρόνους έκθεσης, ώστε να προκύψει ευκρινής εικόνα και εμφάνιση στη συσκευή Kodak X-OMAT 1000 Processor (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

3.2.10. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN VITRO*

3.2.10.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μελέτη του διηθητικού δυναμικού *in vitro* των καρκινικών κυττάρων δίνει ένα μετρήσιμο αποτέλεσμα της ικανότητας των κυττάρων να διαπερνούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, λειτουργία απαραίτητη για τη μετάσταση. Χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό υπόστρωμα Growth Factor Reduced (GFR) MatrigelTM Matrix (BD BioCoatTM, Becton Dickinson Biosciences, CA, USA), η σύσταση του οποίου προσομοιάζει στην βασική μεμβράνη των ιστών. Περιέχει τις πρωτεΐνες λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου IV, εντακτίνη, την πρωτεογλυκάνη θειική ηπαράνη, τον αυξητικό παράγοντα TGFβ και άλλα συστατικά, αλλά δεν περιέχει τους αυξητικούς παράγοντες EGF, PDGF και IGF-1, οι οποίοι έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως *in vitro* φραγμός για την εκτίμηση των μεταστατικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων.

Κάθε δοκιμασία πραγματοποιήθηκε εντός ειδικού ένθετου Falcon (Falcon cell culture insert) επικαλυμμένου με μεμβράνη τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου (polyethylene terephthalate, PET) με πόρους μεγέθους 8 μm. Κάθε μεμβράνη PET έχει μια λεπτή στρώση GFR MatrigelTM Basement Membrane Matrix που λειτουργεί ως φραγμός, αποφράσσοντας τους πόρους της μεμβράνης και εμποδίζοντας τα μη-μεταστατικά κύτταρα να την διαπεράσουν. Ωστόσο, τα κύτταρα που διηθούν την μεμβράνη, σε απόκριση στην παρουσία θετικού χημειοτακτικού παράγοντα (θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS) κάτω από το ένθετο Falcon, είναι ικανά να αποκολληθούν από αυτήν και τελικά να μεταναστεύσουν μέσω του υποστρώματος MatrigelTM και των πόρων 8 μm.



Εικόνα 3.7. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης BD BioCoat Matrigel™ Invasion Chamber [1] και των βημάτων που ακολουθήθηκαν [2, 3, 4] στη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* (Invasion Assay).

Στο εσωτερικό των ειδικών ένθετων Falcon (Falcon cell culture inserts) προστέθηκαν 500 μL θερμού (37°C) θρεπτικού μέσου καλλιέργειας DMEM που δεν περιείχε ορό FBS, για 2 ώρες στους 37°C, προκειμένου να ενυδατωθεί η μεμβράνη που είναι επιστρωμένη με το Matrigel™. Από τα διαμολυσμένα κύτταρα που είχαν ήδη καλλιεργηθεί σε πυκνότητα 70-80%, ποσότητα $2,5 \times 10^4$ ζωντανά κύτταρα/500 μL DMEM που περιείχε 0,1% αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) προστέθηκε σε κάθε ένθετο πηγάδι. Τα ένθετα πηγάδια τοποθετήθηκαν εντός φρεατίων (σε πιάτο 24 φρεατίων), τα οποία περιείχαν 750 μL θρεπτικού μέσου DMEM με 10% FBS ως θετική χημειοτακτική ουσία. Κατόπιν επώασης 48 ωρών για τα κύτταρα HCT 116 και 24 ωρών για τα κύτταρα DLD-1, απομακρύνθηκαν από την εσωτερική πλευρά του ένθετου όσα κύτταρα δεν είχαν διηθήσει την μεμβράνη, με τη χρήση βαμβακερής μπατονέτας. Στην εξωτερική πλευρά του ένθετου βρίσκονταν τα κύτταρα που κατάφεραν να διαπεράσουν τη μεμβράνη και τα οποία αρχικά μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA) και στη συνέχεια βάφτηκαν με αιματοξυλίνη.

Τα βαμμένα κύτταρα φωτογραφήθηκαν και καταμετρήθηκαν σε μικροσκόπιο Nikon TE σε μεγέθυνση 100x στο κεντρικό οπτικό πεδίο των ένθετου. Σε κάθε πείραμα η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε κατηγορία διαμολυσμένων κυττάρων και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές, ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία τους και να εξαχθούν μετρήσεις για στατιστική επεξεργασία.

3.2.10.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ποσοστά διήθησης του υποστρώματος GFR Matrigel™ ως προς την διήθηση στα δείγματα ελέγχου. Το σχετικό ποσοστό διήθησης για κάθε πείραμα υπολογίστηκε από το λόγο:

$$\% \text{ Σχετική Διήθηση} = \frac{\text{μέση τιμή αριθμού διαμολυσμένων κυττάρων που διαπέρασαν τη μεμβράνη GFR Matrigel}}{\text{μέση τιμή αριθμού διαμολυσμένων κυττάρων ελέγχου που διαπέρασαν τη μεμβράνη GFR Matrigel}} \times 100$$

Αφού υπολογίστηκε η % σχετική διήθηση αξιολογήθηκε η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων με τη στατιστική δοκιμασία Student's t-test. Οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

3.2.11. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η Πρωτεομική ανάλυση (Proteomic analysis) του συνόλου των πρωτεϊνών (proteome) ενός κυτταρικού εκχυλίσματος με τη μεθοδολογία της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (nano-ultra High Performance Liquid Chromatography, nanoUHPLC), της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS/MS) και της Βιοπληροφορικής ανάλυσης που ακολουθεί, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της αφθονίας, των πιθανών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και των αλληλεπιδράσεων των χιλιάδων πρωτεϊνών που αυτό περιέχει. Αυτή η αλληλουχία τεχνικών είναι η ενδεδειγμένη για την Πρωτεομική ανάλυση, σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες (Molecular and Cellular Proteomics). Η πρόοδος που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στην Πρωτεομική ανάλυση με τη χρήση της μεθοδολογίας LC-MS/MS, έχει αντικαταστήσει τις πρότερες μεθόδους, όπως η επίπονη

ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και έχει καθιερωθεί ως η επιλεγμένη μεθοδολογία για τη μελέτη πρωτεϊνών (Meissner & Mann, 2014). Η Πρωτεομική ανάλυση προσφέρει πλεονέκτημα στη μελέτη του βιολογικού ρόλου ενός γονιδίου σε σύγκριση με την ανάλυση της λειτουργίας του στο επίπεδο του mRNA, καθώς πολλές φορές τα επίπεδα mRNA δεν είναι αντίστοιχα των επιπέδων της πρωτεΐνης, η οποία τελικά ασκεί τη βιολογική λειτουργία (Walther & Mann, 2010).

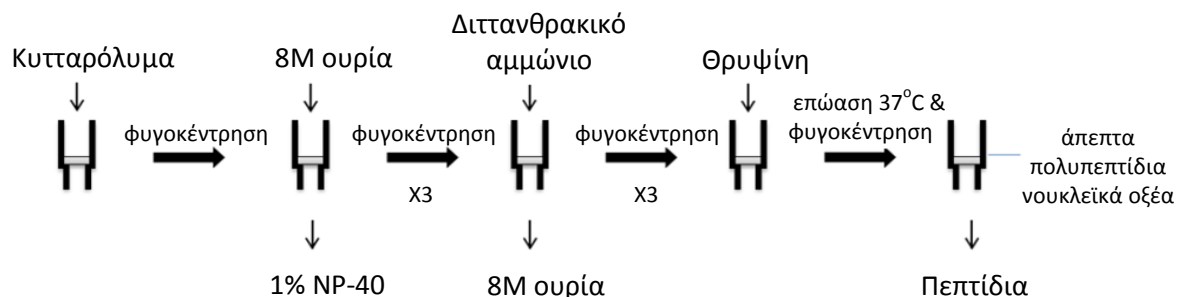
Τα κυτταρολύματα από τη λύση των κυττάρων HCT 116 που είχαν διαμολυνθεί με *KLK7* siRNAs και Non-targeting siRNAs αναλύθηκαν με τη μεθοδολογία της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και της φασματομετρίας μάζας (nano-ultra HPLC-MS/MS) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με αλγορίθμους Βιοπληροφορικής.

3.2.11.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΦΙΛΤΡΟΥ

Τα κυτταρολύματα που προήλθαν από τη λύση των κυττάρων HCT 116 που είχαν διαμολυνθεί με *KLK7* siRNAs και από εκείνα που είχαν διαμολυνθεί με Non-targeting siRNAs και χρησίμευσαν ως μάρτυρες, εκτέθηκαν σε υπερηχητικά κύματα (sonication) με σκοπό τη διάσπαση των μορίων DNA. Ακολούθησε αποδιατακτική κατεργασία με σκοπό την πέψη των πρωτεϊνών των αντίστοιχων κυτταρολυμάτων, των οποίων η συγκέντρωση είχε προσδιοριστεί με τη μέθοδο Bradford, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η προετοιμασία δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου (Filter-aided sample Preparation, FASP). Η χρήση φίλτρου χρησιμεύει στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων μορίων από το πρωτεϊνικό δείγμα, όπως άλατα και μόρια απορρυπαντικών ουσιών, τα οποία είτε παρεμποδίζουν την πρωτεολυτική πέψη του δείγματος είτε παρεμβάλλονται στην διαδικασία της φασματομετρίας μάζας. Οι πρωτεΐνες επαναδιαλύονται σε διαλύματα συμβατά με τις πρωτεολυτικές κατεργασίες που ακολουθούν. Το φίλτρο επιτρέπει τη διέλευση μορίων που έχουν μοριακό βάρος έως ένα συγκεκριμένο όριο (cut-off), έτσι ώστε αρχικά να συγκρατηθούν οι πρωτεΐνες για να γίνει η επεξεργασία και η πέψη τους και στη συνέχεια να διαπεράσουν το φίλτρο μόνο επιθυμητού μεγέθους πεπτίδια. Σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου FASP είναι ότι αποφεύγεται η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων των πρωτεϊνών (gel-free method), άρα είναι πιο σύντομη η διάρκεια της προετοιμασίας και το τελικό διάλυμα

πεπτιδίων είναι αρκετά καθαρό, χωρίς προσμίξεις, γεγονός που συμβάλλει στην εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων (Wiśniewski et al., 2009).



Εικόνα 3.8. Σχηματική απεικόνιση στους τεχνικής FASP για την προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος.

Σε 150 μg πρωτεΐνης κυτταρολύματος προστέθηκε 1 mL διαλύματος 8 M ουρίας σε 0,1 M Tris, pH 8,5, το οποίο αποδιατάσσει στους πρωτεΐνες και το μίγμα τοποθετήθηκε σε φίλτρο Vivacon 500 (Sartorius, Germany) με όριο το μοριακό βάρος έως 10 kDa. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με ενδιάμεση προσθήκη διαλύματος 8 M ουρίας σε 0,1 M Tris, pH 8,5, σε 14.000g για 20 λεπτά η καθεμία. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο φίλτρο 1 mL 0,05 M διττανθρακικού αμμωνίου και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με ενδιάμεση προσθήκη διαλύματος 0,05 M διττανθρακικού αμμωνίου, σε 14.000g για 20 λεπτά η καθεμία. Μετά στους πλύσεις αυτές, προστέθηκε στο φίλτρο διάλυμα 0,05 M διττανθρακικού αμμωνίου με θρυψίνη και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C. Την επόμενη μέρα έγινε φυγοκέντρηση σε 14.000g για 10 λεπτά και αφού προστέθηκαν 50 μL απεσταγμένου νερού (dH₂O) στο φίλτρο, έγινε και δεύτερη φυγοκέντρηση σε 14.000g για 10 λεπτά, ώστε να γίνει αποτελεσματικότερη έκλυση του θρυψινοποιημένου δείγματος (διάλυμα πεπτιδίων), του οποίου ο όγκος συμπυκνώθηκε με εξάτμιση σε συνθήκες κενού σε συσκευή SpeedVac και φυλάχθηκε στους -20°C.

3.2.11.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρήση του φασματογράφου μάζας προϋποθέτει το διαχωρισμό των πεπτιδίων που προκύπτουν από την πέψη των συστατικών του κυτταρολύματος πριν την εισαγωγή τους στον φασματογράφο, λόγω του ότι το κυτταρόλυμα είναι ένα πολυσύνθετο δείγμα αποτελούμενο από χιλιάδες πρωτεΐνες. Το διάλυμα πεπτιδίων που προκύπτει μετά την

προετοιμασία FASP αναλύεται αποτελεσματικότερα στον φασματογράφο μάζας LTQ – Orbitrap XL (ThermoScientific, USA) που χρησιμοποιήθηκε, μετά από διαχωρισμό των πεπτιδίων με την ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (nano Ultra High – Performance Liquid Chromatography, nanoUHPLC). Οι μέθοδοι nanoUHPLC και φασματομετρία μάζας (MS/MS) είναι οι πλέον συμβατές μεταξύ τους (LC-MS/MS) για την εξασφάλιση της μεγαλύτερης δυνατής ανάλυσης (resolution) στα φάσματα μάζας που προκύπτουν (Walther & Mann, 2010).

Τα πεπτίδια του δείγματος διαχωρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (nanoUHPLC) στη συσκευή Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) nano System UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA). Δείγμα 2,5 μg πεπτιδίων σε 0,1% μυρμηγκικό οξύ πέρασαν από τριχοειδή στήλη τύπου C18 και μήκους 50 cm με πολύ χαμηλή ταχύτητα ροής (200nL/min) για διάρκεια 8 ωρών. Τα πεπτίδια εκλούστηκαν από τη στήλη βάσει της υδροφοβικότητάς τους, μέσω της διαβάθμισης της συγκέντρωσης ενός διερχόμενου οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο από 2% ως 80%) ο οποίος αποτελεί την κινητή (υγρή) φάση της χρωματογραφίας. Τα περισσότερα υδρόφοβα πεπτίδια δεσμεύονται στη στήλη, ενώ τα λιγότερα υδρόφοβα εκλούνται σχεδόν αμέσως. Η συγκέντρωση των δειγμάτων των πεπτιδίων που εκλούστηκαν προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στα 280nm στη συσκευή NanoDrop 1000 με τη βοήθεια του λογισμικού ND-1000 v3.3.0 (NanoDrop Technologies Inc, DE, USA).

3.2.11.3. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

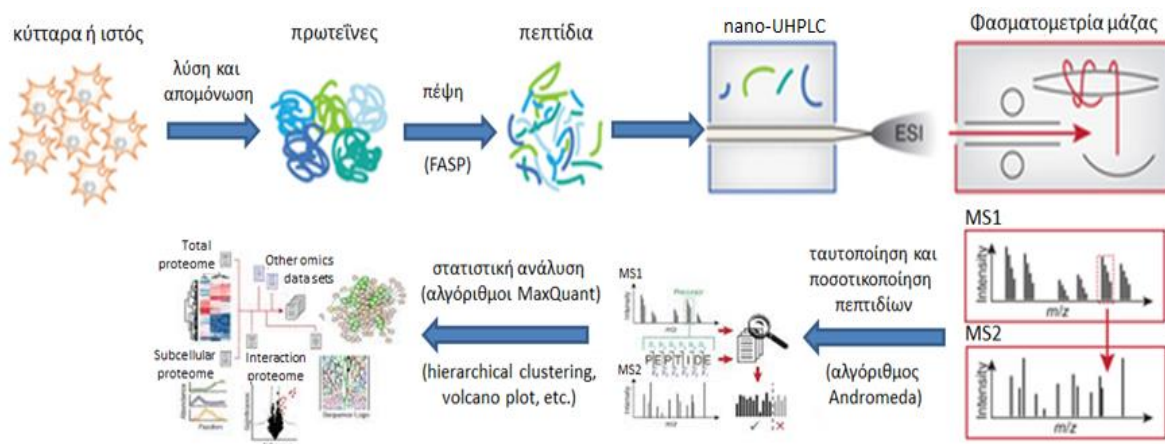
Η φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του λόγου μάζας/φορτίου (m/z) των πεπτιδίων που έχουν προηγουμένως ιονιστεί και τον διαχωρισμό της με βάση το λόγο αυτόν, ώστε να ταυτοποιηθούν ή/και να προσδιοριστούν ποσοτικά. Το φάσμα μαζών των πεπτιδίων, δηλαδή η γραφική παράσταση που απεικονίζει την ένταση του σήματος των ιόντων για της διάφορες τιμές m/z , δίνει πληροφορίες για την ταυτότητα των πρωτεϊνών από της οποίες προέρχονται και της τυχόν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της. Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από μια πηγή ιόντων, έναν αναλυτή και έναν ανιχνευτή. Η πηγή ιόντων προκαλεί τον ιονισμό των πεπτιδίων του δείγματος, ο αναλυτής διαχωρίζει τα ιόντα που

προέκυψαν με βάση το λόγο m/z και ο ανιχνευτής ανιχνεύει τα ιόντα και ενισχύει την απόκριση, ώστε να δώσει μετρήσιμο σήμα (Meissner & Mann, 2014).

Τα πεπτίδια που εκλούστηκαν από τη νανο-στήλη υπέστησαν ιονισμό με τη μέθοδο του νανο-ηλεκτροψεκασμού (nano-ElectroSpray Ionization, nano-ESI), κατά την οποία ο διαλύτης του δείγματος εξατμίστηκε στην άκρη της βελόνας ψεκασμού και τα πεπτίδια ιονίστηκαν με την εφαρμογή υψηλού ηλεκτρικού δυναμικού. Κατόπιν, το δείγμα εισήλθε στον φασματογράφο μάζας LTQ – Orbitrap XL (ThermoScientific, USA) σε συνθήκες κενού, προκειμένου με την εφαρμογή μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου να διαχωριστούν τα ιονισμένα πεπτίδια με βάση το λόγο m/z . Αρχικά έγινε καταγραφή του λόγου m/z όλων των ιονισμένων πεπτιδίων που ανιχνεύθηκαν (MS1) και στη συνέχεια τα πιο άφθονα ιόντα του δείγματος (που έδωσαν το πιο έντονο σήμα) αναλύθηκαν και από δεύτερο αναλυτή μάζας (MS2), αφού υπέστησαν κατακερματισμό. Ο κατακερματισμός επιτεύχθηκε με την τεχνική επαγωγής κατακερματισμού με σύγκρουση (Collision-induced Dissociation, CID) των ιόντων με αδρανή μόρια αερίου ηλίου εντός μιας ιοντο-παγίδας που διαθέτει ο φασματογράφος μάζας (Walther & Mann, 2010). Έτσι, καταγράφηκαν τελικά τα φάσματα μάζας διαδοχικής φασματομετρίας (MS/MS) και ακολούθησε η Βιοπληροφορική ανάλυση.

3.2.11.4. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τον φασματογράφο μάζας υπέστησαν επεξεργασία από τους αλγορίθμους MaxQuant, Andromeda (Max Planck Institute, Germany) και Thermo Proteome Discoverer 1.4, Sequest (ThermoScientific, USA), με σκοπό να αναζητηθούν οι αλληλουχίες που προέκυψαν σε βάσεις πρωτεϊνικών καταχωρήσεων (UniProt) και να ταυτοποιηθούν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις που εκφράστηκαν με βάση την ένταση του σήματος των ιονισμένων πεπτιδίων σε τιμές Label-free quantification (LFQ), με τη βοήθεια του προγράμματος Βιοπληροφορικής MaxQuant (Max Planck Institute, Germany). Το πρόγραμμα MaxQuant δίνει επίσης, τη δυνατότητα κανονικοποίησης των τιμών των αποτελεσμάτων με βάση την κανονική κατανομή Gauss.



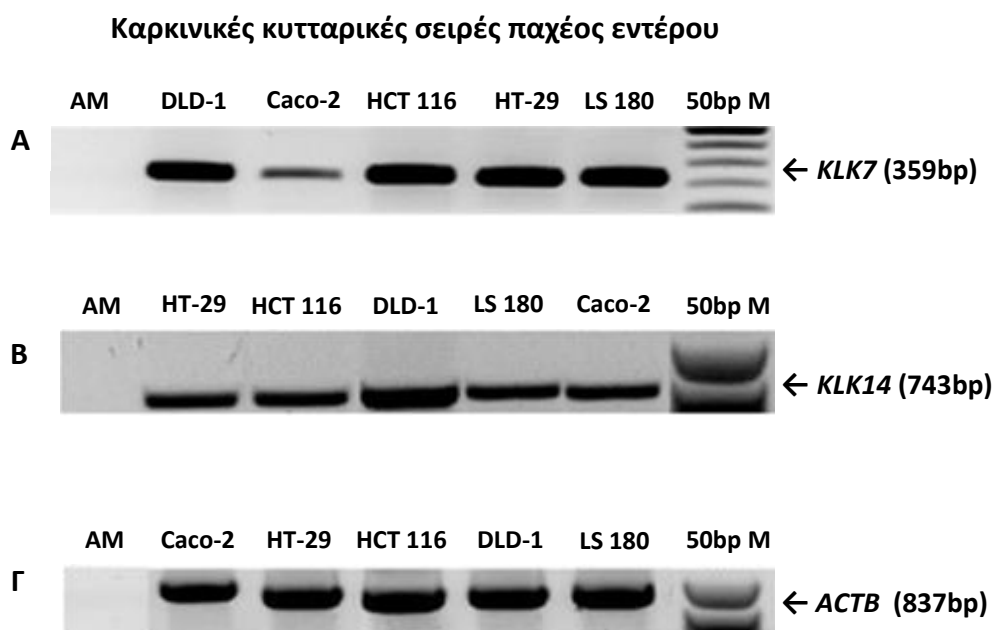
Εικόνα 3.9. Σχηματική παράσταση της αλληλουχίας των σταδίων της Πρωτεομικής ανάλυσης (LC-MS/MS) που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή.

Κάθε πείραμα στη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* (Invasion assay) επαναλήφθηκε τρεις φορές και κάθε δείγμα υπήρχε εις τριπλούν. Προσδιορίστηκαν όλα τα δείγματα που είχαν υποστεί διαμόλυνση RNAi στον φασματογράφο μάζας τρεις φορές, ώστε να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και να ακολουθήσει στατιστική επεξεργασία με τους αλγόριθμους Perseus. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που εμφάνισαν στατιστικά τη σημαντικότερη διαφορική έκφραση μεταξύ των δειγμάτων που είχαν διαμολυνθεί με *KLK7* siRNA και στους Non-targeting siRNA μάρτυρες, ομαδοποιήθηκαν σε κατηγορίες με βάση τις κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται (Gene Ontology – Biological Process). Η ομαδοποίηση αυτή εξυπηρετεί την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς τον πιθανό βιολογικό ρόλο των προσδιορισμένων πρωτεϊνών. Οι τιμές $p \leq 0,01$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές για την επιλογή των πρωτεϊνών που εμφάνισαν τη μέγιστη διαφορική έκφραση.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Καλλιεργήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου των σειρών HCT 116, DLD-1, HT-29, LS 180 και Caco2 και απομονώθηκε από αυτά ολικό RNA, το οποίο μελετήθηκε με ποιοτική RT-PCR χρησιμοποιώντας τα εξής εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια (primers): K7ex3F και K7ex5R για το γονίδιο *KLK7*, K14ex3F και K14ex7R για το γονίδιο *KLK14* και ACTB F και ACTB R για το γονίδιο αναφοράς *ACTB* (*β-Actin*) (Πίνακας 3.1). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδοποιούνται σε κοινή περιοχή των διαφόρων mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* και στο μοναδικό γνωστό mRNA του γονιδίου *KLK14*. Η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων στις επιλεγείσες κυτταρικές σειρές φαίνεται στις ακόλουθες φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης 1,5% (w/v).



Εικόνα 4.1. Έλεγχος της έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK7* (A), *KLK14* (B) και *ACTB* (Γ) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου. AM: αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O), 50 bp M: DNA Ladder 50 bp.

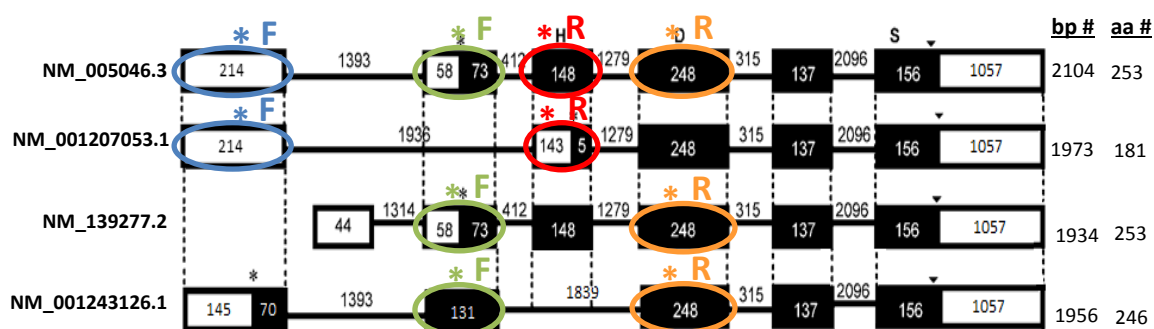
Σε όλες τις διαθέσιμες κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου που ελέγχθηκαν παρατηρήθηκε ότι εκφράζονται έντονα και τα δυο γονίδια σε επίπεδο mRNA, με εξαίρεση την σειρά Caco2 στην οποία το γονίδιο *KLK7* εκφράζεται ασθενέστερα.

4.2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14*

Στις κυτταρικές σειρές που προαναφέρθηκαν, καθώς και σε δεξαμενές cDNA (cDNA pools) δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου, μελετήθηκε η έκφραση των διαφορετικών mRNA μεταγράφων των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* με ημι-ποσοτική RT-PCR.

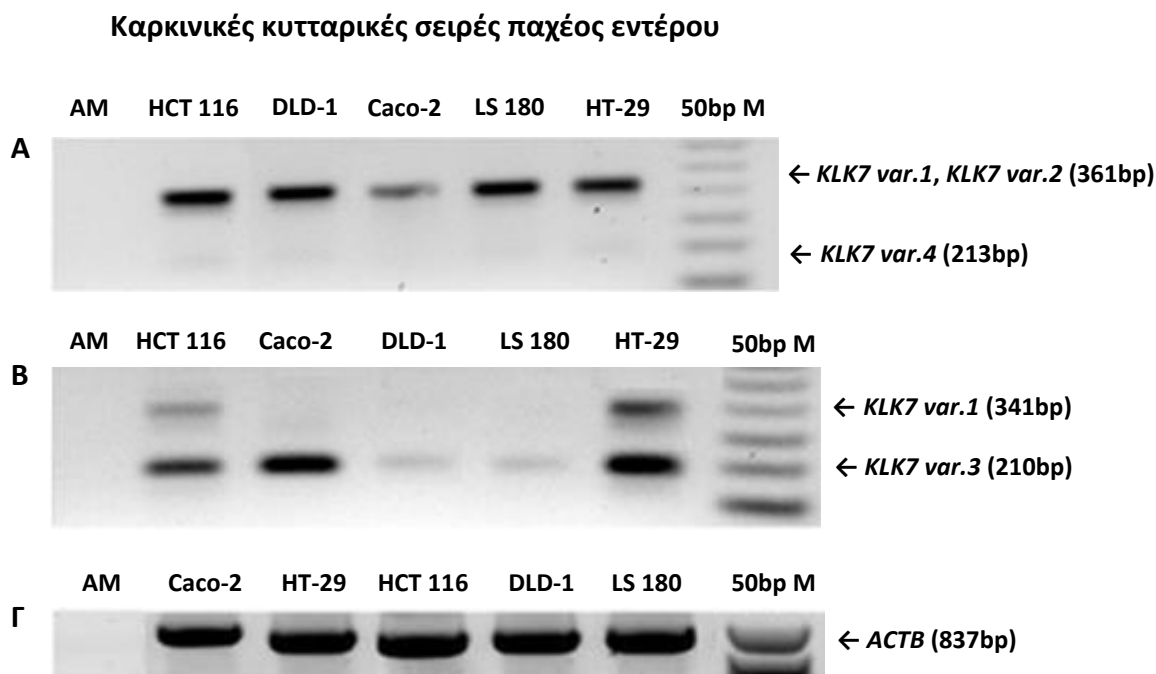
4.2.1. mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *KLK7*

Το γονίδιο *KLK7* αποτελείται από 6 εξώνια, κάποια από τα οποία λείπουν σε ορισμένα εναλλακτικά mRNA μετάγραφα του γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια (primers), τα οποία δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης των διαφορετικών *KLK7* mRNA μεταγράφων που παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 4.2 μαζί με τις θέσεις υβριδοποίησης των αντίστοιχων εκκινητών. Οι εκκινητές K7F1,2,4 και K7R1,2,4 υβριδοποιούνται στα εξώνια 2 και 4 αντίστοιχα και δίνουν μια κοινή ζώνη μήκους 361 bp για τα *KLK7* μετάγραφο 1 και 2 και μια ζώνη μήκους 213 bp για το *KLK7* μετάγραφο 4. Ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών, οι K7F1,3 και K7R1,3, υβριδοποιούνται στα εξώνια 1 και 3 αντίστοιχα και δίνουν μια ζώνη μήκους 341 bp για το *KLK7* μετάγραφο 1 και μια ζώνη μήκους 210 bp για το *KLK7* μετάγραφο 3. Ταυτόχρονα με την ενίσχυση των διαφόρων mRNA μεταγράφων, ενισχύθηκε και το γονίδιο αναφοράς *ACTB* (β -Actin), με βάση την έκφραση του οποίου ημι-ποσοτικοποιήθηκε η έκφραση των μεταγράφων, με πυκνομέτρηση των ζωνών που διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Όλες οι ζώνες αλληλοχρησιμοποιήθηκαν με αυτοματοποιημένο sequencing για την ταυτοποίηση του κάθε προϊόντος.



Εικόνα 4.2. Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* και των αντίστοιχων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να τα ανιχνεύσουν. *F: K7F1,2,4, *R: K7R1,2,4, *F: K7F1,3, *R: K7R1,3.

Στις φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης που ακολουθούν, απεικονίζεται η έκφραση των διαφόρων mRNA μεταγράφων του *KLK7* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου.

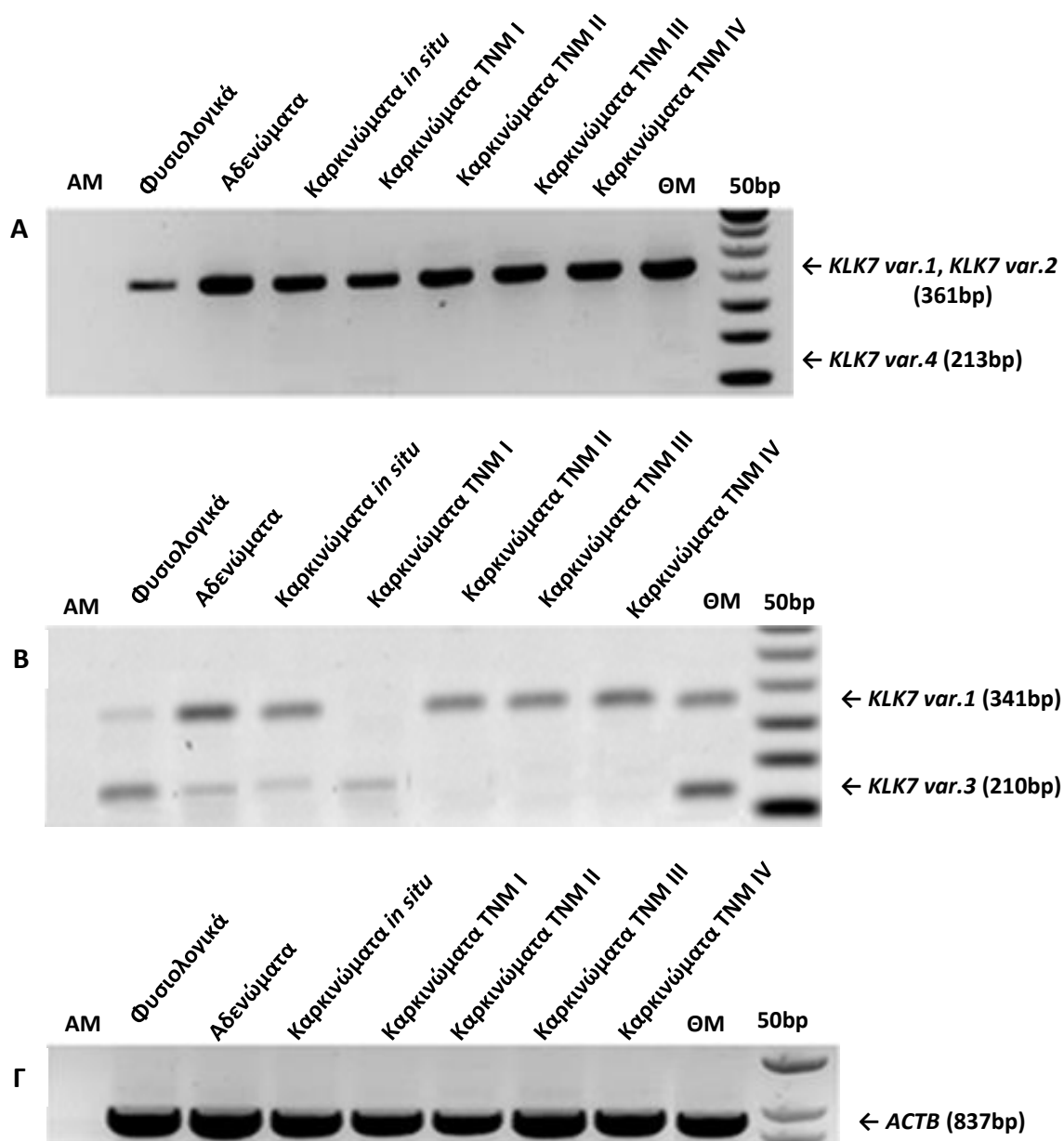


Εικόνα 4.3. Έλεγχος της έκφρασης των τεσσάρων mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* (A και B) και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* (Γ) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου. AM: αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O), 50 bp M: DNA Ladder 50 bp.

Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν εκφράζονται τα *KLK7* μετάγραφα 1 και 2 αλλά όχι το *KLK7* μετάγραφο 4 (Εικόνα 4.3.A.). Το *KLK7* μετάγραφο 3 εμφάνισε σε κάποιες κυτταρικές σειρές έντονη έκφραση (HCT 116, Caco2, HT-29) και σε άλλες ασθενή (DLD-1, LS 180) (Εικόνα 4.3.B.). Το *KLK7* μετάγραφο 1, όταν εντοπίστηκε μόνο του (ξεχωριστά από το *KLK7* μετάγραφο 2), φάνηκε ότι εκφράζεται έντονα στα κύτταρα HCT 116 και HT-29 και πολύ ασθενώς ως καθόλου στα DLD-1, LS 180 και Caco2 (Εικόνα 4.3.B.).

Στις φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης που ακολουθούν, απεικονίζεται η έκφραση των διαφόρων mRNA μεταγράφων του *KLK7* σε δεξαμενές cDNA (cDNA pools) δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου.

cDNA Pools δειγμάτων παχέος εντέρου ανά ιστολογικό τύπο



Εικόνα 4.4. Έκφραση των τεσσάρων mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* (A και B) και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* (Γ) σε cDNA pools δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου. AM: αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O), ΘM: θετικός μάρτυρας (κύτταρα HCT 116), 50 bp M: DNA Ladder 50 bp.

Με βάση την ένταση των ζωνών cDNA που ενισχύθηκαν, προέκυψαν οι τιμές πυκνομέτρησης που φαίνονται στον ακόλουθο Πίνακα, με τη βοήθεια του λογισμικού 1D Image Analysis Software, version 3.6 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

Πίνακας 4.1. Τιμές πυκνομέτρησης των μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* σε δεξαμενές cDNA δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου.

Ιστολογικός τύπος	<i>KLK7 var.1, KLK7 var.2</i>	<i>KLK7 var.1</i>	<i>KLK7 var.3</i>	<i>ACTB</i>
Φυσιολογικά	114434,00	11196,50	55435,35	832113,67
Αδενώματα	376663,00	51643,47	14245,66	872193,31
Καρκινώματα <i>in situ</i>	316579,43	18703,21	6772,68	774741,28
Καρκινώματα TNM I	157724,34	0	17394,36	724562,58
Καρκινώματα TNM II	275201,37	14856,92	0	645886,50
Καρκινώματα TNM III	332425,00	20726,59	0	813455,23
Καρκινώματα TNM IV	339257,52	22134,00	0	774792,08

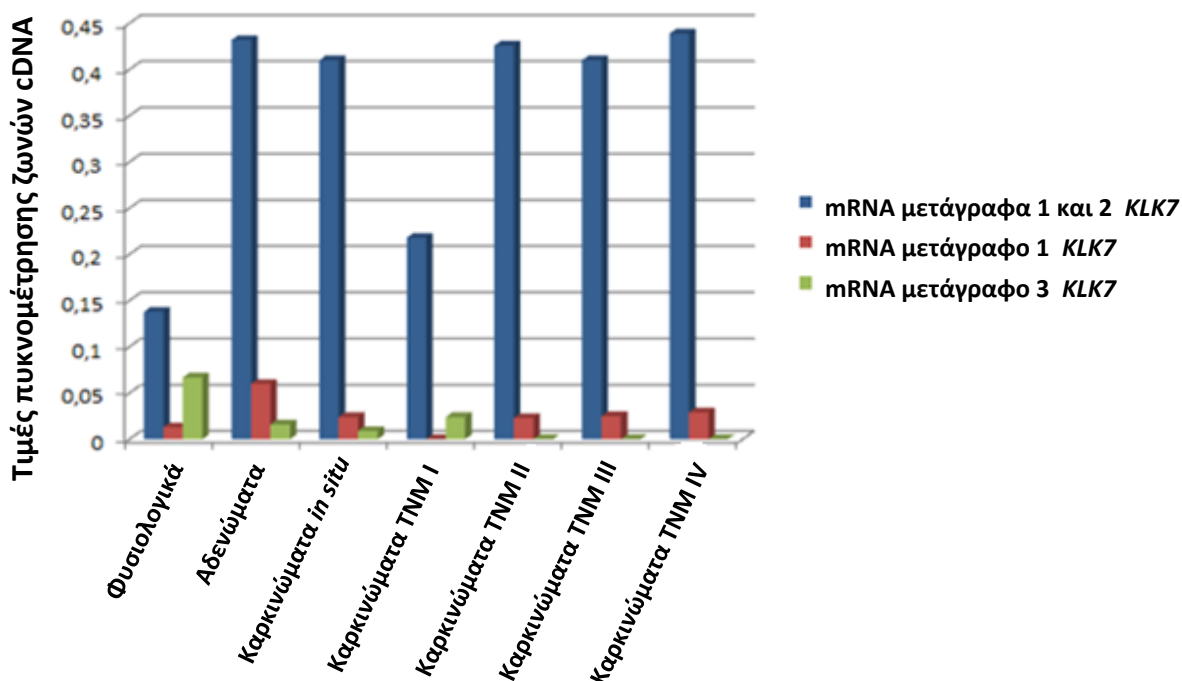
Στον ακόλουθο Πίνακα φαίνονται οι λόγοι των αντίστοιχων τιμών πυκνομέτρησης των δειγμάτων ως προς τις τιμές τους για το γονίδιο αναφοράς *ACTB* (*β-Actin*), οι οποίοι αντιστοιχούν στον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των αντίστοιχων mRNA μεταγράφων.

Πίνακας 4.2. Τιμές ημι-ποσοτικού προσδιορισμού των μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* σε δεξαμενές cDNA δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου.

Ιστολογικός τύπος	<i>KLK7 var.1, KLK7 var.2 / ACTB</i>	<i>KLK7 var.1 / ACTB</i>	<i>KLK7 var.3 / ACTB</i>
Φυσιολογικά	0,138	0,013	0,067
Αδενώματα	0,432	0,060	0,016
Καρκινώματα <i>in situ</i>	0,410	0,024	0,009
Καρκινώματα TNM I	0,218	0	0,024
Καρκινώματα TNM II	0,426	0,023	0
Καρκινώματα TNM III	0,410	0,025	0
Καρκινώματα TNM IV	0,439	0,029	0

Στο ακόλουθο διάγραμμα (Εικόνα 4.5) απεικονίζεται η διακύμανση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του *KLK7* στους διάφορους τύπους ιστού παχέος εντέρου, που αντιπροσωπεύουν τα στάδια εξέλιξης της νόσου.

Έκφραση των mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* στα διαδοχικά στάδια εξέλιξης της νόσου



cDNA Pools δειγμάτων εντέρου ανά ιστολογικό

Εικόνα 4.5. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των τεσσάρων μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* στα διαδοχικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Η έκφραση των μεταγράφων 1 και 2 του *KLK7* αυξάνεται κατά την πορεία της καρκινογένεσης, σε σύγκριση την έκφρασή τους στα φυσιολογικά δείγματα. Οι υψηλότερες τιμές έκφρασης παρατηρήθηκαν στα αδενώματα και στα καρκινώματα τελευταίου σταδίου (TNM IV), ενώ φαίνεται ότι η έκφρασή τους παρουσιάζει μείωση στα καρκινώματα *in situ* και στα καρκινώματα σταδίου TNM I, παραμένοντας όμως και πάλι αυξημένη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα.

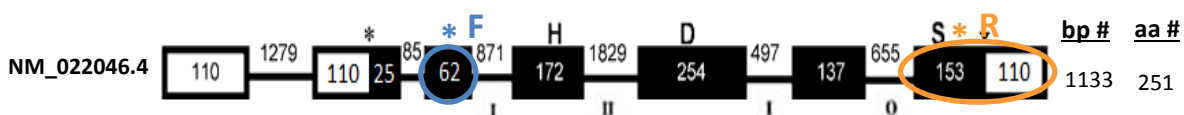
Κατά τη μελέτη του *KLK7* μεταγράφου 1 ξεχωριστά, φαίνεται ότι το μετάγραφο αυτό έχει χαμηλή έκφραση στις δεξαμενές cDNA από δείγματα, άρα στην αθροιστική έκφραση και των δυο *KLK7* μεταγράφων 1 και 2 συμμετέχει σε μικρό ποσοστό. Παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο διακύμανσης της έκφρασής του στα στάδια της νόσου με εκείνη που παρουσιάζουν και τα δυο μετάγραφα μαζί.

Η έκφραση του *KLK7* μεταγράφου 3 αντίθετα, εμφανίζει την υψηλότερη τιμή της στα φυσιολογικά δείγματα και βαθμιαία μειώνεται ως το στάδιο των καρκινωμάτων TNM I,

ενώ στα επόμενα στάδια εξαφανίζεται. Το *KLK7* μετάγραφο 4 δεν εκφράζεται στις δεξαμενές cDNA από δείγματα ούτε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου.

4.2.2. mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *KLK14*

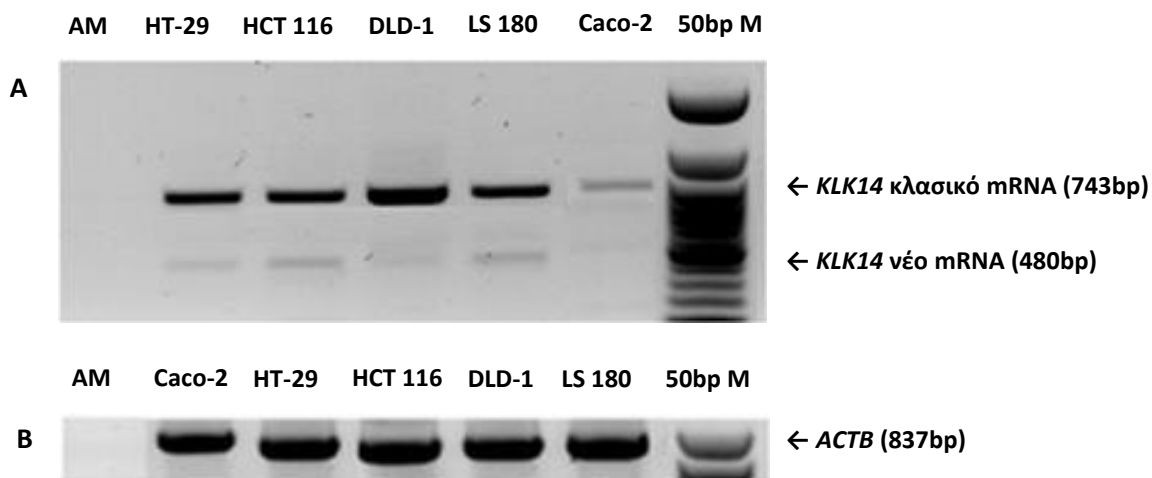
Το γονίδιο *KLK14* αποτελείται από 7 εξώνια και έως σήμερα είναι γνωστό ένα μόνο mRNA μετάγραφο που παράγεται από το γονίδιο αυτό. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (primers) K14ex3F και K14ex7R, που υβριδοποιούνται στα εξώνια 3 και 7 αντίστοιχα και δίνουν μια ζώνη μήκους 743 bp, όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 4.6.



Εικόνα 4.6. Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* και των αντίστοιχων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να τα ανιχνεύσουν. *F: K14ex3F, *R: K14ex7R.

Κατά τη μελέτη της έκφρασης του *KLK14* με τους συγκεκριμένους εκκινητές, μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών της RT-PCR, προέκυψε άλλη μία άγνωστη ζώνη cDNA μήκους περίπου 500 bp. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας της άγνωστης ζώνης, μετά από RT-PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA από την καρκινική κυτταρική σειρά DLD-1 και βρέθηκε πλήρης ομολογία της με το mRNA του γονιδίου *KLK14*. Η αλληλουχία αυτή όμως, έχει μικρότερο μήκος από το κλασικό *KLK14* mRNA, καθώς φάνηκε ότι απουσιάζει από αυτήν το ενδιάμεσο εξώνιο 5. Πιθανώς, λόγω εναλλακτικού ματίσματος, συρράπτονται μεταξύ τους τα εξώνια 4 και 6, η παρουσία των οποίων ταυτοποιήθηκε. Όλες οι ζώνες αλληλουχοποιήθηκαν με αυτοματοποιημένο sequencing για την ταυτοποίηση των προϊόντων. Στις φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης (Εικόνα 4.7) απεικονίζεται η έκφραση του κλασικού και του νέου mRNA μεταγράφου του *KLK14* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου.

Καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου

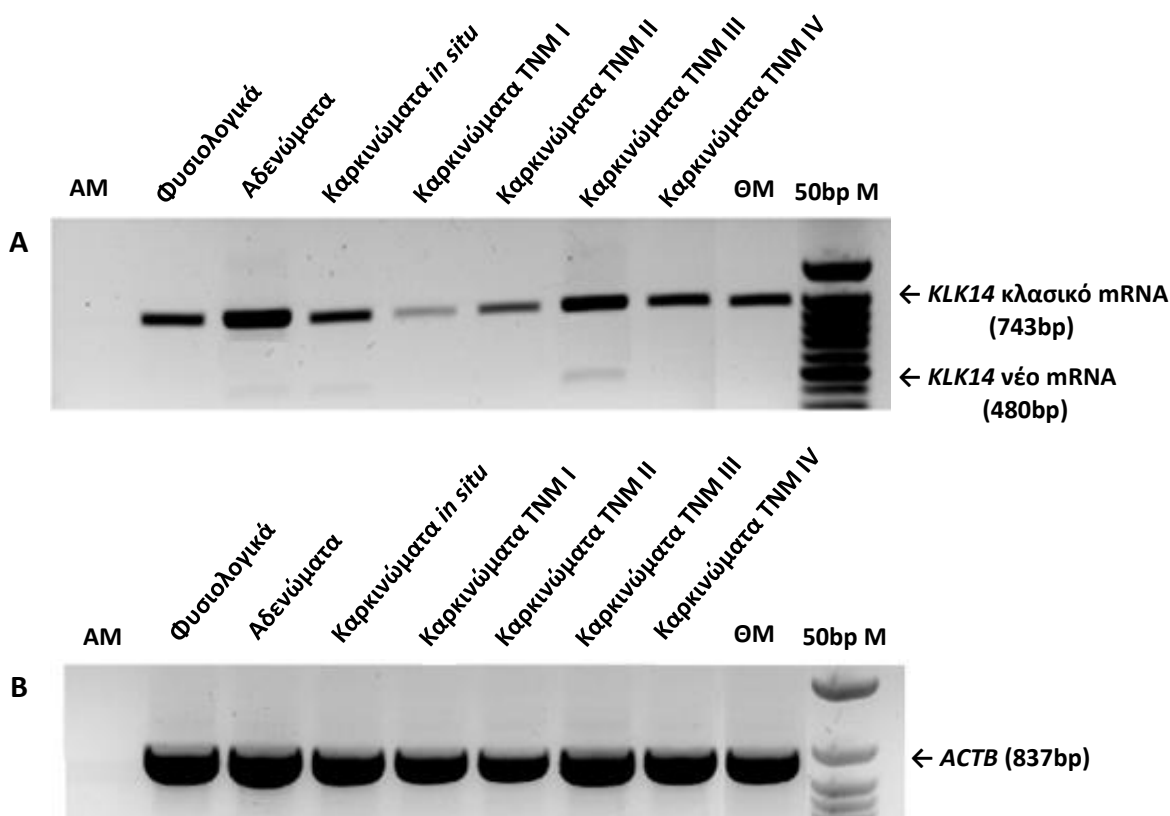


Εικόνα 4.7. Έλεγχος της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK14* (A) και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* (B) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου. AM: αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O), 50 bp M: DNA Ladder 50 bp.

Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου που μελετήθηκαν εκφράζεται το κλασικό mRNA μετάγραφο του *KLK14*, ενώ το νέο εκφράζεται ασθενώς στις κυτταρικές σειρές HT-29, HCT 116, DLD-1 και LS 180, αλλά όχι στα κύτταρα Caco-2 (Εικόνα 4.7.A.).

Στις φωτογραφίες των πηκτωμάτων αγαρόζης που ακολουθούν, απεικονίζεται η έκφραση των μεταγράφων του *KLK14* σε δεξαμενές cDNA (cDNA pools) από δείγματα ιστού παχέος εντέρου (Εικόνα 4.8). Με βάση την ένταση των ζωνών cDNA που ενισχύθηκαν, προέκυψαν οι τιμές πυκνομέτρησης που φαίνονται στον Πίνακα 4.3, με τη βοήθεια του λογισμικού 1D Image Analysis Software, version 3.6 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

cDNA Pools δειγμάτων παχέος εντέρου ανά ιστολογικό τύπο



Εικόνα 4.8. Έκφραση των mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK14* (A) και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* (B) σε cDNA pools δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου. AM: αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O), ΘΜ: θετικός μάρτυρας (κύτταρα HCT 116), 50 bp M: DNA Ladder 50 bp.

Πίνακας 4.3. Τιμές ημι-ποσοτικού προσδιορισμού των μεταγράφων του γονιδίου *KLK14* σε δεξαμενές cDNA δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου.

Ιστολογικός τύπος	Κλασικό mRNA <i>KLK14</i>	Νέο mRNA μετάγραφο <i>KLK14</i>	<i>ACTB</i>
Φυσιολογικά	2932090,00	0	832113,67
Αδενώματα	493674,17	6105,87	872193,31
Καρκινώματα <i>in situ</i>	264927,75	13642,08	774741,28
Καρκινώματα TNM I	76446,25	0	724562,58
Καρκινώματα TNM II	164896,57	0	645886,50
Καρκινώματα TNM III	354645,72	40881,30	813455,23
Καρκινώματα TNM IV	278681,05	0	774792,08

Στον Πίνακα 4.4 φαίνονται οι λόγοι των αντίστοιχων τιμών πυκνομέτρησης των δειγμάτων ως προς τις τιμές τους για το γονίδιο αναφοράς *ACTB* (β -Actin), οι οποίοι

αντιστοιχούν στον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των αντίστοιχων mRNA μεταγράφων.

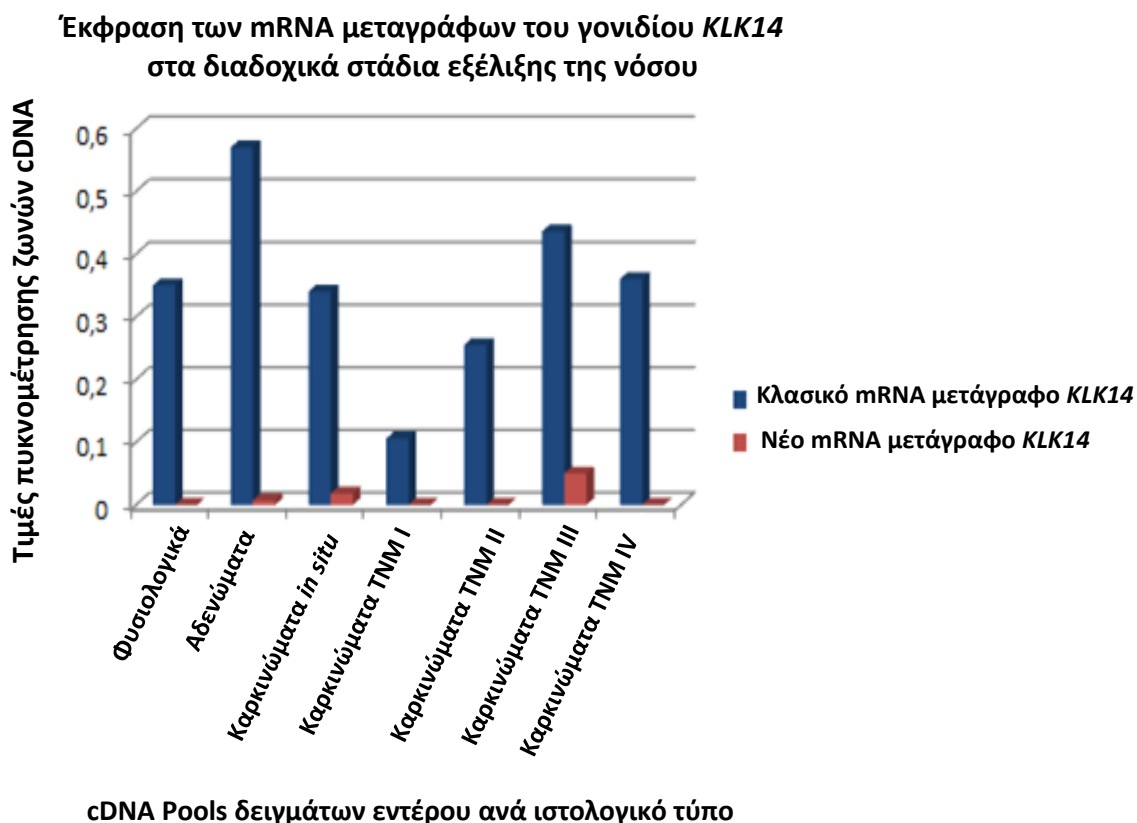
Πίνακας 4.4. Τιμές ημι-ποσοτικού προσδιορισμού των μεταγράφων του γονιδίου *KLK7* σε δεξαμενές cDNA δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου.

Ιστολογικός τύπος	Κλασικό mRNA <i>KLK14</i>	Νέο mRNA μετάγραφο <i>KLK14</i>
Φυσιολογικά	0,350	0
Αδενώματα	0,570	0,007
Καρκινώματα <i>in situ</i>	0,340	0,018
Καρκινώματα TNM I	0,106	0
Καρκινώματα TNM II	0,255	0
Καρκινώματα TNM III	0,436	0,050
Καρκινώματα TNM IV	0,360	0

Η διακύμανση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του *KLK14* στους διάφορους τύπους ιστού παχέος εντέρου, που αντιπροσωπεύουν τα στάδια εξέλιξης της νόσου, φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 4.9.

Η έκφραση του κλασικού mRNA μεταγράφου του *KLK14* αυξάνεται κατά τη μετάβαση από φυσιολογικό ιστό σε αδένωμα, στο οποίο παρουσιάζει και την υψηλότερη έκφρασή του, ενώ στην πορεία της νόσου επανέρχεται στα επίπεδα έκφρασης του φυσιολογικού ιστού. Η χαμηλότερη έκφραση εμφανίζεται στα καρκινώματα σταδίου TNM I, ενώ στα επόμενα στάδια της καρκινογένεσης αυξάνεται εκ νέου, αλλά φτάνει σε τιμές ίσες ή λίγο αυξημένες σε σύγκριση με εκείνες που εμφανίζονται στα φυσιολογικά δείγματα.

Για το νέο mRNA μετάγραφο εντοπίστηκε ασθενής έκφραση σε ορισμένα μόνο στάδια της νόσου. Συγκεκριμένα, δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό ιστό και η υψηλότερη έκφρασή του εμφανίζεται στα καρκινώματα σταδίου TNM III. Παρατηρήθηκε επίσης ότι εκφράζεται πολύ ασθενώς στα αδενώματα και στα καρκινώματα *in situ*.



Εικόνα 4.9. Έκφραση των mRNA μεταγράφων του γονιδίου *KLK14* (A) και του γονιδίου αναφοράς *ACTB* (B) σε cDNA pools δειγμάτων ιστού παχέος εντέρου. AM: αρνητικός μάρτυρας (DEPC-H₂O), ΘΜ: θετικός μάρτυρας (κύτταρα HCT 116), 50 bp M: DNA Ladder 50 bp.

4.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14*

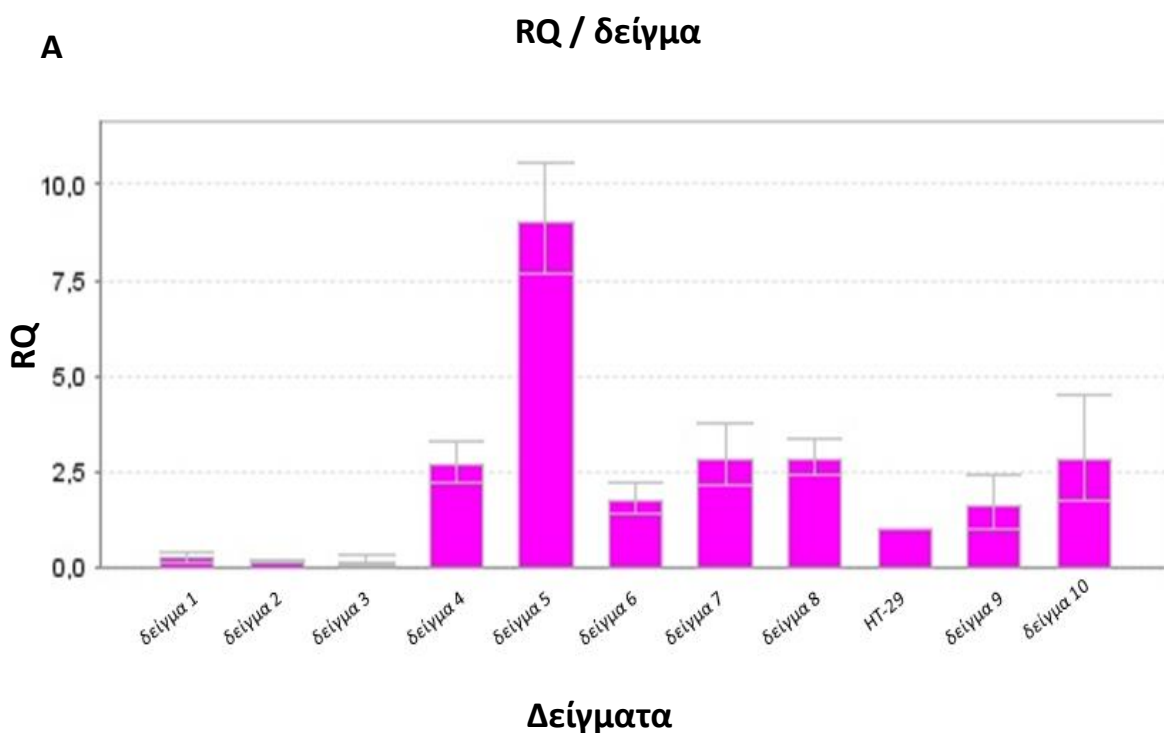
4.3.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΠΙΟ ΣΤΑΘΕΡΑ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

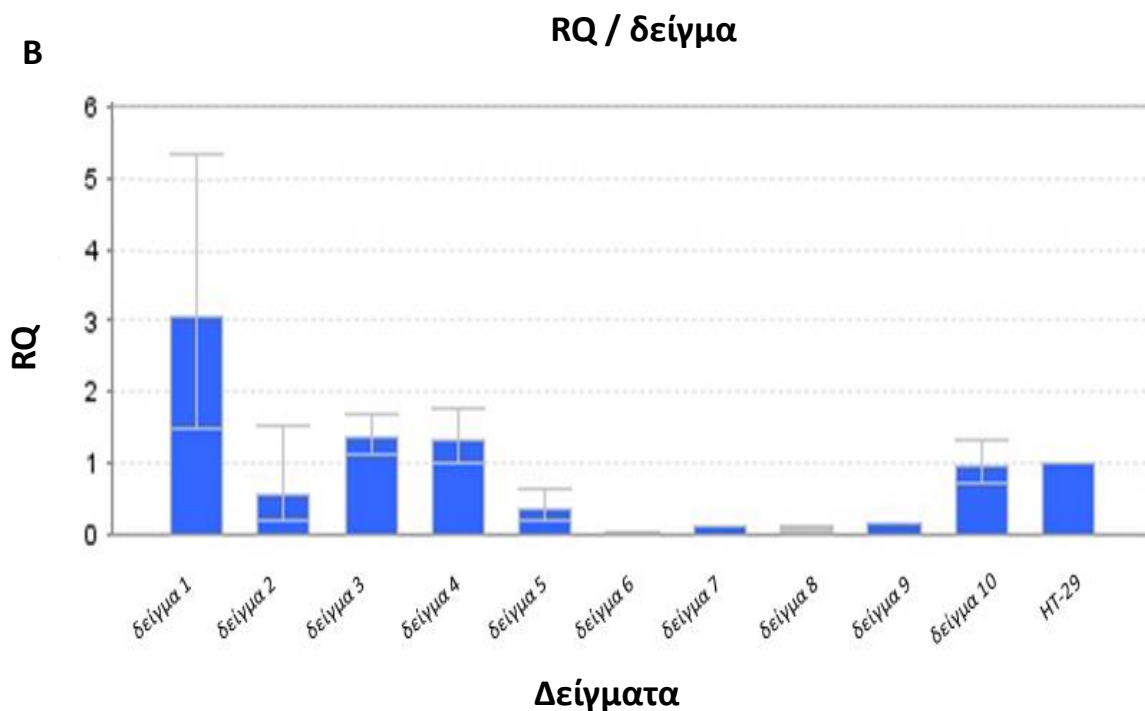
Επιλέχθηκε μεταξύ έξι κοινώς χρησιμοποιούμενων υποψήφιων γονιδίων αναφοράς (*GAPDH*, *18SRNA*, *B2M*, *EIF4A2*, *YWHAZ*, *CYC1*), το πιο σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου με τη χρήση του geNormTM Reference Gene Selection Kit with PerfectProbeTM (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, η έκφραση mRNA των έξι υποψήφιων γονιδίων ποσοτικοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο PerfectProbeTM και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό geNormTM. Η τιμή M αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των αποκλίσεων της έκφρασης κάθε υποψήφιου γονιδίου μεταξύ των 20 δειγμάτων κάθε ομάδας (φυσιολογικά/καρκινικά). Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή M τόσο μειώνεται η σταθερότητα της έκφρασης κάθε γονιδίου.

4.3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Στα 245 δείγματα ιστού παχέος εντέρου που συλλέχθηκαν, προσδιορίστηκε ποσοτικά η έκφραση mRNA των δυο υπό μελέτη γονιδίων με PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) με χρήση της χημείας PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, Southampton, UK), η οποία προσομοιάζει στη χημεία TaqMan. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινήτες, οι οποίοι υβριδοποιούνται σε κοινή περιοχή (εντός του εξωνίου 6) των τεσσάρων εναλλακτικών μεταγράφων του *KLK7* και εντός του εξωνίου 7 των μεταγράφων του *KLK14*. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *CYC1* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και η καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HT-29 χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα βαθμονόμησης για την συγκριτική ποσοτικοποίηση (comparative quantitation) της έκφρασης στα δείγματα. Η έκφραση mRNA του κάθε υπό μελέτη γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις τριπλούν.

Στα ακόλουθα διαγράμματα A και B (Εικόνα 4.11) παρουσιάζονται οι τιμές σχετικής ποσοτικοποίησης (RQ units) των mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε 10 αντιπροσωπευτικά δείγματα, ως προς την έκφρασή τους στο δείγμα αναφοράς HT-29, όπου $RQ_{(HT-29)}=1$.





Εικόνα 4.11. Διαγράμματα σχετικού ποσοτικού προσδιορισμού (RQ units) της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* (A) και *KLK14* (B) σε 10 επιλεγμένα δείγματα, ως προς την έκφρασή τους στο δείγμα αναφοράς (κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HT-29), όπου $RQ_{(HT-29)}=1$.

4.3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στη μελέτη της έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* συμπεριελήφθησαν συνολικά 245 δείγματα ιστού παχέος εντέρου από 175 ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 101 δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου, για 70 από τα οποία υπήρχε διαθέσιμος και παρακείμενος φυσιολογικός εντερικός βλεννογόμος από τον ίδιο ασθενή (ζεύγος ιστών), επαρκώς διαχωρισμένος από τον όγκο σε απόσταση τουλάχιστον 10 cm, καθώς και 74 αδενώματα παχέος εντέρου. Όλα τα δείγματα είχαν κατηγοριοποιηθεί με χρώση ηωσίνης-αιματοξιλίνης σε τομές παραφίνης. Για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Οι υπολογισμοί έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 15.0.

4.3.3.1. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η μέση τιμή της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* ήταν $1,13 \pm 0,44$ μονάδες RQ στους καρκινικούς ιστούς, $0,84 \pm 0,53$ μονάδες RQ στους φυσιολογικούς και $0,56 \pm 0,31$ μονάδες RQ στα αδενώματα. Η μέση τιμή της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK14* ήταν

35,37±6,6 μονάδες RQ στους καρκινικούς ιστούς, 21,05±5,5 μονάδες RQ στους φυσιολογικούς και 12,98±4 μονάδες RQ στα αδενώματα. Η μέση ηλικία των ασθενών με καρκίνο ήταν τα 68,4±1,2 έτη, ενώ των ασθενών με αδένωμα τα 67,76±1,34 έτη. Επίσης, οι όγκοι που μελετήθηκαν είχαν μέσο μέγεθος 4,17±0,16 cm με εύρος τα 1,2 έως 12 cm. Η ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών με καρκίνο κυμάνθηκε από 1 έως 111 μήνες με μέση τιμή τους 23,3±3,1 μήνες, ενώ η ολική επιβίωση από 1 έως 111 μήνες με μέση τιμή τους 26,5±2,9 μήνες.

Στον ακόλουθο Πίνακα αναγράφονται τα αριθμητικά αποτελέσματα, καθώς και τα αριθμητικά χαρακτηριστικά των ασθενών που απαρτίζουν τη συγκεκριμένη ομάδα μελέτης.

Πίνακας 4.5. Κατανομή των αριθμητικών δεδομένων της μελέτης στους ασθενείς με καρκίνο και με αδένωμα παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	Μέση τιμή ±ΤΣ ¹	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50 (Διάμεσος)	75	90
<u>Ασθενείς με καρκίνο</u>							
<i>KLK7</i> (μονάδες RQ)							
Καρκινικοί ιστοί (N=99)	1,13±0,44	0,001-39,7	0,006	0,032	0,170	0,68	1,87
Φυσιολογικοί ιστοί (N=67)	0,84±0,53	0,001-35,5	0,001	0,001	0,003	0,19	1,48
<i>KLK14</i> (μονάδες RQ)							
Καρκινικοί ιστοί (N=101)	35,37±6,6	0,36-474,2	1,17	2,27	8,07	39,95	94,2
Φυσιολογικοί ιστοί (N=70)	21,05±5,5	0,06-317,6	0,68	1,41	4,01	18,01	58,4
Ηλικία (έτη)	68,4±1,2	31,0-92,0	54,6	60,0	68,0	77,5	83,2
Μέγεθος όγκου (cm)	4,2±0,16	1,2-12,0	2,50	3,17	4,0	5,0	6,1
Ελεύθερη νόσου επιβίωση (μήνες)	23,3±3,1	1,0-111,0	1,0	3,0	11,0	30,0	62,8
Ολική επιβίωση (μήνες)	26,5±2,9	1,0-111,0	3,0	7,0	14,0	34,0	62,8
<u>Ασθενείς με αδένωμα</u>							
<i>KLK7</i> (μονάδες RQ) (N=74)							
	0,56±0,31	0,001-21,3	0,002	0,006	0,039	0,17	0,7
<i>KLK14</i> (μονάδες RQ) (N=74)							
	12,98±4,0	0,11-232,3	0,39	0,87	2,24	8,01	31,0
Ηλικία (έτη)	67,76±1,3	41,0-86,0	54,0	59,0	71,0	76,0	81,0

¹ΤΣ: τυπικό σφάλμα (standard error).

Η ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* στα 70 ζεύγη καρκινικού-φυσιολογικού ιστού παχέος εντέρου από τον ίδιο ασθενή, έδειξε ότι τα επίπεδα mRNA του *KLK7* ήταν υψηλότερα στον καρκινικό από ότι στο φυσιολογικό ιστό σε 56 ασθενείς (83,6%) και χαμηλότερα σε 10 ασθενείς (14,9%), ενώ σε έναν ασθενή ήταν περίπου ίσα. Η έκφραση του *KLK7* στον καρκίνο βρέθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από ότι στον φυσιολογικό εντερικό ιστό ($p < 0,001$). Τρία από τα 70 ζεύγη δεν συμπεριελήφθησαν στην στατιστική ανάλυση διότι οι τιμές έκφρασης που προέκυψαν ήταν εκτός του εύρους της κανονικής κατανομής κατά Gauss.

Η ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK14* στα 70 ζεύγη καρκινικού-φυσιολογικού ιστού παχέος εντέρου από τον ίδιο ασθενή, έδειξε ότι τα επίπεδα mRNA του *KLK14* ήταν υψηλότερα στον καρκινικό από ότι στο φυσιολογικό ιστό σε 45 ασθενείς (64,3%) και χαμηλότερα σε 25 ασθενείς (35,7%). Η έκφραση mRNA του *KLK14* βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη ($p = 0,035$) στον καρκινικό σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό.

Τα δυο γονίδια εμφανίζουν διαφορεική έκφραση mRNA μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού (μη καρκινικού) εντερικού ιστού, με το γονίδιο *KLK7* να έχει πιο σημαντική διαφορά από ότι το *KLK14*. Στον ακόλουθο Πίνακα αναγράφονται τα αποτελέσματα και η στατιστική σημασία τους, η οποία αξιολογήθηκε με το Wilcoxon Signed Ranks test.

Πίνακας 4.6. Αξιολόγηση της έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε 70 ζεύγη δειγμάτων καρκινικού/φυσιολογικού ιστού παχέος εντέρου.

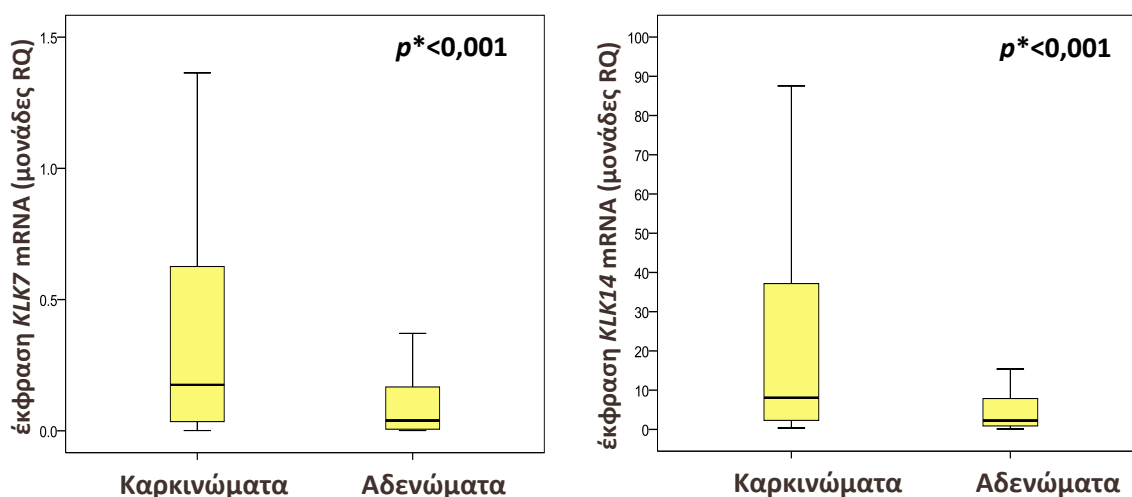
Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών (%)	Τιμή p^*
<i>KLK7</i>		
Υψηλότερη στον καρκίνο vs. φυσιολογικό	56 (83,6)	
Χαμηλότερη στον καρκίνο vs. φυσιολογικό	10 (14,9)	<0,001
Περίπου ίση και στους δυο ιστούς	1 (1,5)	
<i>KLK14</i>		
Υψηλότερη στον καρκίνο vs. φυσιολογικό	45 (64,3)	
Χαμηλότερη στον καρκίνο vs. φυσιολογικό	25 (35,7)	0,035
Περίπου ίση και στους δυο ιστούς	0 (0,0)	

*Υπολογισμένη με το Wilcoxon Signed Ranks Test.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μελετήθηκε η έκφραση mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε 101 καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου προερχόμενα από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση πρωτοπαθούς διηθητικού καρκίνου παχέος εντέρου, καθώς επίσης και σε 74 αδενώματα παχέος εντέρου, τα οποία αφαιρέθηκαν με εκτομή κατά την διάρκεια κολonosκόπησης.

Η ανάλυση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* στα 101 καρκινώματα και 74 αδενώματα έδειξε ότι τα επίπεδα mRNA του *KLK7* ήταν σημαντικά υψηλότερα στον καρκινικό από ότι στον αδενωματώδη ιστό ($p < 0,001$). Επίσης, η έκφραση mRNA και του γονιδίου *KLK14* βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στον καρκινικό από ότι στον αδενωματώδη ιστό ($p < 0,001$). Συνεπώς και τα δυο γονίδια εμφανίζουν σημαντική διαφορική έκφραση mRNA μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού παχέος εντέρου.

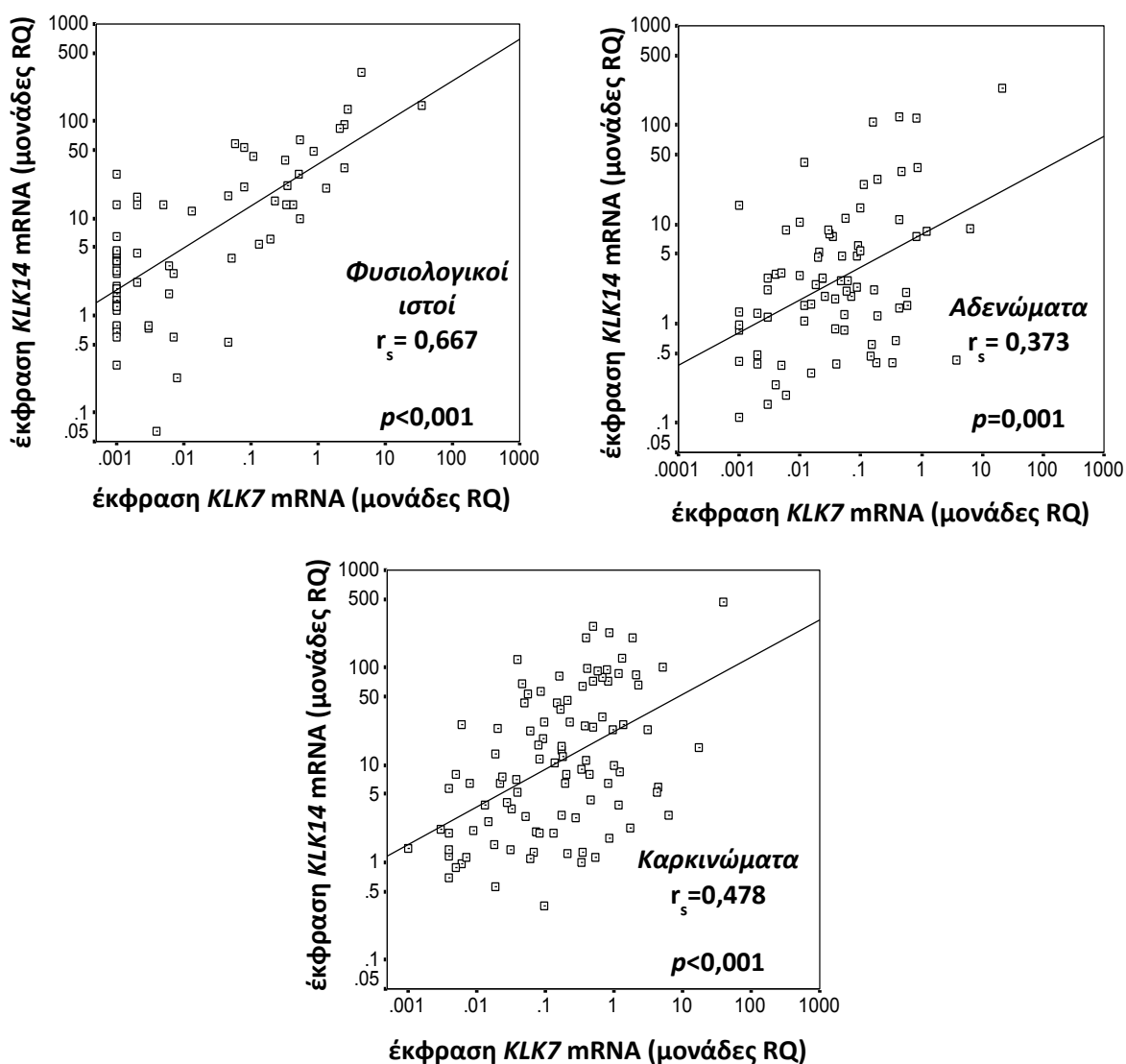
Στα ακόλουθα θηκογράμματα (box-plots) απεικονίζεται το κεντρικό διάστημα της κατανομής των τιμών έκφρασης mRNA (μονάδες RQ) που περιλαμβάνει το 50% των παρατηρήσεων σε καρκινικά και αδενωματώδη δείγματα για τα δυο υπό μελέτη γονίδια και οι οριζόντιες γραμμές αντιστοιχούν στην διάμεση τιμή. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney *U* test.



*Υπολογισμένες με το Mann Whitney Test.

Εικόνα 4.12. Θηκογράμματα (box-plots) αξιολόγησης της έκφρασης mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε καρκινικούς και αδενωματώδεις ιστούς.

Στους τρεις ιστολογικούς τύπους παχέος εντέρου που μελετήθηκαν (καρκινώματα, αδενώματα και φυσιολογικοί ιστοί) αξιολογήθηκε η πιθανή συσχέτιση της έκφρασης mRNA μεταξύ των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε κάθε τύπο ιστού, με το συντελεστή συσχέτισης r_s του Spearman (Spearman's correlation coefficient). Όσο πιο κοντά στη μονάδα είναι η τιμή του συντελεστή r_s τόσο ισχυρότερη είναι η συν-έκφραση των γονιδίων.



Εικόνα 4.13. Διαγράμματα συσχέτισης του συντελεστή Spearman που δείχνουν τη συν-έκφραση των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* στους τρεις ιστολογικούς τύπους παχέος εντέρου.

Όπως παρουσιάζεται στα παραπάνω γραφήματα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης των *KLK7* και *KLK14* ($p \leq 0,001$) και στους τρεις τύπους ιστού παχέος εντέρου, δηλαδή τα γονίδια εκφράζονται μεταβάλλοντας την έκφρασή τους με τον ίδιο τρόπο. Η πιο στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασής τους παρατηρείται στο φυσιολογικό ιστό ($r_s=0,667$).

4.3.3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

Η πιθανή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA κάθε γονιδίου με τη διήθηση στους παρακείμενους λεμφαδένες, με το στάδιο TNM της νόσου και με το βαθμό αποδιαφοροποίησης (grade) του όγκου διερευνήθηκαν με την εφαρμογή της παραμετρικής στατιστικής δοκιμασίας Fisher's Exact Test. Ο Πίνακας 4.7 δείχνει τη στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας υψηλής έκφρασης του *KLK7* σε όγκους προχωρημένου σταδίου TNM ($p=0,004$), καθώς και σε ασθενείς με διήθηση στους λεμφαδένες ($p=0,015$). Δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του *KLK7* με το βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου (grade).

Πίνακας 4.7. Συσχέτιση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* και κλινικών και παθολογικών παραμέτρων σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός Ασθενών (%)		Τιμή p^b
		Χαμηλή έκφραση <i>KLK7</i> ^a	Υψηλή έκφραση <i>KLK7</i> ^a	
<u>Διήθηση στους λεμφαδένες</u>				
Αρνητική	35	23 (65,7)	12 (34,3)	0,015
Θετική	51	19 (37,3)	32 (62,7)	
<u>Βαθμός αποδιαφοροποίησης</u>				
I/II	24	11 (45,8)	13 (54,2)	0,540
III	17	6 (35,3)	11 (64,7)	
<u>Στάδιο TNM</u>				
I/II	37	26 (70,3)	11 (29,7)	0,004
III/IV	48	18 (37,5)	30 (62,5)	

^aCut-off =2,28 μονάδες RQ ισούται με το 25^ο εκατοστημόριο,

^bΥπολογισμένη με το Fisher's Exact Test.

Ο Πίνακας 4.8 δείχνει τη στατιστικά σχετικά σημαντική αύξηση της συχνότητας υψηλής έκφρασης του *KLK14* σε όγκους προχωρημένου σταδίου TNM ($p=0,043$) και σε

ασθενείς με διήθηση στους λεμφαδένες ($p=0,019$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασής του με το βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου, όπως και για το *KLK7*.

Πίνακας 4.8. Συσχέτιση της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK14* και κλινικών και παθολογικών παραμέτρων σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου

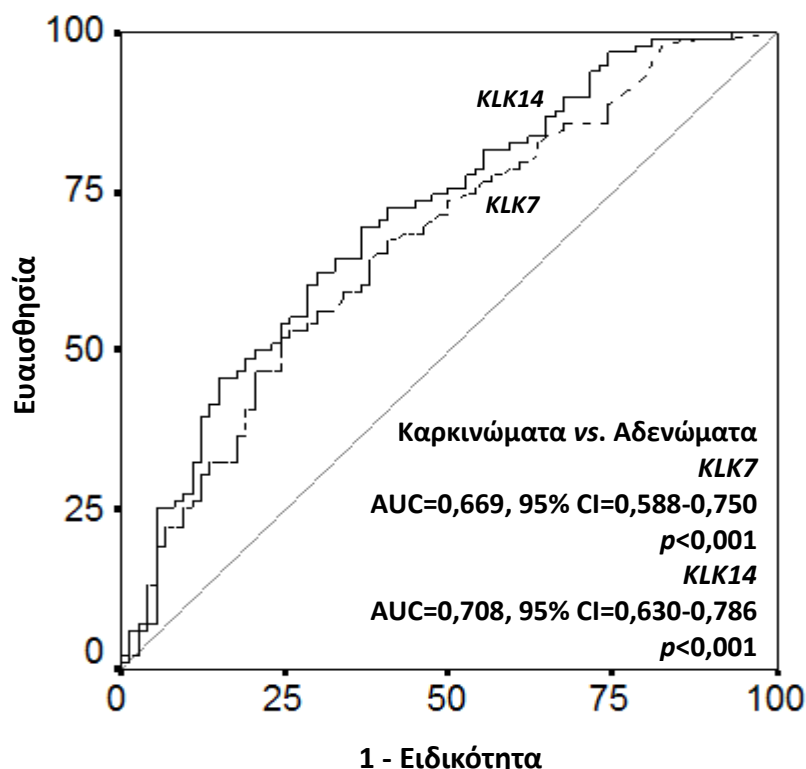
Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός Ασθενών (%)		Τιμή p^b
		Χαμηλή έκφραση <i>KLK14</i> ^a	Υψηλή έκφραση <i>KLK14</i> ^a	
<u>Διήθηση στους λεμφαδένες</u>				
Αρνητική	36	13 (36,1)	23 (63,9)	0,019
Θετική	53	7 (13,2)	46 (86,8)	
<u>Βαθμός αποδιαφοροποίησης</u>				
I/II	24	7 (28,0)	18 (72,0)	0,260
III	17	2 (11,1)	16 (88,9)	
<u>Στάδιο TNM</u>				
I/II	37	15 (40,5)	22 (59,5)	0,043
III/IV	50	7 (14,0)	43 (86,0)	

^a Cut-off = 0,18 μονάδες RQ ισούται με τη διάμεση τιμή,

^b Υπολογισμένη με το Fisher's Exact Test.

4.3.3.3. ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΜΕΤΑΞΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΔΕΝΩΜΑΤΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ

Η ανάλυση ROC (Receiver Operating Characteristic, ROC) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ικανότητας της έκφρασης mRNA κάθε γονιδίου (ως πιθανού δείκτη), να διακρίνει μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού. Στις καμπύλες ROC που ακολουθούν απεικονίζεται η σχέση μεταξύ ευαισθησίας και (1 – ειδικότητας) για την έκφραση mRNA των δυο γονιδίων. Το εμβαδό (AUC) της περιοχής που βρίσκεται κάτω από τις καμπύλες ROC κατέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης mRNA και των δυο γονιδίων δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση mRNA του *KLK7* έχει χαμηλή αλλά σημαντική διακριτική ικανότητα (AUC = 0,669, 95%CI = 0,588-0,750, $p < 0,001$), ενώ η έκφραση mRNA του *KLK14* έχει πιο ισχυρή και σημαντική διακριτική ικανότητα (AUC=0,708, 95%CI=0,630-0,786; $p < 0,001$) ως προς το διαχωρισμό καρκινωμάτων και αδενωμάτων (Εικόνα 4.14).



Εικόνα 4.14. Καμπύλες ROC που απεικονίζουν την ικανότητα κάθε δυνητικού μοριακού δείκτη (mRNA έκφραση *KLK7* και *KLK14*) για διάκριση μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού.

4.3.3.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Από τους 101 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου η μετεγχειρητική παρακολούθηση (follow up) κατέστη δυνατή για τους 95. Κατά το χρόνο παρακολούθησης (1 έως 111 μήνες) οι 25 ασθενείς (26,3%) εμφάνισαν υποτροπή και οι 22 (23,2%) απεβίωσαν.

Με τη μονομεταβλητή ανάλυση (univariate analysis) μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης εκτιμήθηκε η πιθανή σχέση της έκφρασης mRNA του *KLK7* και του *KLK14*, καθώς και άλλων κλινικών και παθολογικών παραμέτρων (βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο TNM, μέγεθος όγκου), με την επιβίωση (ολική ή ελεύθερη νόσου) των ασθενών με καρκίνο. Η έκφραση mRNA του κάθε γονιδίου χαρακτηρίστηκε ως θετική ή αρνητική, ανάλογα με το αν ήταν μεγαλύτερη ή μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή cut-off. Το στάδιο TNM της νόσου και το μέγεθος του όγκου βρέθηκαν σημαντικοί δείκτες πρόγνωσης για την ολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών, όπως αναμενόταν.

Πίνακας 4.9. Μονομεταβλητή ανάλυση επιβίωσης (DFS και OS) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου με μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης.

Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>
Μονομεταβλητή ανάλυση (N=95)						
Έκφραση <i>KLK7</i>						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	1,47	0,82-2,64	0,19	1,93	1,06-3,54	0,032
Ως συνεχής μεταβλητή	1,24	0,89-1,73	0,18	1,32	0,91-1,92	0,13
Έκφραση <i>KLK14</i>						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	1,80	1,10-2,93	0,018	2,18	1,32-3,61	0,002
Ως συνεχής μεταβλητή	1,01	1,00-1,016	0,057	1,007	0,99-1,014	0,082
Βαθμός αποδιαφοροποίησης	1,23	0,95-1,61	0,11	1,19	0,92-1,54	0,18
Στάδιο TNM	1,29	1,09-1,54	0,003	1,37	1,15-1,63	<0,001
Μέγεθος όγκου	1,23	1,10-1,37	<0,001	1,27	1,13-1,43	<0,001

^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου.

^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK7* αποδείχθηκε σημαντικός προγνωστικός δείκτης για την ολική επιβίωση ($p=0,032$) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, αφού οι ασθενείς με θετική έκφραση *KLK7* διατρέχουν σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο ($HR=1,93$) να καταλήξουν μετά την ασθένεια σε σύγκριση με όσους δεν το εκφράζουν. Η έκφραση του *KLK7* δεν βρέθηκε να σχετίζεται με τον κίνδυνο υποτροπής. Συνεπώς, η έκφραση mRNA του *KLK7* είναι δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για την ολική επιβίωση των ασθενών ($HR=1,93$) (Πίνακας 4.9).

Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK14* βρέθηκε να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την ελεύθερη νόσου επιβίωση ($p=0,018$) καθώς και για την ολική επιβίωση ($p=0,002$) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Οι ασθενείς με θετική έκφραση *KLK14* διατρέχουν 1,8 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής ($HR=1,80$) και 2,18 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να καταλήξουν ($HR=2,18$) μετά την ασθένεια. Συνεπώς, η έκφραση mRNA του *KLK14* είναι δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για την ελεύθερη νόσου και για την ολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου ($HR=1,80$ και $HR=2,18$) (Πίνακας 4.9).

Στην πολυμεταβλητή ανάλυση (multivariate analysis) μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης εξετάστηκαν οι ανεξάρτητες μεταβλητές βαθμός αποδιαφοροποίησης (grade), στάδιο TNM της νόσου, μέγεθος του όγκου και κατάσταση λεμφαδένων συγχρόνως με την έκφραση mRNA κάθε γονιδίου. Η έκφραση mRNA κανενός από τα δυο γονίδια δεν βρέθηκε να συμβάλλει στην προγνωστική αξία του βαθμού αποδιαφοροποίησης, του σταδίου TNM ούτε της κατάστασης των λεμφαδένων για την επιβίωση των ασθενών (DFS ή OS) (Πίνακας 4.10). Κανένας από τους δυο πιθανούς δείκτες δεν βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος για την πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

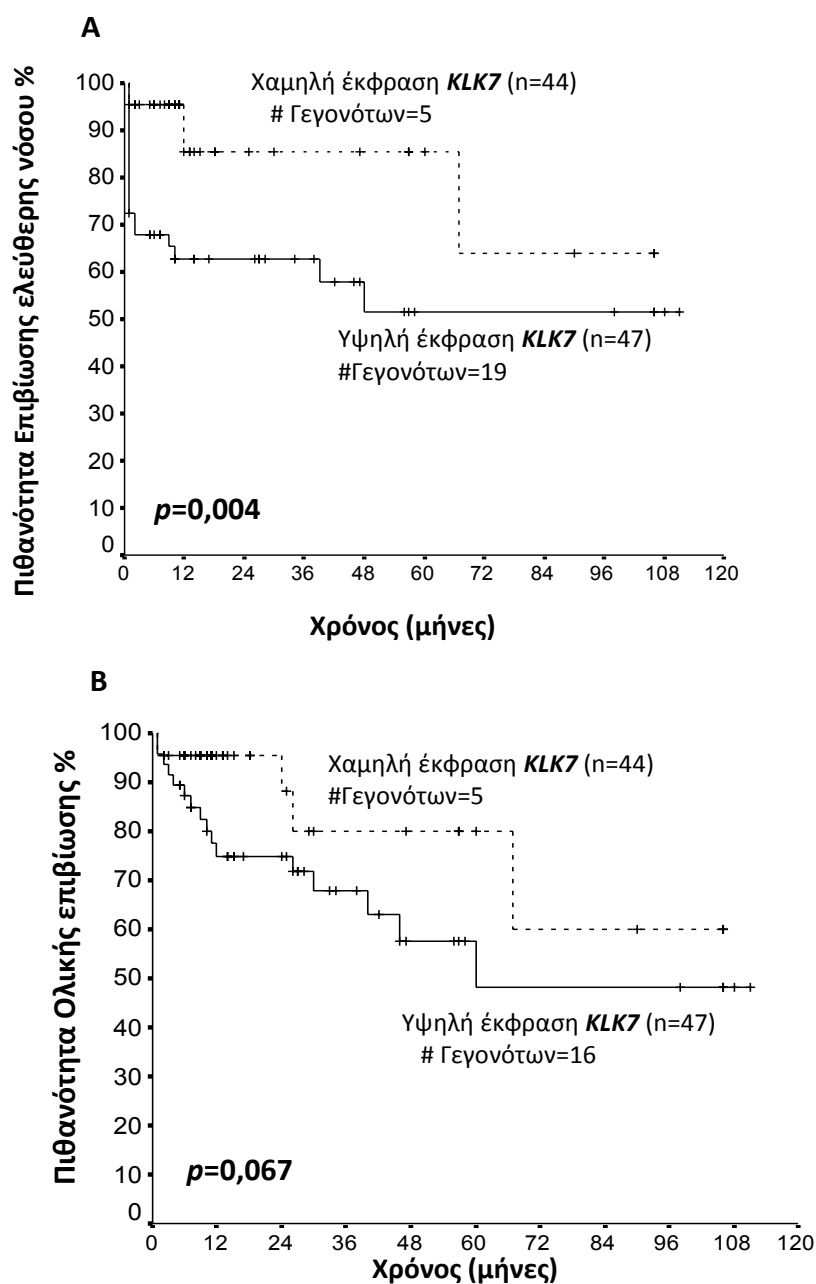
Πίνακας 4.10. Πολυμεταβλητή ανάλυση επιβίωσης (DFS και OS) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου με μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης.

Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>
Έκφραση <i>KLK7</i>						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	1,22	0,23-6,56	0,81	1,62	0,29-8,94	0,57
Ως συνεχής μεταβλητή	1,07	0,77-1,48	0,67	1,07	0,77-1,47	0,68
Έκφραση <i>KLK14</i>						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	0,24	0,029-1,98	0,19	0,32	0,041-2,49	0,32
Ως συνεχής μεταβλητή	1,01	0,99-1,015	0,36	1,003	0,99-1,012	0,55

^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από την ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Τα μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης συνυπολόγισαν τις εξής μεταβλητές: βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο της νόσου και μέγεθος του όγκου.

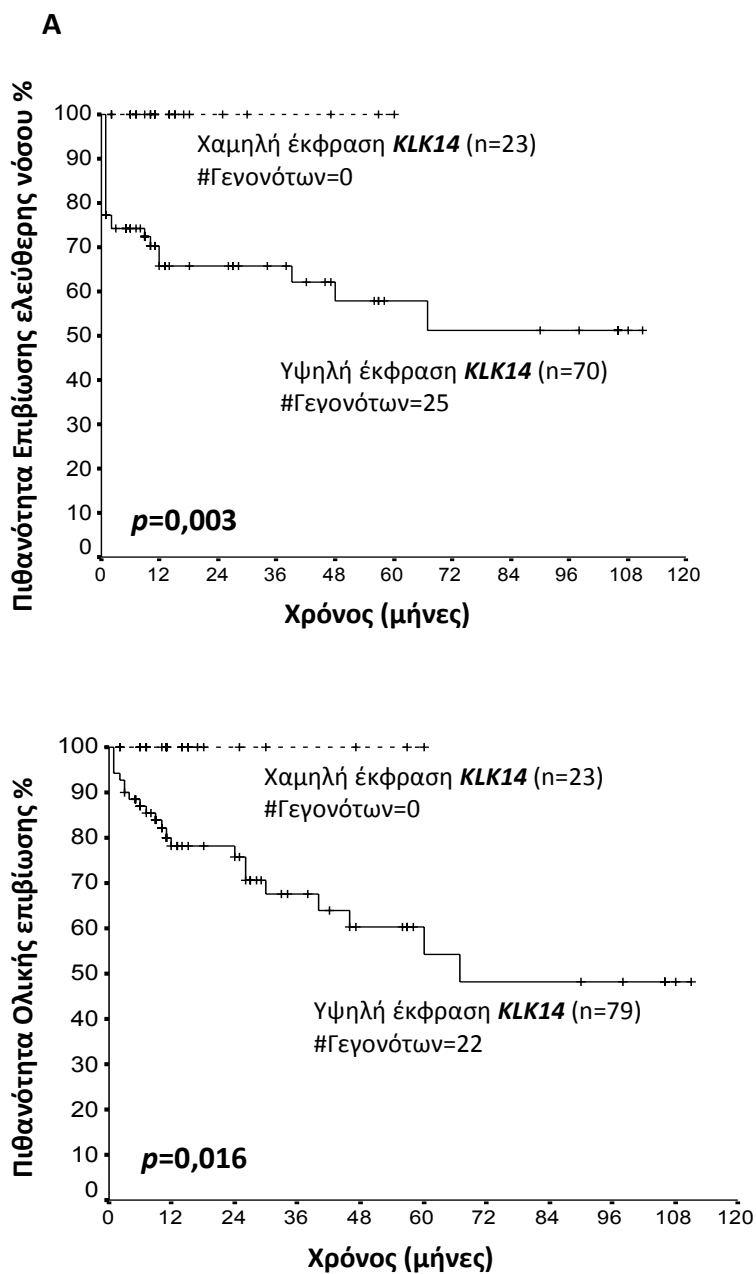
^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier οδήγησε στην κατασκευή των ακόλουθων καμπυλών που έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση mRNA του *KLK7* σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου επιβίωσης ($p=0,004$) (Εικόνα 4.15.A.), αλλά όχι με την ολική επιβίωση των ασθενών ($p=0,067$) (Εικόνα 4.15.B.).



Εικόνα 4.15. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier που δείχνουν την προγνωστική αξία της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* για την ελεύθερη νόσου (A) και την ολική επιβίωση (B) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

Ωστόσο, οι ίδιες καμπύλες έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση mRNA του *KLK14* σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου ($p=0,003$) (Εικόνα 4.16.A.) και ολικής επιβίωσης των ασθενών ($p=0,016$) (Εικόνα 4.16.B.), δηλαδή σχετίζεται σημαντικά με δυσμενή πρόγνωση για τον καρκίνο παχέος εντέρου, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα της μονομεταβλητής ανάλυσης.

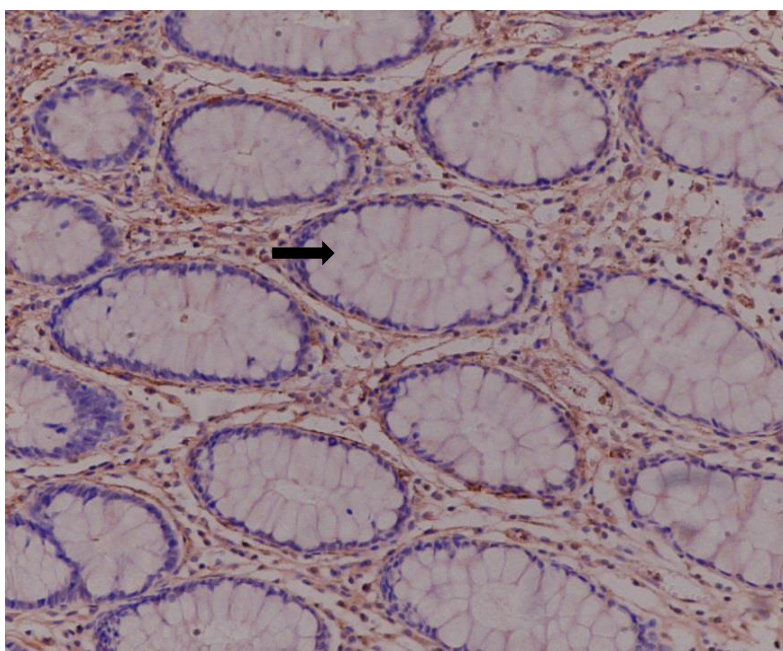


Εικόνα 4.16. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier που δείχνουν την προγνωστική αξία της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK14* για την ελεύθερη νόσου (A) και την ολική επιβίωση (B) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

4.4. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚLK7 ΚΑΙ ΚLK14 ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΙΣΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Οι περισσότερες καλλικρεΐνες σε πρωτεϊνικό επίπεδο εκφράζονται σε πολλούς φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς. Η κυτταρική τους εντόπιση, όπως έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες, είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματική σε αδενικά επιθηλιακά φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα καθώς και στα εκκρίματά τους (Petraiki, et al., 2006). Για τη μελέτη της κυτταρικής εντόπισης και της κατανομής των ΚLKs 7 και 14 στους ιστούς παχέος εντέρου εφαρμόστηκε η μέθοδος της έμμεσης ανοσοϊστοχημείας με το σύστημα στρεπταβιδίνης–βιοτίνης–υπεροξειδάσης σε 84 τομές παραφίνης (πάχους 5 μm) από καρκινικούς ιστούς, καθώς και σε 4 τομές φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου και σε 4 τομές αδενωμάτων. Ακολούθως παρατίθενται φωτογραφίες επιλεγμένων τομών, όπου φαίνονται τα χαρακτηριστικά της χρώσης κάθε αντισώματος στους τρεις ιστολογικούς τύπους παχέος εντέρου.

4.4.1. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ ΚLK7



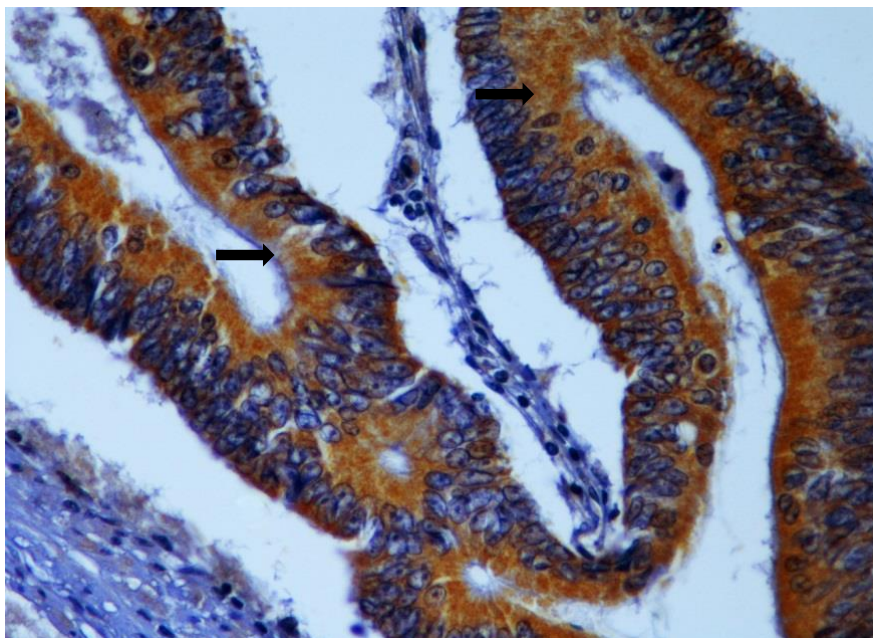
Εικόνα 4.17. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της ΚLK7 σε φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου (μεγέθυνση 100X).

Η ΚLK7 παρουσίασε αρνητική έκφραση στα επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα του φυσιολογικού ιστού (Εικόνα 4.17).

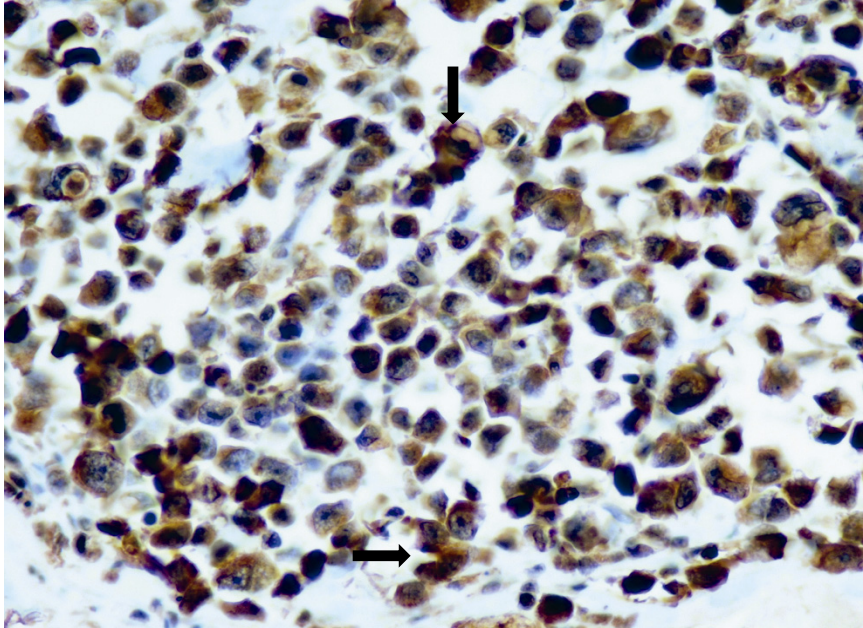


Εικόνα 4.18. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK7 σε λαχνοσωληνώδες αδένωμα με μικρή δυσπλασία (μεγέθυνση 100X).

Στα αδενώματα παρατηρήθηκε μέτρια ή ασθενής κυτταροπλασματική χρώση στα φλεγμονώδη κύτταρα του στρώματος και έντονη ομοιογενής κυτταροπλασματική χρώση των επιθηλιακών αδενικών κυττάρων και του εκκρίματος (Εικόνα 4.18).



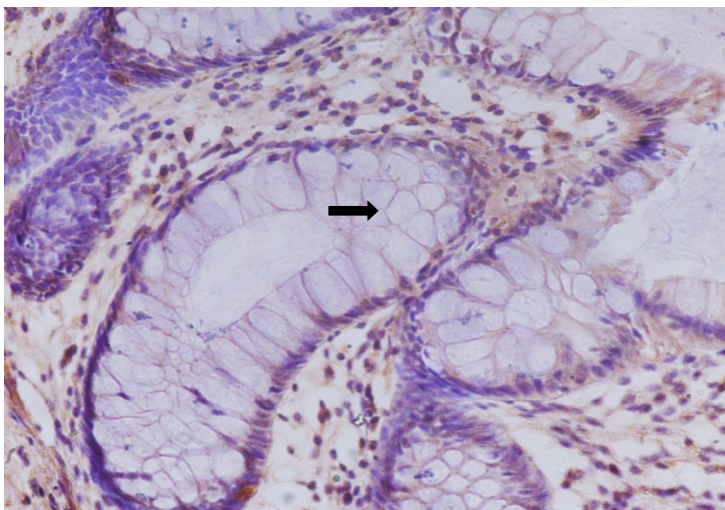
Εικόνα 4.19. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK7 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου grade III (μεγέθυνση 200X).



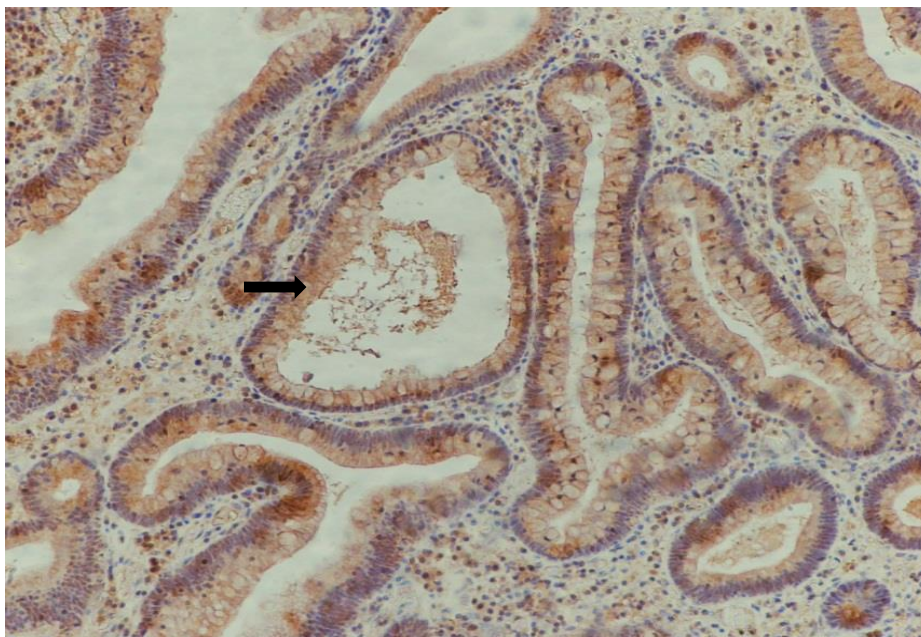
Εικόνα 4.20. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK7 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου grade IV (μεγέθυνση 400X)

Στον καρκίνο η χρώση εμφάνισε διάχυτο πρότυπο και χαρακτηρίστηκε έντονη κυτταροπλασματική περιπυρηνική, με εντόπιση στα αδένια της αυλικής επιφάνειας του παχέος εντέρου και στο έκκριμα (Εικόνα 4.19), εικόνα που είναι συμβατή με εκκρινόμενη πρωτεάση. Σε ορισμένα καρκινικά δείγματα υψηλής αποδιαφοροποίησης (grade IV) παρατηρήθηκε πολύ έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική, μεμβρανική και εστιακά πυρηνική χρώση (Εικόνα 4.20). Συμπερασματικά, η KLK7 έχει έντονη έκφραση στο νεοπλασματικό επιθήλιο (αδενωματώδες ή καρκινικό) αλλά όχι στο φυσιολογικό επιθήλιο και η εντόπισή της είναι κατά βάση διάχυτη κυτταροπλασματική με παρουσία στον αυλό και στο έκκριμα.

4.4.2. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ KLK14

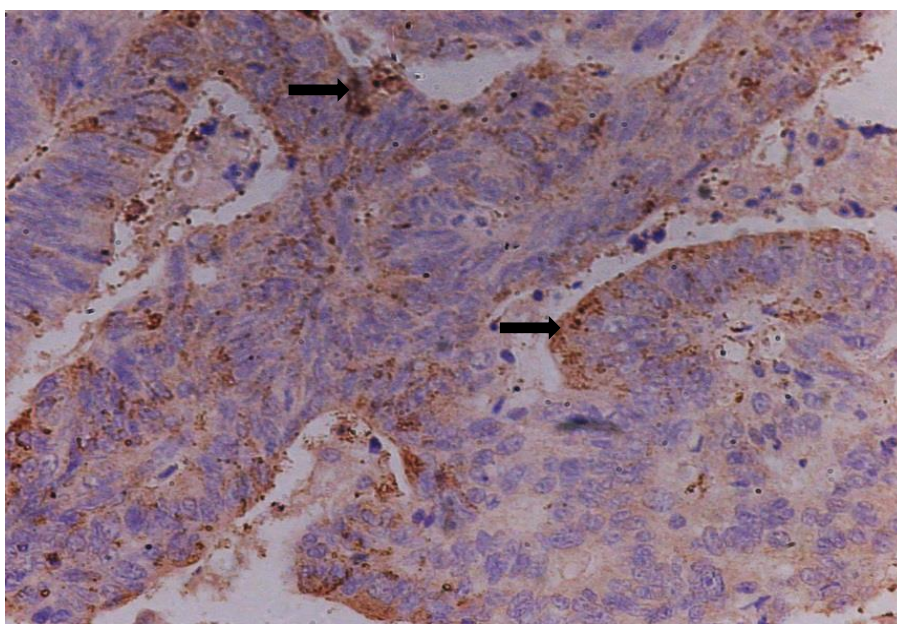


Εικόνα 4.21. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK14 σε φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου (μεγέθυνση 200X).

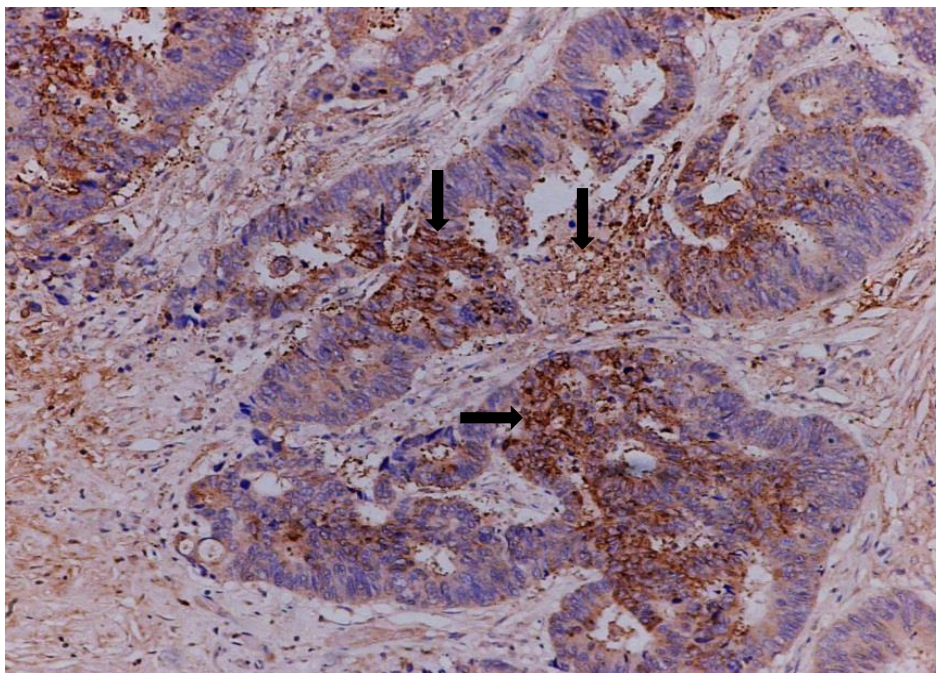


Εικόνα 4.22. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK14 σε σε λαχνοσωληνώδες αδένωμα με μέτρια δυσπλασία (μεγέθυνση 100X).

Η KLK14 εντοπίστηκε με έντονη έκφραση στο επιθήλιο των αδενωμάτων (Εικόνα 4.22) αλλά όχι στο φυσιολογικό επιθήλιο (Εικόνα 4.21). Στο φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο παρατηρήθηκε ασθενής χρώση στο καλυπτικό επιθήλιο και στα στρωματικά κύτταρα αλλά όχι στον επιθήλιο των κρυπτών (Εικόνα 4.21). Στα αδενώματα παρατηρήθηκε εστιακή κυτταροπλασματική έκφραση γύρω από τον πυρήνα ορισμένων κυττάρων στο ψευδοπολύστιβο επιθήλιο με παρουσία και στον αυλό και στο έκκριμα, εικόνα που συμβαδίζει με εκκρινόμενη πρωτεάση, όπως δείχθηκε και για την KLK7.



Εικόνα 4.23. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK14 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου grade II (μεγέθυνση 200X).



Εικόνα 4.24. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της KLK14 σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου grade IV (μεγέθυνση 100X).

Στον καρκινικό ιστό παρατηρήθηκε εντονότερη κοκκιώδης κυτταροπλασματική χρώση στην αυλική επιφάνεια (Εικόνες 4.23, 4.24) σε σύγκριση με τα αδενώματα, στα οποία η χρώση που εντοπίστηκε στην αυλική επιφάνεια ήταν πιο ομοιογενής κυτταροπλασματική (Εικόνα 4.22) και όχι κοκκιώδης. Σε ιστούς υψηλού βαθμού αποδιαφοροποίησης (grade IV) υπήρχαν πολλαπλές εστίες κοκκιώδους χρώσης, η οποία ήταν ορατή και στα φλεγμονώδη κύτταρα του στρώματος (Εικόνα 4.24). Δεν παρατηρήθηκε πυρηνική ούτε μεμβρανική χρώση της KLK14 σε κανέναν ιστολογικό τύπο.

Συμπερασματικά, η KLK14 εμφάνισε παρόμοια εικόνα με την KLK7, αφού και αυτή εντοπίστηκε με έντονη κυτταροπλασματική χρώση στο νεοπλασματικό επιθήλιο (αδενωματώδες ή καρκινικό) και στον αυλό αλλά όχι στο φυσιολογικό επιθήλιο, πράγμα που επιβεβαιώνει την εκκριτική φύση των δυο πρωτεασών.

4.4.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μέση ηλικία των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου ήταν $68,8 \pm 1,17$ έτη με εύρος από 31 έως 85 έτη και ο χρόνος μετεγχειρητικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών κυμαινόταν από 1 έως 127 μήνες. Οι όγκοι που μελετήθηκαν είχαν μέσο μέγεθος $4,51 \pm 0,191$ cm με εύρος τα 1,3 έως 12 cm. Η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)

των ασθενών με καρκίνο κυμάνθηκε από 1 έως 127 μήνες με μέση τιμή τους $50,97 \pm 4,98$ μήνες, ενώ η ολική επιβίωση (OS) από 1 έως 127 μήνες με μέση τιμή τους $57,83 \pm 4,56$ μήνες. Για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Οι υπολογισμοί έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 15.0.

Στον ακόλουθο Πίνακα αναγράφονται τα αριθμητικά χαρακτηριστικά των ασθενών που απαρτίζουν τη συγκεκριμένη ομάδα μελέτης.

Πίνακας 4.11. Κατανομή των αριθμητικών δεδομένων της μελέτης στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	Μέση τιμή \pm Τ.Σ ^α	Εύρος	Εκατοστημόρια		
			25	50 (Διάμεσος)	75
Ηλικία ασθενών (έτη)	$68,8 \pm 1,17$	31,00 – 85,0	62,0	70,00	77,0
Μέγεθος όγκου (cm)	$4,51 \pm 0,191$	1,30 – 12,0	3,1	4,30	5,0
Επιβίωση ελεύθερη νόσου (μήνες)	$50,97 \pm 4,98$	1,00 – 127,0	1,0	49,00	93,0
Ολική επιβίωση (μήνες)	$57,83 \pm 4,56$	1,00 – 127,0	21,0	60,00	93,75

^αΤΣ: τυπικό σφάλμα (standard error) της μέσης τιμής.

4.4.3.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ KLK7 ΚΑΙ KLK14 ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στις 84 τομές καρκινικού ιστούς παχέος εντέρου αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την κλίμακα 0-3+ ως αρνητική (0-1+, καθόλου ή χαμηλή έκφραση) ή ως θετική (2-3+, μέτρια ή υψηλή έκφραση) και ακολούθησε στατιστική διερεύνηση των πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των ποιοτικών δεδομένων αξιολόγησης της χρώσης και διαφόρων κλινικών και παθολογικών παραμέτρων, καθώς και ανάλυση επιβίωσης των ασθενών.

Η πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεασών KLK7 και KLK14 με το μέγεθος του όγκου, με τη διήθηση στους παρακείμενους λεμφαδένες, με το στάδιο TNM της νόσου και με το βαθμό αποδιαφοροποίησης (histological grade) του ιστού διερευνήθηκαν με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Fisher's Exact Test (Πίνακες 4.12, 4.13).

Πίνακας 4.12. Συσχέτιση της έκφρασης της KLK7 με κλινικές και παθολογικές παραμέτρους σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός Ασθενών (%)		Τιμή p^a
		Αρνητική χρώση KLK7 ^a	Θετική χρώση KLK7 ^a	
<u>Μέγεθος όγκου</u>				
≤4 cm	38	17 (44,7)	21 (55,3)	0,824
>4 cm	40	19 (47,5)	21 (52,5)	
x	6			
<u>Διήθηση στους λεμφαδένες</u>				
Αρνητική	40	23 (57,5)	17 (42,5)	0,072
Θετική	39	14 (35,9)	25 (64,1)	
x	5			
<u>Στάδιο TNM</u>				
I/II	32	18 (56,3)	14 (43,8)	0,091
III/IV	38	13 (34,2)	25 (65,8)	
x	14			
<u>Βαθμός αποδιαφοροποίησης</u>				
I/II	36	19 (52,8)	17 (47,2)	0,321
III/IV	28	11 (39,3)	17 (60,7)	
x	20			

^aΥπολογισμένη με το Fisher's Exact Test.

x: Άγνωστο.

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της έκφρασης της KLK7 με τους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες που εξετάστηκαν (Πίνακας 4.12).

Στον Πίνακα 4.13 που ακολουθεί, φαίνεται ότι η θετική ανοσοϊστοχημική χρώση (2-3+) της KLK14 σχετίζεται στατιστικά σημαντικά ($p=0,034$) με τον αυξημένο βαθμό αποδιαφοροποίησης του καρκίνου αλλά όχι με άλλες παραμέτρους.

Πίνακας 4.13. Συσχέτιση της έκφρασης της KLK14 με κλινικές και παθολογικές παραμέτρους σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου.

Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός Ασθενών (%)		Τιμή p^{α}
		Αρνητική χρώση KLK14 ^α	Θετική χρώση KLK14 ^α	
<u>Μέγεθος όγκου</u>				
≤4 cm	37	10 (27,0)	27 (73,0)	0,609
>4 cm	33	11 (33,3)	22 (66,7)	
x	14			
<u>Διήθηση στους λεμφαδένες</u>				
Αρνητική	35	13 (37,1)	22 (62,9)	0,297
Θετική	35	8 (22,9)	27 (77,1)	
x	14			
<u>Στάδιο TNM</u>				
I/II	26	10 (38,5)	16 (61,5)	0,149
III/IV	36	7 (19,4)	29 (80,6)	
x	22			
<u>Βαθμός αποδιαφοροποίησης</u>				
I/II	31	12 (38,7)	19 (61,3)	0,034
III/IV	25	3 (12,0)	22 (88,0)	
x	28			

^αΥπολογισμένη με το Fisher's Exact Test.
x: Άγνωστο.

4.4.3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή ανάλυση (univariate analysis) με το μοντέλο παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox (Cox proportional hazard regression model), με βάση την οποία εκτιμήθηκε η πιθανή σχέση της έκφρασης των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14 καθώς και άλλων κλινικών και παθολογικών παραμέτρων (βαθμός αποδιαφοροποίησης, στάδιο TNM, μέγεθος όγκου, κατάσταση λεμφαδένων) με την επιβίωση (ολική ή ελεύθερη νόσου) των ασθενών με καρκίνο. Η έκφραση της κάθε πρωτεΐνης χαρακτηρίστηκε ως θετική (2-3+) ή αρνητική (0-1+) με βάση την κλίμακα 0-3+.

Το στάδιο TNM της νόσου, ο βαθμός αποδιαφοροποίησης και η διήθηση στους παρακείμενους λεμφαδένες του όγκου βρέθηκαν σημαντικοί δείκτες πρόγνωσης για την ολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών, όπως αναμενόταν. Η θετική έκφραση

της KLK7 αποδείχθηκε σημαντικός προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση ελεύθερη νόσου ($p=0,02$) και οριακά για την ολική επιβίωση ($p=0,054$) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με θετική έκφραση KLK7 διατρέχουν 3,24 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ($HR=3,24$) να εμφανίσουν υποτροπή και σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο ($HR=1,95$) να καταλήξουν μετά την ασθένεια σε σύγκριση με όσους δεν την εκφράζουν ή την εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα. Η έκφραση της KLK14 δεν βρέθηκε να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση των ασθενών. Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής ανάλυσης Cox παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.14.

Πίνακας 4.14. Μονομεταβλητή ανάλυση επιβίωσης (DFS και OS) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου με μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης Cox.

Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή p	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή p
Μονομεταβλητή ανάλυση (N=79)						
Έκφραση KLK7						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	3,24	1,20 – 8,75	0,020	1,95	0,989 – 3,86	0,054
Έκφραση KLK14						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	1,97	0,667 – 5,83	0,220	1,99	0,814 – 4,87	0,131
Διηθημένοι λεμφαδένες	5,70	1,94 – 16,79	0,002	6,06	2,76 – 13,30	<0,001
Στάδιο TNM	21,25	2,84 – 159,1	0,003	11,86	4,16 – 33,79	<0,001
Βαθμός αποδιαφοροποίησης	2,60	1,03 – 6,55	0,043	4,34	1,98 – 9,52	<0,001
Μέγεθος όγκου	0,832	0,369 – 1,84	0,634	0,957	0,498 – 1,84	0,896

^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox.

^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

Συνεπώς, η έκφραση της KLK7 είναι δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για την ελεύθερη νόσου επιβίωση ($HR=3,24$, $p=0,02$) και οριακά για την ολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου ($HR=1,95$, $p=0,054$), ενώ η έκφραση της KLK14 δεν σχετίζεται σημαντικά με την πρόγνωση της νόσου.

Στην πολυμεταβλητή ανάλυση του μοντέλου παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox συμπεριελήφθησαν οι εξής ανεξάρτητες παράμετροι: βαθμός αποδιαφοροποίησης, μέγεθος όγκου και κατάσταση λεμφαδένων και εξετάστηκαν συγχρόνως με την έκφραση της κάθε πρωτεΐνης. Στην πολυμεταβλητή ανάλυση περιελήφθησαν οι ασθενείς για τους οποίους ήταν διαθέσιμες όλες οι τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν.

Η θετική έκφραση της KLK7 βρέθηκε ότι συσχετίζεται με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και συμβάλλει στατιστικά σημαντικά στην προγνωστική αξία της κατάστασης των λεμφαδένων ($p=0,043$) και του βαθμού αποδιαφοροποίησης (grade) ($p=0,029$). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με θετική έκφραση KLK7 εμφανίζουν 3,62 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής (HR=3,62, 95% CI=1,04–12,6), όταν η έκφραση συνυπολογίστηκε με την κατάσταση των λεμφαδένων και το βαθμό αποδιαφοροποίησης, ενώ όταν η έκφραση συνυπολογίστηκε με το μέγεθος του όγκου και το βαθμό αποδιαφοροποίησης, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με θετική έκφραση KLK7 εμφανίζουν 4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής (HR=4,00, 95% CI=1,55–13,9) (Πίνακας 4.15.A. και Β.). Συνεπώς, η θετική έκφραση της KLK7 είναι ανεξάρτητος δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για την επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, αλλά δεν σχετίζεται με την ολική επιβίωσή τους.

Πίνακας 4.15. Πολυμεταβλητή ανάλυση επιβίωσης (DFS και OS) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου ως προς την έκφραση της KLK7 με το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης Cox.

Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή p	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή p
A. Πολυμεταβλητή ανάλυση^γ (N=64)						
Έκφραση KLK7						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	3,62	1,04 – 12,6	0,043	1,59	0,732 – 3,47	0,240
Διηθημένοι λεμφαδένες	5,94	1,33 - 26,6	0,020	5,07	1,37 – 18,72	0,015
Βαθμός αποδιαφοροποίησης	0,919	0,288 – 2,93	0,887	1,47	0,456 – 4,75	0,519

^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox.

^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

^γΤο πολυμεταβλητό μοντέλο συνυπολόγισε την κατάσταση των λεμφαδένων και το βαθμό αποδιαφοροποίησης.

Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>
Β. Πολυμεταβλητή ανάλυση^δ (N=63)						
Έκφραση KLK7						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	4,00	1,55 – 13,9	0,029	1,64	0,715 – 3,74	0,244
Βαθμός αποδιαφοροποίησης	2,73	1,01 – 7,40	0,048	4,96	2,13 – 11,54	<0,001
Μέγεθος όγκου	1,20	0,480 – 3,0	0,695	1,46	0,673 – 3,16	0,339

^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox.

^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

^δΤο πολυμεταβλητό μοντέλο συνυπολόγισε το βαθμό αποδιαφοροποίησης και το μέγεθος του όγκου.

Η έκφραση της KLK14 δεν φάνηκε να προσθέτει προγνωστική σημασία στο μέγεθος του όγκου ή στην κατάσταση των λεμφαδένων, η οποία διατήρησε την προγνωστική της αξία για την ελεύθερη νόσου ($p=0,003$) και την ολική επιβίωση ($p<0,001$) των ασθενών (Πίνακας 4.16.A. και B.).

Πίνακας 4.16. Πολυμεταβλητή ανάλυση επιβίωσης (DFS και OS) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου ως προς την έκφραση της KLK14 με μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης Cox.

Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>
A. Πολυμεταβλητή ανάλυση^γ (N=56)						
Έκφραση KLK14						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	1,73	0,375 – 8,02	0,481	1,26	0,354 – 4,46	0,724
Βαθμός αποδιαφοροποίησης	0,76	0,257 – 2,24	0,615	1,06	0,346 – 3,24	0,920
Μέγεθος όγκου	1,14	0,439 – 2,96	0,789	0,9	3,92 – 2,11	0,826
Διηθημένοι λεμφαδένες	10,69	2,05 – 55,7	0,005	11,2	2,51 – 49,37	0,002

^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox.

^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

^γΤο πολυμεταβλητό μοντέλο συνυπολόγισε το βαθμό αποδιαφοροποίησης, την κατάσταση των λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου.

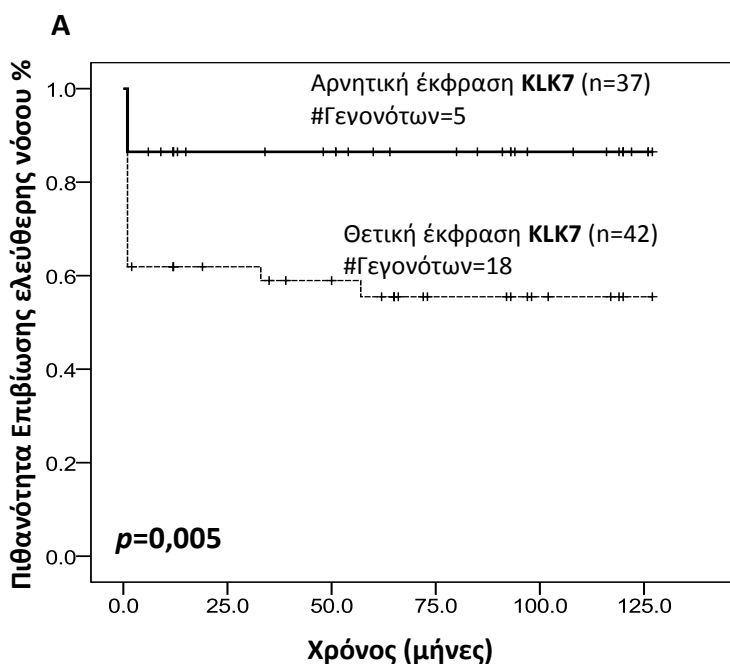
Μεταβλητή	Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)			Ολική επιβίωση (OS)		
	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>	HR ^α	95% CI ^β	Τιμή <i>p</i>
Β. Πολυμεταβλητή ανάλυση^δ (N=70)						
Έκφραση KLK14						
Αρνητική	1,00			1,00		
Θετική	1,47	0,492 – 4,41	0,488	1,38	0,557 – 3,42	0,487
Μέγεθος όγκου	0,96	0,408 – 2,27	0,930	0,85	0,405 – 1,78	0,663
Διηθημένοι λεμφαδένες	6,69	1,94 – 23,1	0,003	7,97	3,01 – 21,12	<0,001

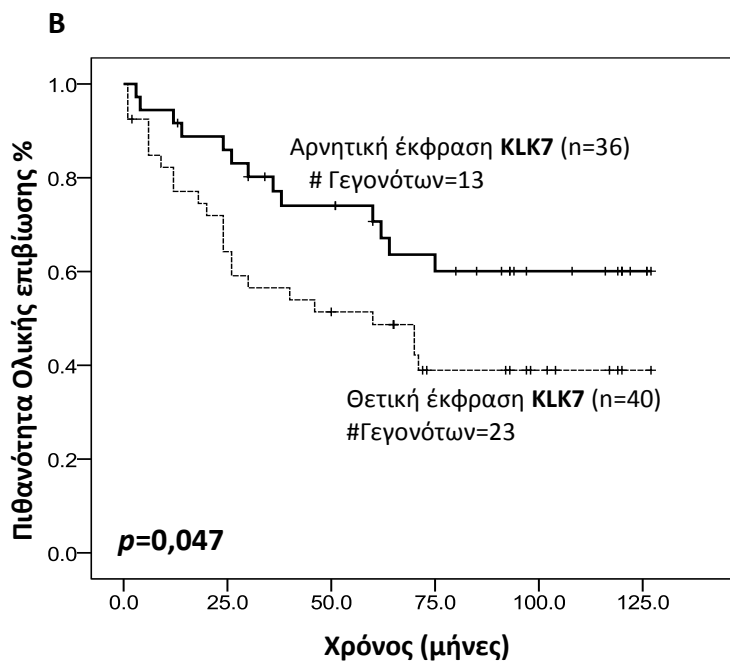
^αΑναλογικός κίνδυνος (hazard ratio, HR) υπολογισμένος από το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου Cox.

^βΔιάστημα εμπιστοσύνης (Confidence interval, CI) του εκτιμώμενου αναλογικού κινδύνου.

^δΤο πολυμεταβλητό μοντέλο συνυπολόγισε το μέγεθος του όγκου και την κατάσταση των λεμφαδένων.

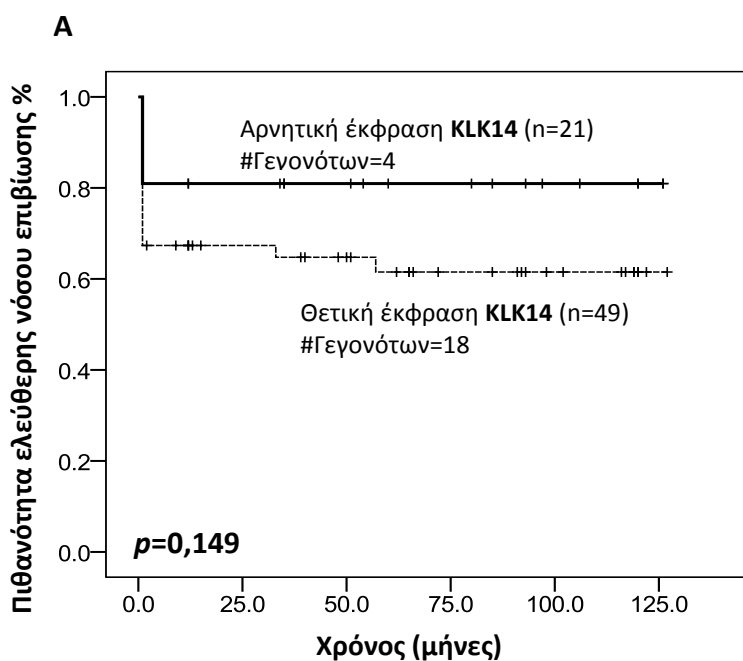
Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier οδήγησε στην κατασκευή των ακόλουθων καμπυλών που έδειξαν ότι η θετική έκφραση της KLK7 σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου ($p=0,005$) και ολικής επιβίωσης των ασθενών ($p=0,047$), αλλά με μικρή στατιστική σημασία για την δεύτερη (Εικόνα 4.25). Άρα, η θετική έκφραση της KLK7 σχετίζεται σημαντικά με δυσμενή πρόγνωση για τον καρκίνο παχέος εντέρου ως προς την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS), επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα της μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής ανάλυσης Cox.

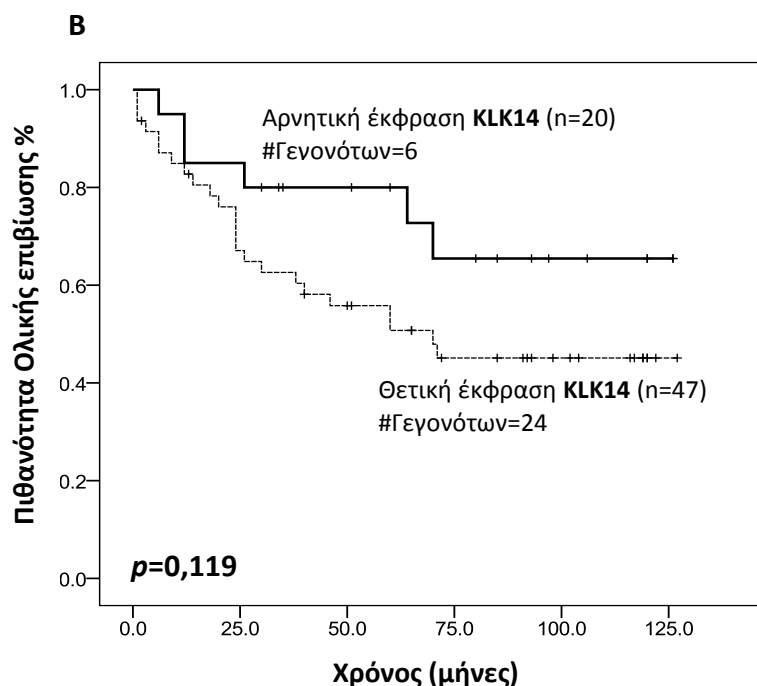




Εικόνα 4.25. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier που δείχνουν την προγνωστική αξία της έκφρασης της KLK7 για την ελεύθερη νόσου (A) και την ολική επιβίωση (B) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier για την έκφραση της KLK14 έδειξε ότι η θετική έκφραση της πρωτεΐνης δεν σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ελεύθερη νόσου ή ολική επιβίωση των ασθενών (Εικόνα 4.26), πράγμα που κατέδειξε και η μονομεταβλητή και πολυμεταβλητή ανάλυση Cox.





Εικόνα 4.26. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier που δείχνουν την προγνωστική αξία της έκφρασης της *KLK14* για την ελεύθερη νόσου (A) και την ολική επιβίωση (B) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

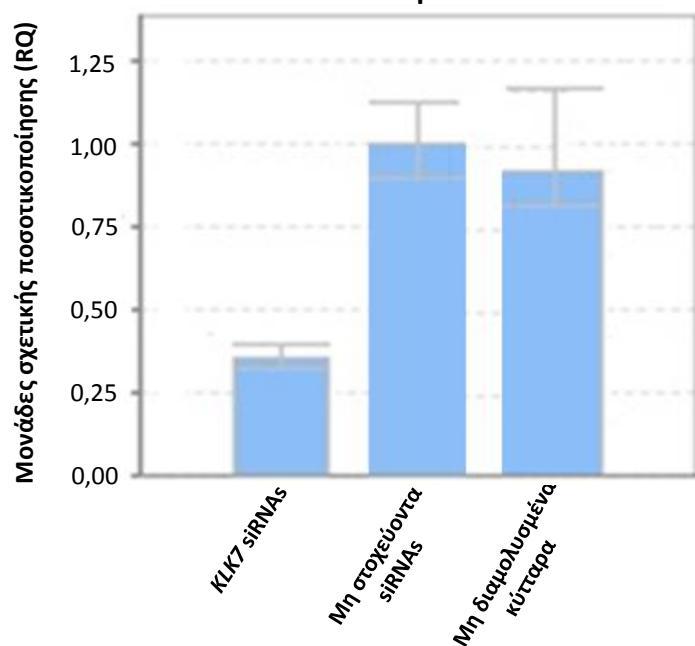
4.5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΜΕ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ RNA

Η αποσιώπηση (silencing) της έκφρασης των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* έγινε με παροδική διαμόλυνση (transient transfection) κυττάρων με μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (siRNAs) στην κυτταρική σειρά HCT 116 για το γονίδιο *KLK7* και στην κυτταρική σειρά DLD-1 για το γονίδιο *KLK14*. Η κάθε κυτταρική σειρά επιλέχθηκε διότι, επειδή υπερ-εκφράζει το αντίστοιχο γονίδιο στο επίπεδο του mRNA, όπως φάνηκε στα πειράματα PCR. Η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης προσδιορίστηκε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε επίπεδο mRNA και με ανοσοαποτύπωση Western σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των κυττάρων HCT 116 και DLD-1 προσδιορίστηκε και η έκφραση mRNA των αντίστοιχων γονιδίων σε μη διαμολυσμένα κύτταρα.

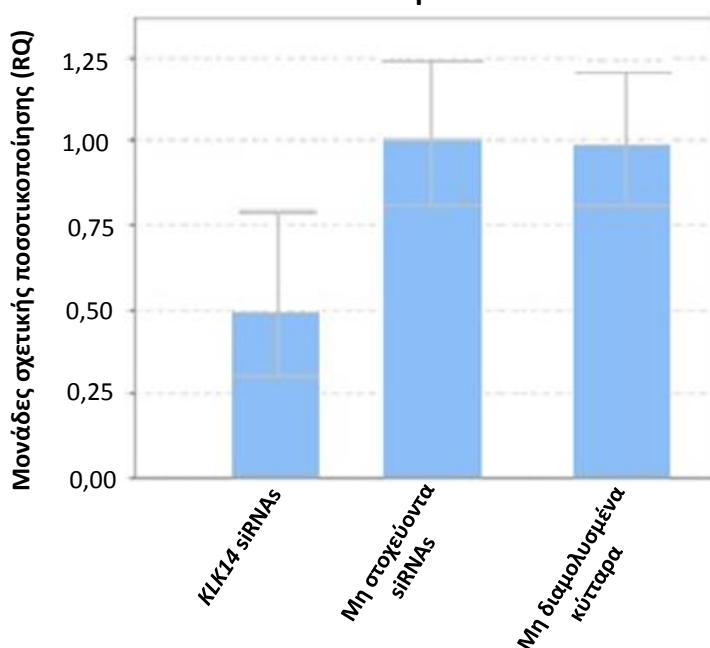
Τα ποσοστά καταστολής που επιτεύχθηκαν για την έκφραση κάθε γονιδίου σε επίπεδο mRNA παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.27. Επιτεύχθηκε περίπου 70% μείωση της σχετικής έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* σε κύτταρα HCT 116 που είχαν διαμολυνθεί

με *KLK7* siRNAs σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου HCT 116 που ήταν διαμολυσμένα με μη στοχεύοντα (Non-targeting) siRNAs (Εικόνα 4.27.A.). Για τη γονιδιακή έκφραση του *KLK14* επιτεύχθηκε περίπου 50% μείωση της σχετικής έκφρασης mRNA στα κύτταρα DLD-1 που είχαν διαμολυνθεί με *KLK14* siRNAs σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου DLD-1 που ήταν διαμολυσμένα με μη στοχεύοντα (Non-targeting) siRNAs (Εικόνα 4.27.B.).

A Σχετική ποσοτικοποίηση του *KLK7* mRNA στα κύτταρα HCT 116



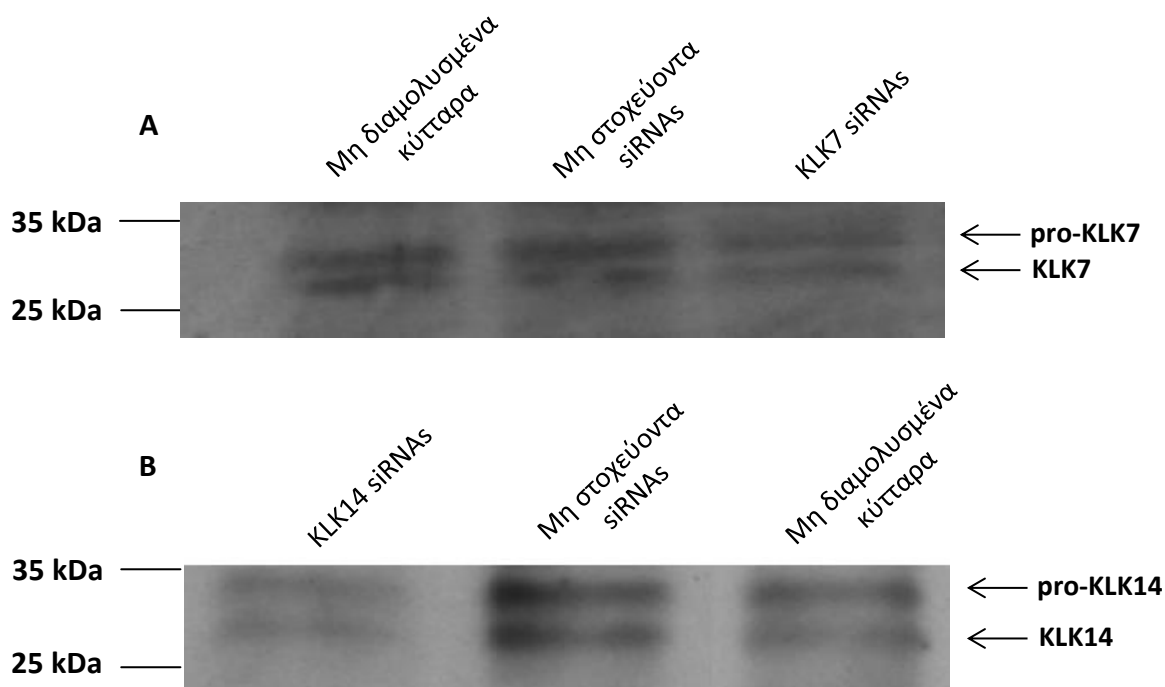
B Σχετική ποσοτικοποίηση του *KLK14* mRNA στα κύτταρα DLD-1



Εικόνα 4.27. Διαγράμματα σχετικού ποσοτικού προσδιορισμού (RQ units) της έκφρασης mRNA του γονιδίου *KLK7* στα κύτταρα HCT 116 (A) και *KLK14* στα κύτταρα DLD-1 (B) που είχαν διαμολυνθεί παροδικά με τα αντίστοιχα siRNAs, ως προς την έκφρασή τους στα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου που είχαν διαμολυνθεί παροδικά με μη στοχεύοντα (Non-targeting) siRNAs, όπου RQ=1.

Δεν παρατηρήθηκε μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μετά τη διαμόλυνση με τα siRNAs.

Η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων σε πρωτεϊνικό επίπεδο προσδιορίστηκε ποιοτικά με ανοσοαποτύπωση Western. Εμφανίζονται δυο ζώνες για κάθε πρωτεΐνη, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4.28. Η ζώνη ~ 28 kDa αντιπροσωπεύει την ώριμη μορφή της καλλικρεΐνης 7, ενώ η ζώνη με ~ 31 kDa αντιπροσωπεύει την πρόδρομη μορφή της, πριν την πρωτεολυτική απομάκρυνση του προ-πεπτιδίου (Εικόνα 4.28.A.). Ομοίως, η ζώνη ~ 29 kDa αντιπροσωπεύει την ώριμη μορφή της καλλικρεΐνης 14, ενώ η ζώνη ~ 33 kDa αντιπροσωπεύει την πρόδρομη μορφή της (Εικόνα 4.28.B.). Παρατηρήθηκε ασθενέστερο σήμα χημειοφωταύγειας των KLKs 7 και 14 σε κύτταρα στα οποία είχε κατασταλεί η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων, ιδιαίτερα για την KLK14.

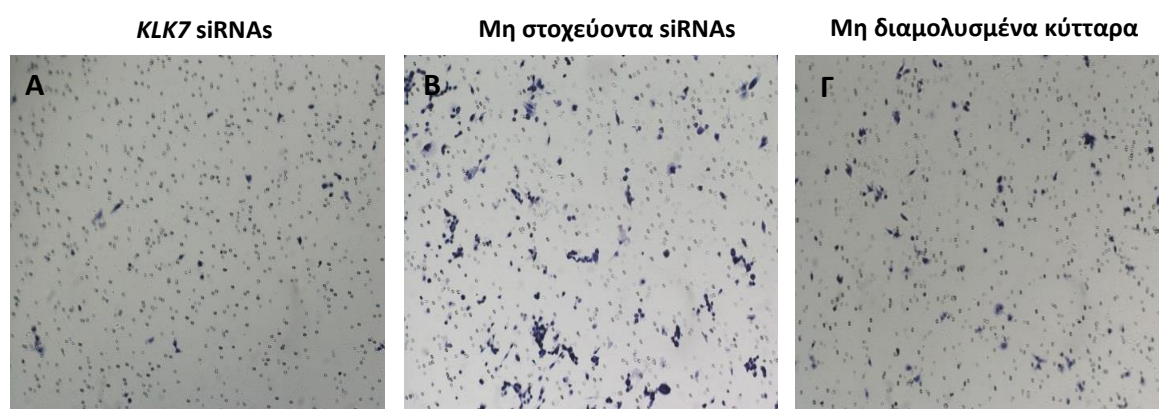


Εικόνα 4.28. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών KLK7 (A) και KLK14 (B) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου HCT 116 και DLD-1 αντίστοιχα, μετά από παροδική διαμόλυνση με *KLK7* siRNAs και *KLK14* siRNAs αντίστοιχα καθώς και με Non-targeting siRNAs (θετικοί μάρτυρες).

4.6. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *IN VITRO*

Για την εκτίμηση των μεταστατικών ιδιοτήτων των παροδικά διαμολυσμένων καρκινικών κυττάρων HCT 116 και DLD-1 εφαρμόστηκε η δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* (Invasion Assay) με τη χρήση της διάταξης BD BioCoat™ Growth Factor Reduced MATRIGEL™ Invasion Chamber (BD BioCoat™, Becton Dickinson Biosciences, CA, USA). Η διάταξη περιέχει το συνθετικό υπόστρωμα Growth Factor Reduced (GFR) Matrigel™ Matrix που προσομοιάζει στην βασική μεμβράνη των ιστών. Για την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των κυττάρων HCT 116 και DLD-1, υποβλήθηκαν στη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* και μη διαμολυσμένα κύτταρα από την κάθε κυτταρική σειρά. Τα παροδικά διαμολυσμένα (με *KLK7* ή *KLK14* siRNAs και με Non-targeting siRNAs, που ήταν οι θετικοί μάρτυρες) και τα μη διαμολυσμένα κύτταρα που διήθησαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™, βάφτηκαν, μονιμοποιήθηκαν, φωτογραφήθηκαν στο κεντρικό οπτικό πεδίο και καταμετρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

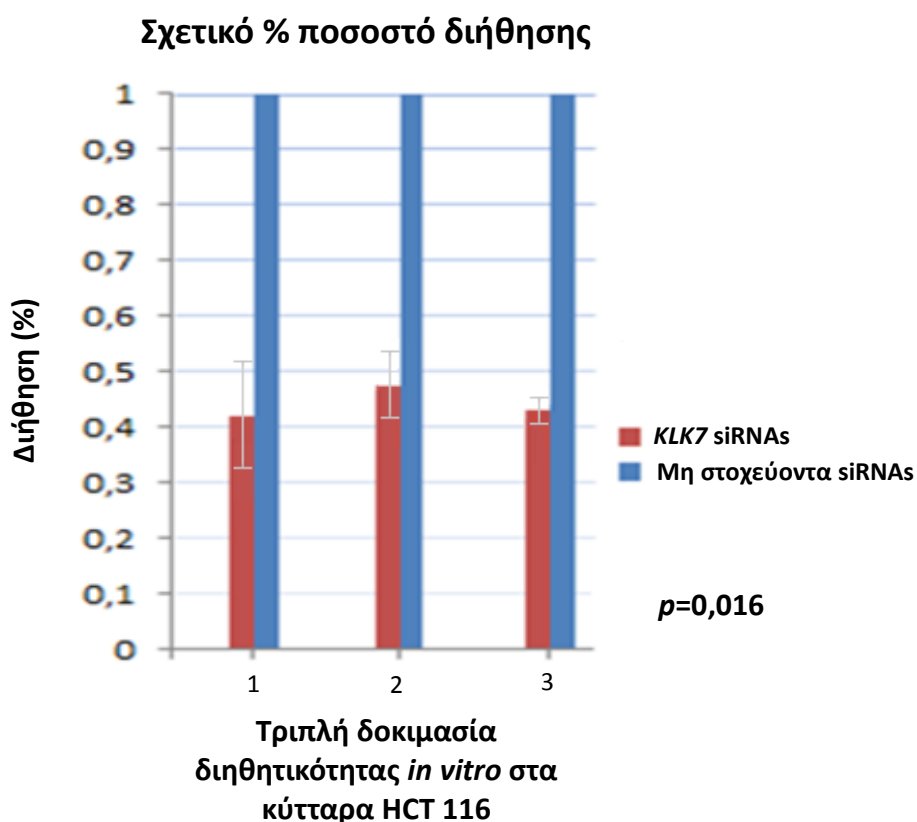
Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός κυττάρων HCT 116 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ ήταν μειωμένος μετά την παροδική διαμόλυνσή τους με *KLK7* siRNAs σε σύγκριση με τον αριθμό κυττάρων που διαπέρασαν το υπόστρωμα μετά την παροδική διαμόλυνση με μη στοχεύοντα siRNAs (Non-targeting siRNAs) (Εικόνες 4.29.A. και 4.29.B. αντίστοιχα). Η Εικόνα 4.29 δείχνει φωτογραφίες από μικροσκόπιο των κυττάρων HCT 116 που διήθησαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™.



Εικόνα 4.29. Φωτογραφίες μικροσκοπίου (Nikon TE) από τα μονιμοποιημένα και χρωματισμένα (μπλε) κύτταρα HCT 116 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ στη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* (μεγέθυνση 100X). (A) Κύτταρα διαμολυσμένα με *KLK7* siRNAs, (B) Κύτταρα διαμολυσμένα με Non-targeting siRNAs (θετικοί μάρτυρες) και (Γ) Μη διαμολυσμένα HCT 116 κύτταρα.

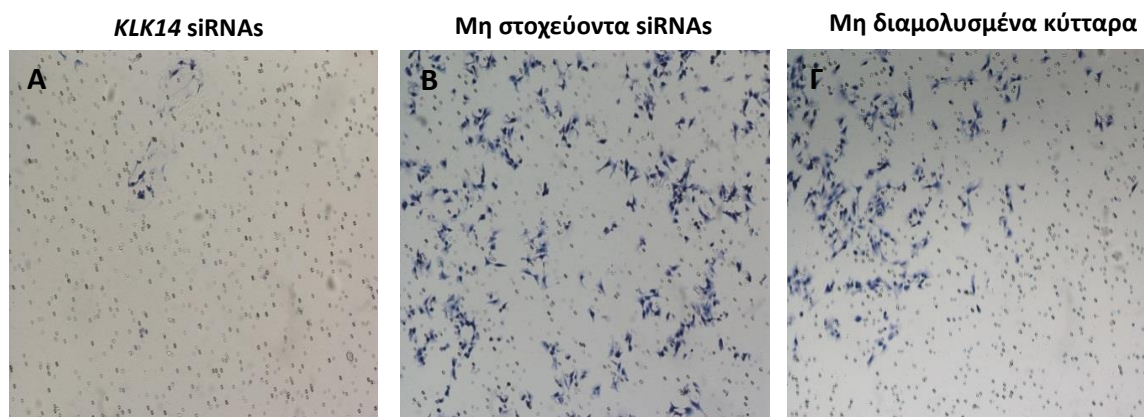
Υπολογίστηκε η ποσοστιαία σχετική διήθηση των κυττάρων HCT 116 ως προς τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου σε καθεμία από τις τρεις επαναλήψεις πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στατιστικά από τη δοκιμασία Student's t test.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0,016$) μεγαλύτερη του 50% στον αριθμό κυττάρων HCT 116 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ μετά την καταστολή του γονιδίου *KLK7* σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 4.30).



Εικόνα 4.30. Σημαντική μείωση (> 50%) του αριθμού κυττάρων HCT 116 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ μετά την καταστολή του γονιδίου *KLK7* σε αυτά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Η τιμή p υπολογίστηκε με το Student's t-test.

Ο αριθμός κυττάρων DLD-1 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ βρέθηκε, επίσης, μειωμένος μετά τη διαμόλυνση με *KLK14* siRNAs (Εικόνα 4.31.A.) σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με μη στοχεύοντα siRNAs (Εικόνα 4.31.B.), αλλά καταμετρήθηκαν μεγαλύτερες διαφορές από αυτές που βρέθηκαν μεταξύ των αντίστοιχων κυττάρων HCT 116. Η Εικόνα 4.31 δείχνει φωτογραφίες από μικροσκόπιο των κυττάρων DLD-1 που διήθησαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™.

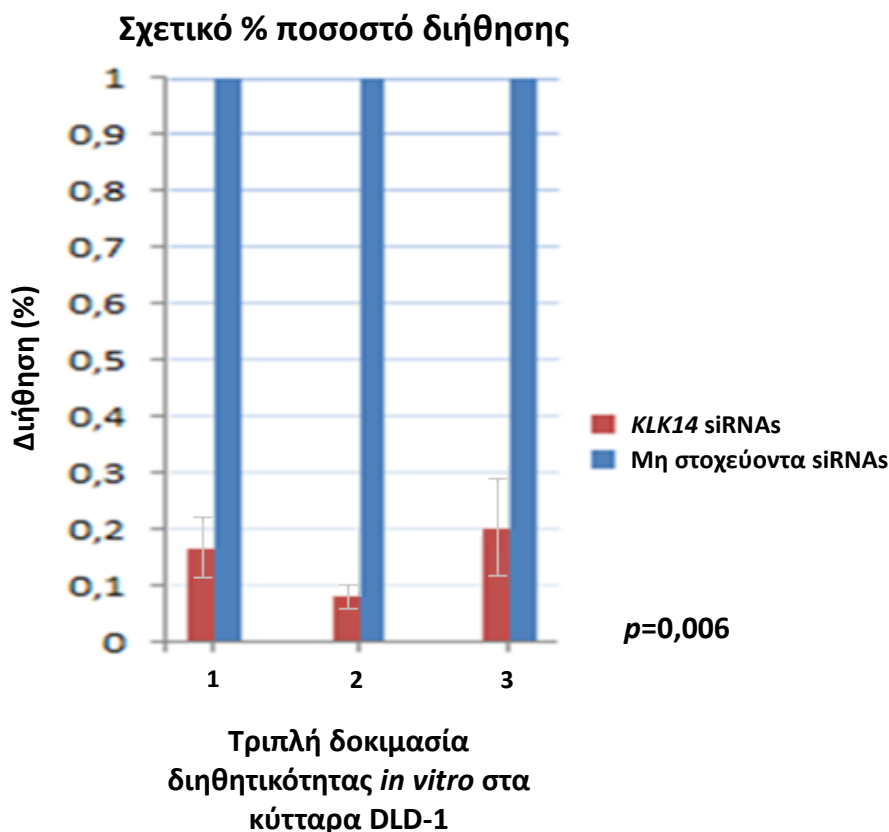


Εικόνα 4.31. Φωτογραφίες μικροσκοπίου (Nikon TE) από τα μονιμοποιημένα και χρωματισμένα (μπλε) κύτταρα DLD-1 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ στη δοκιμασία διηθητικότητας *in vitro* (μεγέθυνση 100X). (Α) Κύτταρα διαμολυσμένα με *KLK14* siRNAs, (Β) Κύτταρα διαμολυσμένα με Non-targeting siRNAs (θετικοί μάρτυρες) και (Γ) Μη διαμολυσμένα DLD-1 κύτταρα.

Υπολογίστηκε η ποσοστιαία σχετική διήθηση των κυττάρων DLD-1 ως προς τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου σε καθεμία από τις τρεις επαναλήψεις πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στατιστικά από τη δοκιμασία Student's t test.

Στα κύτταρα DLD-1 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p=0,006$) της τάξης του 80% στον αριθμό κυττάρων που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ μετά την καταστολή του γονιδίου *KLK14* σε αυτά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.32.

Συνεπώς, από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας διηθητικότητας, είναι εμφανές ότι η έκφραση των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σχετίζεται με την ικανότητα διήθησης των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στην εξωκυττάρια ουσία. Συγκεκριμένα, η έκφραση των *KLK7* και *KLK14* στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT 116 και DLD-1 αντίστοιχα, ενισχύει τον καρκινικό φαινότυπο, αφού μετά από καταστολή της μειώνεται σημαντικά η διήθηση που μπορούν να προκαλέσουν στην προσομοιασμένη βασική μεμβράνη των ιστών.

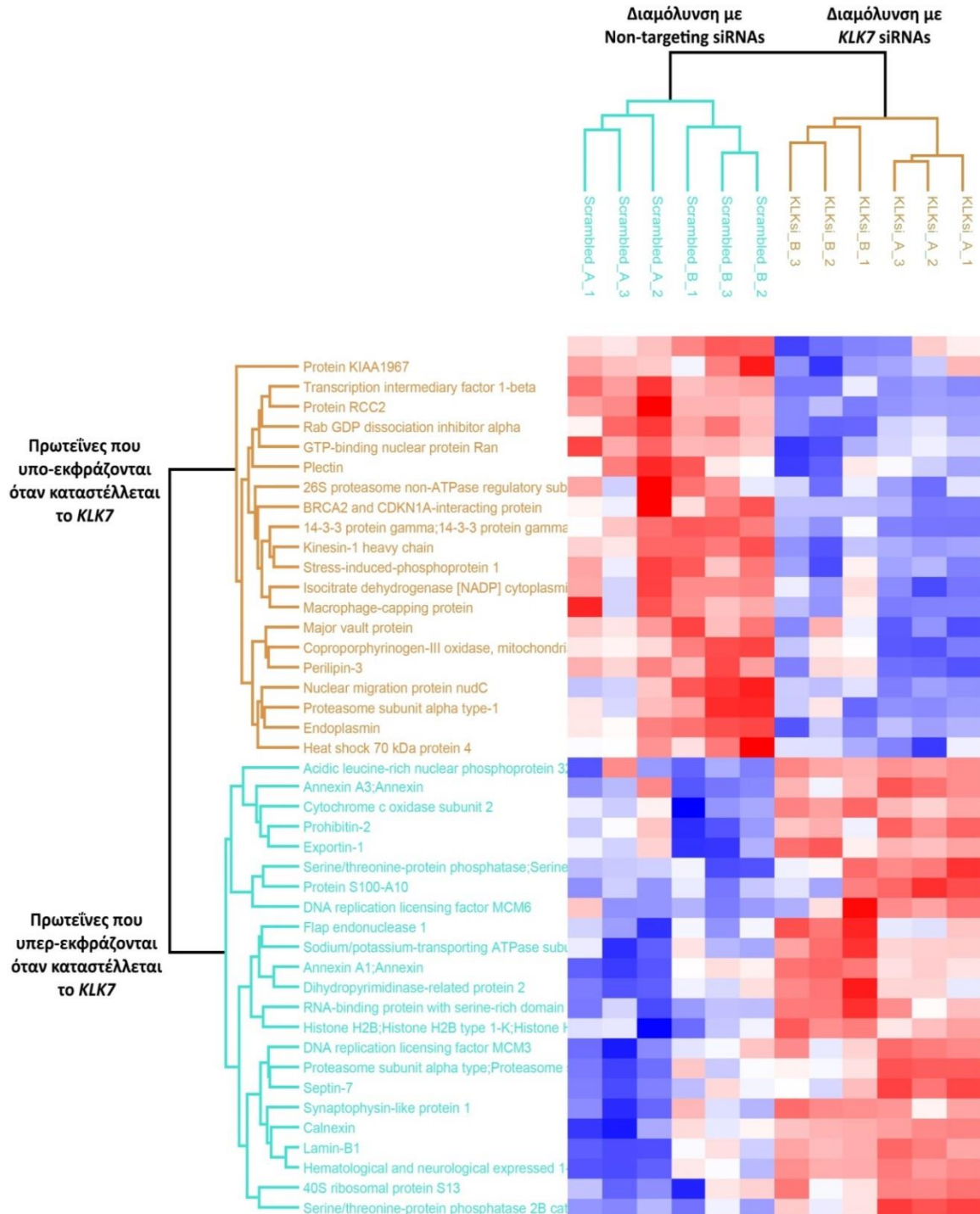


Εικόνα 4.32. Σημαντική μείωση (~ 80%) του αριθμού κυττάρων DLD-1 που διαπέρασαν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ μετά την καταστολή του γονιδίου *KLK14* σε αυτά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Η τιμή p υπολογίστηκε με το Student's t-test.

4.7. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

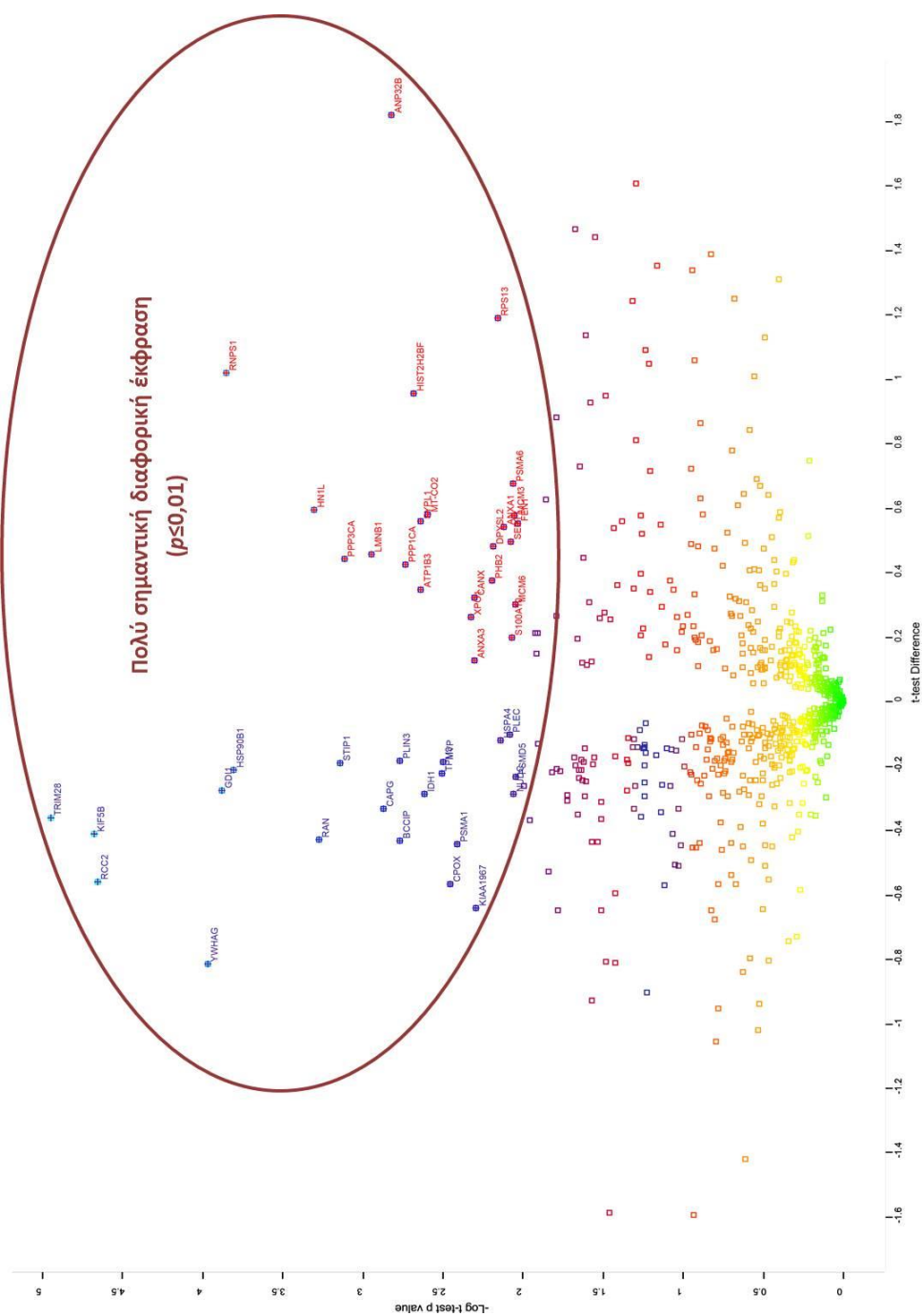
Τα κυτταρολύματα των κυττάρων HCT 116 που είχαν διαμολυνθεί με *KLK7* siRNAs και Non-targeting siRNAs αναλύθηκαν με τη μεθοδολογία της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρίας μάζας (nano-ultra HPLC-MS/MS) στον φασματογράφο ThermoScientific LTQ-Orbitrap XL. Τα φάσματα αναλύθηκαν με τους αλγόριθμους Βιοπληροφορικής Thermo Proteome Discoverer 1.4, Sequest (ThermoScientific, USA) και MaxQuant, Andromeda (Max Planck Institute, Germany) με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που προσδιορίστηκαν. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση με των αλγορίθμων Perseus. Αυτή η αλληλουχία τεχνικών είναι η ενδεδειγμένη για την Πρωτεομική ανάλυση, σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες (Molecular and

Cellular Proteomics). Προσδιορίστηκαν όλα τα δείγματα που είχαν υποστεί διαμόλυνση με *KLK7* και Non-targeting RNAi στο φασματογράφο μάζας από τρεις φορές το καθένα.



Εικόνα 33. Απεικόνιση (Hierarchical clustering) των 43 πρωτεϊνών που εμφανίζουν πολύ σημαντική ($p < 0,01$) διαφορετική έκφραση μετά την αποσίωψη του γονιδίου *KLK7* στα καρκινικά κύτταρα HCT 116. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι πρωτεΐνες με χαμηλή και με κόκκινο χρώμα οι πρωτεΐνες με υψηλή έκφραση (Perseus, Max Planck Institute, Germany).

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 1895 πρωτεΐνες, 43 εκ των οποίων είχαν πολύ σημαντική ($p < 0,01$) διαφορετική έκφραση μετά την αποσιώπηση του γονιδίου *KLK7* και παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.33 (Hierarchical clustering), 4.34 (Volcano plot) και 4.35.



Εικόνα 4.34. Απεικόνιση (Volcano plot) των πρωτεϊνών που εμφανίζουν πολύ σημαντική ($p < 0,01$) διαφορετική έκφραση μετά την αποσιώπηση του γονιδίου *KLK7* στα καρκινικά κύτταρα HCT 116. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε κύκλο είναι οι 43 που παρουσίασαν πολύ σημαντική διαφορά στην έκφρασή τους. Στην αριστερή πλευρά του γραφήματος βρίσκονται οι πρωτεΐνες με μειωμένη έκφραση και στη δεξιά πλευρά εκείνες με αυξημένη έκφραση μετά την αποσιώπηση του γονιδίου *KLK7*.

Με το πρόγραμμα Βιοπληροφορικής Perseus δημιουργήθηκε το γράφημα (Volcano plot) της Εικόνας 4.34, που απεικονίζει τη διασπορά της διαφορικής έκφρασης που παρατηρήθηκε στις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, μεταξύ των δυο ομάδων διαμολυσμένων κυττάρων HCT 116.

Στους Πίνακες 4.17 και 4.18 καταγράφονται οι 43 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας και εμφάνισαν τη μέγιστη διαφορική έκφραση μεταξύ των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με *KLK7* siRNAs και εκείνων που διαμολύνθηκαν με μη στοχεύοντα siRNAs. Επίσης, στην τελευταία στήλη του κάθε Πίνακα αναγράφεται η βιολογική λειτουργία στην οποία εμπλέκεται κάθε πρωτεΐνη.

Πίνακας 4.17. Πρωτεΐνες με σημαντικά μειωμένη έκφραση στα κύτταρα HCT 116 στα οποία είχε κατασταλεί η έκφραση του γονιδίου *KLK7*.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HCT 116 ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΜΕ <i>KLK7</i> siRNAs			
Όνομα πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε	UniProt	Γονίδιο	Βιολογική λειτουργία
Protein KIAA 1967	Q8N163	KIAA1967	Κυτταρικός κύκλος, Απόπτωση
Transcription intermediary factor 1-beta	Q13263	TRIM28	Μεταγραφική ρύθμιση
Protein RCC2	Q9P258	RCC2	Κυτταρικός κύκλος, Μίτωση
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	P31150	GDI1	Μοριακή σηματοδότηση πρωτεϊνών Rab
GTP-binding nuclear protein Ran	P62826	RAN	Κυτταρικός κύκλος, Μίτωση
Plectin	Q15149	PLEC	Απόπτωση
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	Q16401	PSMD5	Παύση κυτταρικού κύκλου
BRCA2 and CDKN1A-interacting protein	Q9P287	BCCIP	Επιδιόρθωση βλαβών DNA
14-3-3 protein gamma	P61981	YWHAQ	Επαγωγή μίτωσης
Kinesin 1 heavy chain	P33176	KIF5B	Κυτταρικός μεταβολισμός
Stress-induced-phosphoprotein 1	P31948	STIP1	Κυτταρική απόκριση σε στρες
Isocitrate dehydrogenase [NADP], cytoplasmic	O75874	IDH1	Κυτταρικός μεταβολισμός
Macrophage-capping protein	P40121	CAPG	Κάλυψη άκρων ινιδίων ακτίνης
Major vault protein	Q14764	MVP	Μεταφορά mRNA και πρωτεϊνών
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	P36551	CPOX	Βιοσύνθεση αίμης
Perilipin-3	O60664	PLIN3	Μεταφορά πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα Golgi
Nuclear migration protein nudC	Q9Y266	NUDC	Κυτταρικός κύκλος, Μίτωση
Proteasome subunit alpha type-1	P25786	PSMA1	Ανοσία, Αντι-φλεγμονώδης δράση
Heat shock protein 90kDa beta member 1 (Endoplasmic)	P14625	HSP90B1	Κυτταρικό εκκριτικό μονοπάτι πρωτεϊνών
Heat shock 70kDa protein 4 (Hsp70)	Q9BUK9	HSPA4	Κυτταρική απόκριση σε στρες

Παρατηρήθηκε ότι αρκετές από τις πρωτεΐνες που εμφάνισαν σημαντικά μειωμένη έκφραση μετά από την αποσιώπηση του *KLK7* στα καρκινικά κύτταρα HCT 116,

εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, στη μίτωση ή στην απόπτωση (Protein KIAAA1967, Protein RCC2, GTP-binding nuclear protein Ran, Plectin, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5, 14-3-3 protein gamma, Nuclear migration protein nudC) και άλλες εμπλέκονται στην απόκριση σε κυτταρικό στρες (Stress-induced-phosphoprotein 1, Heat shock protein 90kDa beta member 1/Endoplasmic reticulum chaperone, Heat shock 70kDa protein 4/Hsp70).

Πίνακας 4.18. Πρωτεΐνες με σημαντικά αυξημένη έκφραση στα κύτταρα HCT 116 στα οποία είχε κατασταλεί η έκφραση του γονιδίου *KLK7*.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HCT 116 ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΜΕ <i>KLK7</i> siRNAs			
Όνομα πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε	UniProt	Γονίδιο	Βιολογική λειτουργία
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	Q92688	ANP32B	Κυτταρική επιβίωση
Annexin A3	P12429	ANXA3	Λειτουργία κυτταρικών μεμβρανών
Cytochrome c oxidase subunit 2	P00403	MT-CO2	Αναπνευστική αλυσίδα (μεταφορά e ⁻)
Prohibitin-2	Q99623	PHB2	Μεταγραφική ρύθμιση
Exportin-1	O14980	XPO1	Διαπυρηνική μεταφορά πρωτεϊνών
Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha	Q08209	PPP3CA	Κυτταρικός κύκλος, μετάβαση G1/S
Protein S100-A10	P60903	S100A10	Κυτταρική απόκριση παρουσία οξέος
DNA replication licensing factor MCM6	Q14566	MCM6	Κυτταρικός κύκλος, αντιγραφή DNA
Flap endonuclease 1	P39748	FEN1	Επιδιόρθωση και αντιγραφή DNA
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	P54709	ATP1B3	Μεταφορά ιόντων νατρίου/καλίου
Annexin A1	P04083	ANXA1	Λειτουργία κυτταρικών μεμβρανών
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Q16555	DPYSL2	Οργάνωση κυτταροσκελετού
RNA-binding protein with serine-rich domain 1	Q15287	RNPS1	Εναλλακτικό μάτισμα mRNA
Histone H2B type 2-F	Q5QNW6	HIST2H2BF	Οργάνωση νουκλεοσώματος
DNA replication licensing factor MCM3	P25205	MCM3	Κυτταρικός κύκλος, αντιγραφή DNA
Proteasome subunit alpha type-6	P60900	PSMA6	Κυτταρικός κύκλος, μετάβαση G1/S
Septin-7	Q16181	SEPT7	Κυτταρικός κύκλος, Μίτωση
Synaptophysin-like protein 1	Q16563	SYPL1	Συναπτική διαβίβαση
Calnexin	P27824	CANX	Πρωτεϊνική αναδίπλωση
Lamin-B1	P20700	LMNB1	Απόπτωση
Hematological and neurological expressed 1-like protein	Q9H910	HN1L	Διαμεμβρανική μεταφορά
40S ribosomal protein S13	P62277	RPS13	Ριβοσωμική πρωτεΐνη
Serine/threonine-protein phosphatase PP1 catalytic subunit alpha	P62136	PPP1CA	Κυτταρικός κύκλος, Μίτωση

Παρατηρήθηκε ότι αρκετές από τις πρωτεΐνες που εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη έκφραση μετά από την αποσιώπηση του *KLK7* στα καρκινικά κύτταρα HCT 116,

εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B, Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform, DNA replication licensing factor MCM6, Flap endonuclease 1, DNA replication licensing factor MCM3, Proteasome subunit alpha type-6, Septin-7, Lamin-B1, Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit) δρώντας είτε επαγωγικά είτε ανασταλτικά σε αυτόν. Επίσης, με αυξημένη έκφραση βρέθηκαν δυο μέλη της οικογένειας των Αννεξινών (Annexin A3, Annexin A1), που συμμετέχουν στην οργάνωση κυτταρικών μεμβρανών και στη διαμεμβρανική μεταφορά, αλλά και διάφορες ακόμη πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο σε μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες (Cytochrome c oxidase subunit 2, Exportin-1, 40S ribosomal protein S13).



Εικόνα 4.35. Λεπτομέρεια της απεικόνισης Volcano plot με κυκλωμένες τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp90kDa-B1 (ενδοπλασμίνη) και Hsp70kDa-4 που υπο-εκφράζονται πολύ σημαντικά και τις Αννεξίνες 1 και 3 καθώς και το αντι-αποπτωτική φωσφοπρωτεΐνη ANP32B που υπερ-εκφράζονται πολύ σημαντικά ($p < 0,01$) μετά την αποσιώπηση του γονιδίου *KLK7* στα καρκινικά κύτταρα HCT 116

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ιστικοί καρκινικοί δείκτες έχουν προταθεί ως πιθανοί προγνωστικοί δείκτες καθώς και δείκτες για εξατομικευμένες θεραπείες. Οι πρωτεάσες αποτελούν καλούς υποψήφιους προγνωστικούς ή διαγνωστικούς δείκτες, διότι ενέχονται στην εξέλιξη του καρκίνου είτε προάγοντας είτε αναστέλλοντας την (Anwar et al., 2004; López-Otín and Matrisian, 2007).

Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες (KIKs) αποτελούν μια υποοικογένεια από 15 δομικά ομόλογες εκκρινόμενες πρωτεάσες σερίνης της οικογένειας S1 της εξελικτικής ομάδας PA, τα γονίδια των οποίων εδράζονται σε στενή διαδοχή στο χρωμόσωμα 19q13.4 (Yousef and Diamandis, 2001; Diamandis and Yousef, 2002; Yousef and Diamandis, 2002β). Οι ιστικές καλλικρεΐνες συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, η αναδόμηση των ιστών και η αγγειογένεση (Borgoño and Diamandis, 2004; Smith et al., 2008), η απολέπιση και ομοιόσταση της κεράτινης στιβάδας του δέρματος (Borgoño et al., 2007; Eissa and Diamandis, 2008), η ρευστοποίηση του σπέρματος μετά την εκσπερμάτιση (Pampalakis and Sotiropoulou, 2007; Emami et al., 2008; Emami et al., 2009), η φυσιολογική ανάπτυξη των νευρώνων και των αστροκυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος, αλλά και η ομοιόσταση της μυελίνης (Yousef et al., 2003α; Scarisbrick et al., 2008; Burda et al., 2013), η ενεργοποίηση προ-ορμονών (Komatsu et al., 2007), ο σχηματισμός της αδαμαντίνης των δοντιών (Lu et al., 2008), η μη ειδική ανοσία (Sotiropoulou et al., 2009) και η φυσιολογία του κόλπου και του τραχήλου (Shaw and Diamandis, 2008α). Επίσης, εμπλέκονται σε καλοήθεις παθολογικές καταστάσεις, όπως νευροεκφυλιστικές και αυτοάνοσες νόσους (Scarisbrick et al., 2008; Takada et al., 2005) και στην εκδήλωση φλεγμονών (Two and Del Rosso, 2014). Οι καλλικρεΐνες δρουν είτε προωθώντας είτε αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών όγκων, την αγγειογένεση και τη μετάσταση, μέσω της ενεργοποίησης αυξητικών παραγόντων ή άλλων πρωτεασών, της έκκρισης αγγειογενετικών ή αντι-αγγειογενετικών παραγόντων και της άμεσης ή έμμεσης αποδόμησης συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Clements et al., 2004; Borgoño et al., 2004; López-Otín and Matrisian, 2007).

Το cDNA του γονιδίου *KLK7* (*PRSS6/HSCCE*) απομονώθηκε αρχικά από βιβλιοθήκη κερατινοκυττάρων και κωδικοποιεί για μια πρωτεάση σερίνης με ενεργότητα όμοια με της χυμοθρυψίνης, η οποία εντοπίστηκε στην κεράτινη στιβάδα του δέρματος και

θεωρήθηκε ως βασικό ένζυμο για την ομοίωση του δέρματος (Lundström and Egelrud, 1990; Hansson et al., 1994). Μελέτες αποκάλυψαν υπερ-έκφραση του *KLK7* σε ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους, όπως του μαστού, των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας και συσχετίσθη με δυσμενή πρόγνωση (Borgoño and Diamandis, 2004; Dong et al., 2003; Santin et al., 2004; Talieri et al., 2004; Holzschneider et al., 2006; Li et al., 2014; Dorn et al., 2014). Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *KLK7* υπερ-εκφράζεται και σε μη ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους, όπως του εγκεφάλου (Prezas et al., 2006β), του παγκρέατος (Dong et al., 2008), του παχέος εντέρου (Talieri et al., 2009α; Inoue et al., 2010) και του πνεύμονα, όπου υπερ-εκφράζεται ωστόσο μόνο στις περιπτώσεις μη μεταστατικής νόσου (Planque et al., 2005). Η υπερ-έκφραση του γονιδίου *KLK7* συντελεί στο μεταστατικό φαινότυπο του καρκίνου των ωοθηκών και του εγκεφάλου (Prezas et al., 2006α; Prezas et al., 2006β), στην ικανότητα πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου και στην εξάπλωση του καρκινικού όγκου στο παχύ έντερο *in vivo* (Walker et al., 2014).

Το γονίδιο *KLK14* (*KLK-L6*) απομονώθηκε αρχικά από την κεράτινη στιβάδα του πέλματος και πιθανόν ευθύνεται για το 50% περίπου της ολικής ενεργότητας θρυψίνης στην πελματική κεράτινη στιβάδα (Stefansson et al., 2006). Κωδικοποιεί για μια πρωτεάση σερίνης με διττή ενεργότητα θρυψίνης και χυμοθρυψίνης. Το *KLK14* έχει βρεθεί να υπερ-εκφράζεται στους καρκίνους του μαστού (Yousef et al., 2001; Fritzsche et al., 2006; Papachristopolou et al., 2011), των ωοθηκών (Borgoño et al., 2003; Zhang et al., 2012), του προστάτη και των όρχεων (Yousef et al., 2003γ; Borgoño et al., 2007β; Rabien et al., 2008) και του πνεύμονα (Planque et al., 2008) και έχει συσχετιστεί σε όλες τις περιπτώσεις με δυσμενή πρόγνωση. Επιπλέον, έχει δείχθει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης *KLK14* σε εκχυλίσματα ιστών καρκίνου παχέος εντέρου είναι ο δείκτης με την σημαντικότερη στατιστική συσχέτιση με τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών από όλες τις καλλικρεΐνες που εξετάστηκαν (Talieri et al., 2009β). (Yousef et al., 2002; Borgoño et al., 2003; Yousef et al., 2003β; Yousef et al., 2003γ; Fritzsche et al., 2006; Borgoño et al., 2007β; Rabien et al., 2008; Papachristopolou et al., 2011).

Οι καλλικρεΐνες 7 και 14 είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε πρωτεολυτικούς καταρράκτες αντιδράσεων στην κεράτινη στιβάδα του δέρματος (Brattsand et al., 2005), στο πλάσμα του σπέρματος (Emami and Diamandis, 2008) και πιθανά και σε άλλους

ιστούς. Επίσης, έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι τα γονίδια *KLK5* και *KLK7* συν-εκφράζονται στον καρκίνο του μαστού (Li et al., 2009; Talieri et al., 2011).

Σκοπός της παρούσας Διατριβής είναι η ανάλυση και η κλινική αξιολόγηση της έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε καρκινικούς και μη καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου, η ανάλυση των mRNA μεταγράφων των δυο γονιδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και ιστούς, καθώς και η διερεύνηση του βιολογικού τους ρόλου στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

5.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Στην παρούσα Διατριβή προσδιορίστηκε ποιοτικά η έκφραση mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* στις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου HT-29, HCT 116, LS 180, DLD-1 και Caco2 με RT-PCR. Η έκφραση των δυο γονιδίων είναι σε συμφωνία με τους Inoue και συν. (2010), Walker και συν. (2014) και Gratio και συν. (2011) στις ίδιες κυτταρικές σειρές (Inoue et al., 2010; Gratio et al, 2011; Walker et al., 2014). Μόνη διαφορά παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά HT-29, στην οποία βρέθηκε υψηλή έκφραση του *KLK7*, ενώ οι Inoue και συν. (2010) και Walker και συν. (2014) αναφέρουν ότι έχει ασθενή έκφραση (Inoue et al., 2010; Walker et al., 2014). Βέβαια, η PCR μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της έκφρασης του *KLK7* σε όλες αυτές τις μελέτες είναι μόνο ποιοτική. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε όλες τις μελέτες που προαναφέρθηκαν, όπως και στη Διατριβή, καταδεικνύεται ότι η καρκινική κυτταρική σειρά Caco2, που χαρακτηρίζεται από καλά διαφοροποιημένα εντεροκύτταρα με πολικότητα σε καλλιέργεια, εμφανίζει πολύ χαμηλότερη έκφραση των *KLK7* και *KLK14*, συγκριτικά με άλλες καρκινικές σειρές υψηλού βαθμού κακοήθειας, όπως οι HCT 116 και DLD-1.

5.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το γονίδιο *KLK7* παράγει 4 γνωστά έως σήμερα εναλλακτικά mRNA μετάγραφα (GenBank: NM_005046.3 *KLK7* μετάγραφο 1, NM_139277.2 *KLK7* μετάγραφο 2,

NM_001207053.1 *KLK7* μετάγραφο 3 και NM_001243126.1 *KLK7* μετάγραφο 4), ενώ το γονίδιο *KLK14* μόνο ένα (GenBank NM_022046.4). Τα mRNA μετάγραφα των δυο γονιδίων εντοπίστηκαν ποιοτικά με RT-PCR στις προαναφερθείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές και αφού ταυτοποιήθηκαν με αλληλουχοποίηση, προσδιορίστηκαν ημι-ποσοτικά με RT-PCR σε δεξαμενές cDNA (cDNA pools) από δείγματα ιστών, που είχαν ομαδοποιηθεί με βάση τον ιστολογικό τους τύπο (φυσιολογικός, αδενωματώδης, καρκίνος *in situ* και καρκίνοι σταδίων TNM I, II, III και IV). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αντίστοιχη δημοσιευμένη μελέτη ανάλυσης των mRNA μεταγράφων των δυο αυτών γονιδίων στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου που μελετήθηκαν, εκφράζονται τα μετάγραφα 1, 2 και 3 του *KLK7*, αλλά όχι το μετάγραφο 4. Εντοπίστηκε έντονη έκφραση των *KLK7* μεταγράφων 1 και 2 σε όλες αυτές τις κυτταρικές σειρές, πλην της Caco2, ενώ το *KLK7* μετάγραφο 3 έχει έντονη έκφραση σε κάποιες από αυτές (HCT 116, Caco2, HT-29) και ασθενή σε άλλες (DLD-1, LS 180). Από τη μελέτη στις δεξαμενές cDNA από ιστούς φάνηκε ότι η έκφραση των μεταγράφων 1 και 2 του *KLK7*, τα οποία μεταφράζονται παράγοντας την ίδια πρωτεϊνική ισομορφή, είναι σταθερά αυξημένη κατά την ιστολογική μετάβαση από το φυσιολογικό ιστό στην αδενωματώδη δυσπλασία και στο αδενοκαρκίνωμα, εμφανίζοντας ωστόσο κάποια διακύμανση. Αντίθετα, η έκφραση του *KLK7* μεταγράφου 3, το οποίο μεταφράζεται παράγοντας μια μη λειτουργική πρωτεΐνη με έλλειψη της ιστιδίνης του ενεργού κέντρου των καλλικρεϊνών, εμφανίζει την υψηλότερη τιμή της στα φυσιολογικά δείγματα, βαθμιαία μειώνεται και τελικά χάνεται κατά την πορεία της καρκινικής εξαλλαγής. Έχει προταθεί ότι η ενεργότητα των καλλικρεϊνών πιθανά ρυθμίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις από την παραγωγή πολλαπλών εναλλακτικών μεταγράφων που οδηγούν κυρίως σε ανενεργές πρωτεϊνικές ισομορφές (Kurlender et al., 2005). Κάτι τέτοιο μπορεί να ισχύει για το *KLK7* μετάγραφο 3, αφού εκφράζεται κυρίως στο φυσιολογικό ιστό και συνεπώς πιθανότατα έχει ένα φυσιολογικό λειτουργικό ρόλο. Το *KLK7* μετάγραφο 4 δεν εκφράζεται στις δεξαμενές cDNA παχέος εντέρου. Από τις παρατηρήσεις αυτές φαίνεται ότι για τα μετάγραφα 1, 2, και 3 του *KLK7* θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής σημασίας τους ως δεικτών στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε μεγάλο

αριθμό ιστών και κλινική αξιολόγηση, καθώς και επιπλέον διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου του *KLK7* μεταγράφου 3 στο παχύ έντερο.

Το μοναδικό γνωστό mRNA μετάγραφο του *KLK14* εκφράζεται έντονα στις καρκινικές κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν, εκτός της Caco2, στην οποία εκφράζεται ασθενώς. Κατά τη μελέτη του μεταγράφου αυτού εμφανίστηκε άλλη μία άγνωστη ζώνη cDNA μήκους περίπου 500 bp στις κυτταρικές σειρές HT-29, HCT 116, DLD-1 και LS 180. Η ζώνη αυτή απομονώθηκε και αλληλουχοποιήθηκε από την καρκινική κυτταρική σειρά DLD-1 και βρέθηκε πλήρης ομολογία της με το mRNA του γονιδίου *KLK14*. Η αλληλουχία αυτή όμως, έχει μικρότερο μήκος από το κλασικό mRNA του *KLK14*, καθώς φαίνεται να απουσιάζει από αυτήν το ενδιάμεσο κωδικό εξώνιο 5, αλλά υπάρχουν τα εξώνια 4 και 6, τα οποία πιθανώς συρράπτονται μεταξύ τους λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Στις δεξαμενές cDNA από ιστούς η έκφραση του κλασικού mRNA μεταγράφου του *KLK14* αυξάνεται κατά τη μετάβαση από φυσιολογικό ιστό σε αδένωμα, στο οποίο παρουσιάζει και την υψηλότερη έκφρασή του, ενώ στην πορεία της νόσου εμφανίζει ελαφρώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό. Αυτή η παρατήρηση ίσως δείχνει ότι το κλασικό *KLK14* μετάγραφο παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της νεοπλασματικής εξαλλαγής.

Το νέο *KLK14* μετάγραφο δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό ιστό αλλά εντοπίστηκε ασθενής έκφρασή του στα αδενώματα και στα καρκινώματα *in situ* και πιο έντονη στα καρκινώματα σταδίου TNM III. Η νέα αυτή mRNA ισομορφή του γονιδίου *KLK14* ίσως να αποτελεί προϊόν απορρυθμισμένου εναλλακτικού ματίσματος στα καρκινικά κύτταρα. Αν το νέο mRNA του *KLK14* μεταφράζεται, θα οδηγεί στην παραγωγή πρωτεΐνης με απουσία του ασπαραγινικού καταλοίπου της καταλυτικής τριάδας του ενεργού κέντρου του ενζύμου, διότι η θέση κωδικοποίησής του βρίσκεται στο εξώνιο 5 που απουσιάζει. Συνεπώς, δεν θα έχει ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης και πιθανόν ούτε κάποια άλλη λειτουργικότητα. Ωστόσο, μπορεί το νέο αυτό μετάγραφο να εκφράζεται μόνο στον καρκίνο και όχι στο φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο, δηλαδή να είναι ειδικό για τον καρκίνο (cancer-specific), αφού δεν εντοπίστηκε έκφρασή του στη δεξαμενή cDNA του φυσιολογικού ιστού. Το εύρημα αυτό, όμως, απαιτεί επικύρωση σε ικανό αριθμό ιστών και στη συνέχεια κλινική αξιολόγηση της έκφρασής του. Τα καρκίνο-ειδικά (cancer-specific) μετάγραφα μπορεί να παράγουν μοναδικές πρωτεϊνικές ισομορφές οι οποίες,

αν εκκρίνονται σε βιολογικά υγρά, πιθανόν να έχουν χρησιμότητα ως νέοι μοριακοί δείκτες καρκίνου (Borgoño and Diamandis, 2004; Tan et al., 2006).

Η παραγωγή εναλλακτικών *KLK* μεταγράφων, από τα οποία λείπουν εξώνια που κωδικοποιούν για ένα ή περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας, είναι ένα σύνηθες φαινόμενο στη γονιδιακή οικογένεια των καλλικρεϊνών. Αν ακολουθεί μετάφραση αυτών των μεταγράφων, τότε θα οδηγεί στην παραγωγή κολοβωμένων πρωτεϊνικών ισομορφών που δεν διαθέτουν ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης. Δεν είναι γνωστό αν τα κολοβωμένα εναλλακτικά *KLK* μετάγραφα ασκούν κάποια ρύθμιση σε επίπεδο mRNA ή παράγουν πρωτεϊνικές ισομορφές με κάποιο ρυθμιστικό ή άλλο λειτουργικό ρόλο ή αν είναι απλώς προϊόντα απορρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος στα πλαίσια της γενικότερης απορρυθμισμένης λειτουργίας πολλών μηχανισμών στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, λόγω της εκτεταμένης παρουσίας πολλαπλών τέτοιων mRNA ισομορφών της οικογένειας των καλλικρεϊνών, θεωρείται πιθανός κάποιος ρυθμιστικός ρόλος τουλάχιστον για ορισμένα από αυτά (Kurlender et al., 2005; Michael et al., 2005; Tan et al., 2006).

5.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Στην παρούσα Διατριβή προσδιορίστηκε η έκφραση του συνόλου των mRNA μεταγράφων των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου σε 245 ιστούς παχέος εντέρου, οι οποίοι προέρχονταν από 175 ασθενείς του Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας». Οι 101 ιστοί ήταν καρκινικοί, για 70 από τους οποίους υπήρχε διαθέσιμος και φυσιολογικός (μη καρκινικός) εντερικός βλεννογόνο από τον ίδιο ασθενή επαρκώς διαχωρισμένος από τον όγκο σε απόσταση τουλάχιστον 10 cm (ζεύγη ιστών) και 74 αδενώματα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα δυο γονίδια έχουν σημαντική διαφορική έκφραση μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού, καθώς και μεταξύ καρκινικού και αδενωμάτωσης ιστού παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, τα δυο γονίδια υπερ-εκφράζονται στον καρκίνο και τα επίπεδα έκφρασής τους δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ καρκινικού και αδενωμάτωσης ιστού (AUC=0,669 για το *KLK7* και AUC=0,708 για το *KLK14*, $p<0,001$ και για τα δυο), με την έκφραση mRNA του *KLK14* να έχει πιο ισχυρή διακριτική ικανότητα.

Επίσης, τα δυο υπό εξέταση γονίδια συν-εκφράζονται σε μέτριο ή μικρό βαθμό και στους τρεις τύπους ιστού παχέος εντέρου που εξετάστηκαν, δηλαδή μεταβάλλουν την έκφρασή τους με τον ίδιο τρόπο (φυσιολογικοί ιστοί $rs=0,667$, $p<0,001$; αδενώματα $rs=0,373$, $p=0,001$; καρκινώματα $rs=0,478$, $p<0,001$). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας υψηλής έκφρασης του *KLK7* και του *KLK14* σε όγκους προχωρημένου σταδίου TNM ($p=0,004$ και $p=0,043$, αντίστοιχα), καθώς και σε ασθενείς με διήθηση στους λεμφαδένες ($p=0,015$ και $p=0,019$, αντίστοιχα), ενώ για κανένα από τα δυο γονίδια δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασής του με το βαθμό αποδιαφοροποίησης (grade) του όγκου. Η υψηλή έκφραση του *KLK14* βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου (DFS) και ολικής (OS) επιβίωσης ($p=0,003$ και $p=0,016$, αντίστοιχα) των ασθενών με καρκίνο, ενώ η υψηλή έκφραση του *KLK7* βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά μόνο με συντομότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση ($p=0,004$). Συνεπώς, η έκφραση mRNA τόσο του *KLK7* όσο και του *KLK14* θα μπορούσε να αποτελέσει υποψήφιο δείκτη που σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο στο παχύ έντερο, αλλά κανένας από τους δυο πιθανούς δείκτες δεν βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος (Devetzi et al., 2013).

Σε επίπεδο mRNA το γονίδιο *KLK7* έχει βρεθεί να υπερ-εκφράζεται στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου από τις ερευνητικές ομάδες Talieri και συν. (Talieri et al., 2009α) και Inoue και συν. (Inoue et al., 2010), ευρήματα που συμφωνούν με τα αποτελέσματα της Διατριβής (Devetzi et al., 2013). Σύμφωνα με τους Talieri και συν. (2009), οι οποίοι προσδιόρισαν την έκφραση mRNA του *KLK7* σε δείγματα καρκινικού ιστού παχέος εντέρου αλλά με ημι-ποσοτική μέθοδο RT-PCR, η υψηλή έκφραση του *KLK7* συσχετίζεται με μικρότερο χρόνο επιβίωσης DFS και OS των ασθενών (Talieri et al., 2009α). Από την άλλη πλευρά, οι Inoue και συν. (2010), οι οποίοι προσδιόρισαν την έκφραση mRNA του *KLK7* σε δείγματα καρκινικού και φυσιολογικού ιστού παχέος εντέρου με ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου, ανέφεραν συσχέτιση μόνο με μικρότερη OS επιβίωση, καθώς και συσχέτιση της υψηλής έκφρασης του *KLK7* με τη μετάσταση στη ήπαρ (Inoue et al., 2010). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση του *KLK7* σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο TNM του καρκίνου (Devetzi et al., 2013), εύρημα που συμφωνεί με τη μελέτη των Talieri και συν. (Talieri et al., 2009α), αλλά όχι και με τη μελέτη των Inoue και συν. (Inoue et al., 2010). Παρατηρούνται διαφορές στις

συσχετίσεις της έκφρασης του *KLK7* με την επιβίωση των ασθενών και με το στάδιο του καρκίνου μεταξύ των μελετών και της Διατριβής, όμως όλες συνηγορούν στην υπερ-έκφραση του γονιδίου *KLK7* στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στη συσχέτισή του με δυσμενή πρόγνωση της νόσου.

Στις προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες κλινικής αξιολόγησης της έκφρασης mRNA του *KLK7* στο παχύ έντερο δεν είχε συμπεριληφθεί αδενωματώδης ιστός, ο οποίος αντιπροσωπεύει το πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Για πρώτη φορά, λοιπόν, δείχθηκε ότι η έκφραση mRNA του *KLK7* στο σύνολο των μεταγράφων του, αυξάνεται σταδιακά κατά την ιστολογική μετάβαση από το φυσιολογικό ιστό στην αδενωματώδη δυσπλασία και στο αδenoκαρκίνωμα (Devetzi et al., 2013), λόγω της αυξημένης παρουσίας των *KLK7* μεταγράφων 1 και 2, όπως έδειξε η ανάλυση των *KLK7* μεταγράφων που έγινε στις δεξαμενές cDNA από ιστούς. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του *KLK7* δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού (AUC=0,669, $p<0,001$) με μικρή όμως σημασία (Devetzi et al., 2013).

Η έκφραση mRNA του γονιδίου *KLK14* σε καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου και η κλινική της σημασία στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν. Οι Gratio και συν. (2011) μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης *KLK14* σε τομές από φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου και αδenoκαρκινώματα με ανοσοϊστοχημεία (Gratio et al, 2011). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Διατριβής, τα ευρήματά τους ανέφεραν υπερ-έκφραση της *KLK14* στα αδenoκαρκινώματα σε αντίθεση με το φυσιολογικό ιστό, όπου δεν εντόπισαν χρώση της *KLK14* στα επιθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη των Talieri και συν. (2009), στην οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης εννέα καλλικρεϊνών, μεταξύ των οποίων οι *KLK7* και *KLK14*, σε κυτταρολύματα από καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου με ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση της *KLK14* μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού (Talieri et al., 2009β). Αυτές οι αναντιστοιχίες μεταξύ των μελετών πιθανότατα σχετίζονται με το γεγονός ότι τα επίπεδα mRNA ενός γονιδίου συχνά δεν αντανακλούν την αφθονία της αντίστοιχης πρωτεΐνης, κάτι που έχει παρατηρηθεί σε πληθώρα γονιδίων και οφείλεται στη ρύθμιση της έκφρασης στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή ή στο επίπεδο της μετάφρασης.

Στην παρούσα Διατριβή δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η έκφραση mRNA του *KLK14* στο σύνολο των μεταγράφων του, αυξάνεται σταδιακά κατά την ιστολογική μετάβαση από το φυσιολογικό ιστό στην αδενωματώδη δυσπλασία και στο αδενοκαρκίνωμα (Devetzi et al., 2013). Ωστόσο, στην ανάλυση των *KLK14* μεταγράφων που έγινε στις δεξαμενές cDNA από ιστούς, φάνηκε ότι το κλασικό μετάγραφο έχει αυξημένη έκφραση κυρίως στα αδενώματα και στα τελευταία στάδια του καρκίνου (TNM III και TNM IV) σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό (Εικόνα 4.9). Αυτό ίσως υποδηλώνει την παρουσία περισσότερων εναλλακτικών μεταγράφων του *KLK14* στον καρκίνο, πέραν του κλασικού, τα οποία συνεισφέρουν με την έκφρασή τους στο σύνολο του mRNA που προσδιορίστηκε ποσοτικά στους ιστούς. Ένα από αυτά είναι το νέο εναλλακτικό μετάγραφο *KLK14* που ταυτοποιήθηκε στην παρούσα Διατριβή και πιθανόν να υπάρχουν και άλλα που ακόμη δεν είναι γνωστά. Τα επίπεδα έκφρασης του συνολικού mRNA του *KLK14* δίνουν ισχυρότερη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού (AUC=0,708, $p<0,001$) από ότι τα μετάγραφα του *KLK7* (Devetzi et al., 2013). Συνεπώς, και τα δυο γονίδια θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης, όχι όμως ανεξάρτητοι, αλλά σε συνδυασμό με άλλες καλλικρεΐνες ή άλλους προγνωστικούς παράγοντες ή ως θεραπευτικοί στόχοι στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Είναι γνωστό ότι πολλά γονίδια καλλικρεΐνών συν-εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς και η έκφρασή τους απορρυθμίζεται συγχρονισμένα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα τα *KLK5* και *KLK7* στον καρκίνο του μαστού (Taliari et al., 2011). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει κοινό τρόπο ρύθμισης της έκφρασής τους και εμπλοκή τους σε κοινούς πρωτεολυτικούς καταρράκτες αντιδράσεων, οι οποίοι μπορεί να περιλαμβάνουν αποκλειστικά καλλικρεΐνες ή και άλλες πρωτεάσες. Πράγματι, η έκφραση των περισσότερων γονιδίων καλλικρεΐνών ρυθμίζεται μέσω σηματοδότησης από πυρηνικούς υποδοχείς και η ενεργοποίηση των KLK προενζύμων (ζυμογόνων) πραγματοποιείται μέσω πρωτεολυτικών μονοπατιών. Με τη σειρά τους, τα ώριμα ένζυμα συμμετέχουν στη ρύθμιση σημαντικών φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών, όπως η ρευστοποίηση του σπέρματος, η απολέπιση της κεράτινης στιβάδας του δέρματος, η μη ειδική άμυνα, ο νευρο-εκφυλισμός και η αποδόμηση και αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Sotiropoulou et al., 2009; Rampalakis and Sotiropoulou, 2007).

Η παράλληλη έκφραση των *KLK7* και *KLK14* σε όλα τα στάδια της μετάβασης του φυσιολογικού ιστού σε αδένωμα και τελικά σε αδενοκαρκίνωμα (Εικόνα 4.13), καθώς και η υπερ-έκφραση και των δυο γονιδίων στον καρκίνο (Devetzi et al., 2013), πιθανόν υποδηλώνουν την εμπλοκή των δυο αυτών ενζύμων σε κοινό πρωτεολυτικό μονοπάτι στο παχύ έντερο, κάτι που έχει δειχθεί στο παρελθόν για τις πρωτεάσες *KLK7* και *KLK14* στην κεράτινη στιβάδα του δέρματος όπου συμμετέχουν σε κοινό μονοπάτι κατά τη δερματική απολέπιση. Ίσως να συμβαίνει κάτι ανάλογο στο φυσιολογικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου, όπου είναι γνωστό ότι τα κύτταρα του επιφανειακού επιθηλίου ανανεώνονται τακτικά, καθώς εκπίπτουν στον αυλό του εντέρου ή οδηγούνται σε απόπτωση (Pinto and Clevers, 2005). Επίσης, είναι γνωστό ότι στον καρκίνο τα επιθηλιακά κύτταρα εκπίπτουν στον αυλό (exfoliation) με πολύ μεγαλύτερη μαζικότητα από ότι σε φυσιολογικές συνθήκες (Loktionov, 2007).

5.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *KLK7* ΚΑΙ *KLK14* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Οι καλλικρεΐνες εκφράζονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους εντός των ιστών. Αυτό σημαίνει ότι η ανάλυση της έκφρασής τους σε ολικό εκχύλισμα ιστού μπορεί μεν να δώσει μια συνολική επισκόπηση της έκφρασης στον ιστό αυτόν, αλλά θα πρέπει να συνοδεύεται και από πειράματα ανοσοϊστοχημείας που θα αποκαλύψουν και την εντόπισή τους σε συγκεκριμένα κύτταρα (Lawrence et al., 2010). Οι Petraki και συν. (2006) έδειξαν ότι στα σπλαχνικά όργανα οι καλλικρεΐνες εκφράζονται κυρίως από τα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα, γεγονός που συμβαδίζει με την έκκρισή τους σε μεγάλη ποικιλία βιολογικών υγρών (σπέρμα, μητρικό γάλα, ασκитικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, κ.α.) (Petraki et al., 2006).

Στην παρούσα Διατριβή προσδιορίστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών *KLK7* και *KLK14* με ανοσοϊστοχημεία σε 84 τομές παραφίνης (πάχους 5 μm) από καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου, καθώς και σε 4 τομές φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου (επαρκώς διαχωρισμένου από τον όγκο σε απόσταση τουλάχιστον 10 cm) και σε 4 τομές αδενωμάτων από ασθενείς του Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας».

Στο φυσιολογικό ιστό δεν παρατηρήθηκε έκφραση των δυο πρωτεασών στα επιθηλιακά κύτταρα, εκτός από κάποια ασθενή χρώση της KLK14 σε στρωματικά κύτταρα. Αντίθετα, στο νεοπλασματικό επιθήλιο, αδενωματώδες ή καρκινικό, και οι δυο πρωτεάσες εντοπίστηκαν με έντονη έκφραση, ιδιαίτερα προς την αυλική επιφάνεια αλλά και στο έκκριμα, εικόνα που συμβαδίζει με την εκκριτική τους φύση και είναι σε συμφωνία με τους Petraki και συν. (Petraki et al., 2006). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μέτρια χρώση σε στρωματικά κύτταρα, κυρίως φλεγμονώδη, των αδενωματωδών και καρκινικών ιστών που εξετάστηκαν. Η χρώση της KLK7 είναι διάχυτη κυτταροπλασματική περιπυρηνική, αλλά σε κάποιους ιστούς υψηλού βαθμού κακοήθειας βρέθηκε και μεμβρανική και εστιακά πυρηνική χρώση, εντόπιση που εξηγείται πιθανά λόγω της υπερβολικής έκφρασής της. Η χρώση της KLK14 είναι κοκκιώδης κυτταροπλασματική στον καρκίνο σε επιθηλιακά και φλεγμονώδη στρωματικά κύτταρα, αλλά ομοιογενής στα αδενώματα. Φάνηκε, λοιπόν, ότι το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14 εμφανίζει κατά βάση μεγάλη ομοιότητα κατά την ιστολογική μετάβαση στον καρκίνο, γεγονός που συμβαδίζει με την ανάλυση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

Η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε την αξιολόγηση της χρώσης των τομών, έδειξε ότι η έκφραση της KLK7 δεν σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (μέγεθος του όγκου, διήθηση στους παρακείμενους λεμφαδένες, στάδιο TNM της νόσου και βαθμό αποδιαφοροποίησης του ιστού) που εξετάστηκαν, ενώ η αυξημένη έκφραση της KLK14 βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά μόνο με το βαθμό αποδιαφοροποίησης του όγκου ($p=0,034$). Από την ανάλυση επιβίωσης η έκφραση της KLK7 αποδείχθηκε σημαντικός ανεξάρτητος δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για την ελεύθερη νόσου επιβίωση ($p=0,02$) και οριακά για την ολική επιβίωση ($p=0,054$) των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, ενώ η έκφραση της KLK14 δεν βρέθηκε να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση.

Οι παρατηρήσεις ως προς την εντόπιση των KLK7 και KLK14 είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών των Walker και συν. (2014) για την KLK7 και των Gratio και συν. (2011) και Chung και συν. (2012) για την KLK14 (Walker et al., 2014; Gratio et al., 2011; Chung et al., 2012), με πολύ μικρές αποκλίσεις. Συγκεκριμένα, οι Walker και συν. (2014), χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα anti-KLK7, όπως και στη Διατριβή, ανέφεραν ομοιόμορφα έντονη κυτταροπλασματική χρώση της KLK7 στο καρκινικό

επιθήλιο, αλλά όχι στο φυσιολογικό, καθώς και χρώση του δυσπλαστικού επιθηλίου σε περιοχές που συνορεύουν με τον καρκίνο (Walker et al., 2014). Οι Gratio και συν. (2011) και Chung και συν. (2012), χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα anti-KLK14, όπως και στη Διατριβή, ανέφεραν κυτταροπλασματική χρώση της KLK14 στο καρκινικό επιθήλιο και στο δυσπλαστικό βλεννογόνο, αλλά όχι στο επιθήλιο του φυσιολογικού ιστού, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Διατριβής (Gratio et al., 2011; Chung et al., 2012). Ωστόσο, στο φυσιολογικό ιστό εντόπισαν χρώση της KLK14 στο στρώμα και στον υποβλεννογόνο, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε κάποιον από τους 4 φυσιολογικούς ιστούς που συμπεριλήφθηκαν στη Διατριβή. Αυτή η διαφορά πιθανόν οφείλεται στο μικρό αριθμό τομών φυσιολογικού ιστού που εξετάστηκαν στη Διατριβή.

Δεν υπάρχει μέχρι σήμερα κάποια μελέτη που να αφορά στην κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των πρωτεϊνών KLK7 και KLK14 στον καρκίνο του παχέος εντέρου με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Στη μελέτη των Talieri και συν. (2009), στην οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης εννέα καλλικρεϊνών, μεταξύ των οποίων οι KLK7 και KLK14, σε κυτταρολύματα από καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς παχέος εντέρου με ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA, βρέθηκε σημαντική διαφορική έκφραση της KLK7 στον καρκίνο και συσχετίσθη με δυσμενή πρόγνωση, αλλά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση της KLK14 μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού (Talieri et al., 2009β). Τα ευρήματα των Talieri και συν. (2009) συμφωνούν με τα αποτελέσματα της Διατριβής ως προς την πιθανή σημασία της KLK7 ως βιοδείκτη, αφού και με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας βρέθηκε σημαντική προγνωστική αξία για την KLK7. Ωστόσο, τόσο στη Διατριβή όσο και στη μελέτη των Walker και συν. (2014) βρέθηκε αυξημένη έκφραση της KLK14 στον καρκίνο, αν και με μικρό αριθμό φυσιολογικών ιστών (Walker et al., 2014). Επίσης, οι Talieri και συν. (2009), ανέφεραν ότι η έκφραση της KLK14 σχετίζεται σημαντικά με την ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση των ασθενών ως δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης (Talieri et al., 2009β). Συμπερασματικά, λοιπόν, φαίνεται ότι σε επίπεδο πρωτεΐνης μόνο η KLK7 μπορεί να χρησιμεύσει ως ανεξάρτητος δείκτης πρόγνωσης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η έκφραση της KLK14 όχι, παρόλο που και αυτή εμφανίζει διαφορική έκφραση στον καρκίνο, όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της Διατριβής σε συμφωνία με τους Walker και συν. (Walker et al., 2014). Οι Walker και συν. (2014), αν και εξέτασαν μικρό αριθμό

ιστών (38) όχι ικανό για την εξαγωγή στατιστικών συμπερασμάτων, ανέφεραν ότι δεν παρατήρησαν αντιστοιχία της έκφρασης της KLK7 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που είχαν διαθέσιμες (στάδιο της νόσου, ιστολογικό τύπο και βαθμό αποδιαφοροποίησης) (Walker et al., 2014), σε συμφωνία με τα ευρήματα της Διατριβής. Όσον αφορά στη συσχέτιση της έκφρασης της KLK14 με τις παραμέτρους αυτές, δεν υπάρχει άλλη μελέτη που να την έχει εξετάσει.

5.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ KLK7 ΚΑΙ KLK14 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι η έκφραση των καλλικρεϊνών σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης απορρυθμίζεται στον καρκίνο. Έχει δειχθεί ότι οι καλλικρεΐνες επάγουν την ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου μέσω της πρωτεολυτικής διάσπασης των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τους αυξητικούς παράγοντες τύπου ινσουλίνης IGFs (IGFBPs). Η διάσπαση των IGFBPs οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση ενεργών IGFs, οι οποίοι επάγουν ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής μιτογόνων σημάτων που ρυθμίζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αναστέλλουν την απόπτωσή τους (Borgoño and Diamandis, 2004; Pampalakis and Sotiropoulou, 2007). Στην πορεία της καρκινογένεσης η αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) είναι κρίσιμο βήμα για τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Οι καλλικρεΐνες μπορούν να συμβάλλουν σε αυτή τη διαδικασία άμεσα, υδρολύοντας πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου που αποτελούν υποστρώματά τους (π.χ. φιβρονεκτίνη, φιβρινογόνο, λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου I, II, III, IV) ή έμμεσα με τη συμμετοχή τους σε πρωτεολυτικά μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν και άλλες πρωτεάσες (Borgoño et al., 2004; Karagiannis et al., 2010).

Ο λειτουργικός ρόλος της KLK7 σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, έχει διερευνηθεί σε διάφορους ιστούς, ιδιαίτερα στο δέρμα (Brattsand et al., 2005; Eissa and Diamandis, 2008), στο πάγκρεας (Ramani et al., 2008; Ramani and Haun, 2008β) και σε ορμονο-εξαρτώμενους ιστούς (Dong et al., 2003; Santin et al., 2004; Dorn et al., 2014). Η KLK7 διασπά πρωτεολυτικά την E-καδερίνη (Johnson et al., 2007), οπότε θεωρείται ότι ενέχεται στη μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα κατά την καρκινογένεση (Mo et al., 2010), τη δεσμοκολλίνη 1 και την κερατινοδεσμοσίνη των

κερατινοδεσμοσωμάτων (Brattsand et al., 2005) συμμετέχοντας στη φυσιολογική απολέπιση του δέρματος (Eissa and Diamandis, 2008), την προ-κασπάση 14 (Yamamoto et al., 2012), τη μεταλλοπρωτεάση MMP9 (Ramani et al., 2011) και τη φμπρονεκτίνη (Ramani and Haun, 2008α), οπότε συμβάλλει στην πέψη συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Ramani and Haun, 2008α). Ο ρόλος της KLK7 στο παχύ έντερο, ωστόσο, έχει παραμείνει κατά βάση ανεξερευνήτος. Μόνο στην πολύ πρόσφατη μελέτη των Walker και συν. (2014) δείχθηκε ότι η KLK7 προκαλεί σημαντική αύξηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HT-29 *in vitro* και στην αύξηση του όγκου *in vivo* σε πειραματόζωα στα οποία μεταμοσχεύτηκαν καρκινικά κύτταρα που υπερ-εκφράζουν την KLK7 (Walker et al., 2014).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας Διατριβής, μετά από καταστολή κατά 70% της έκφρασης του *KLK7* με τη μέθοδο RNAi, διαπιστώθηκε μείωση της τάξης του 50% στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT 116 για διήθηση στο υπόστρωμα GFR Matrigel™ ($p=0,016$), το οποίο ομοιάζει με τη βασική μεμβράνη των ιστών (Invasion assay). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία επίπτωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού μετά την αποσιώπηση με siRNAs της έκφρασης του ενζύμου στα κύτταρα HCT 116. Συνεπώς, φαίνεται ότι η έκφραση της *KLK7* συμβάλλει κυρίως στο διηθητικό δυναμικό των κυττάρων του παχέος εντέρου *in vitro* και δρα ενισχύοντας τον μεταστατικό φαινότυπο.

Η έκφραση του *KLK7* που δείχθηκε να αυξάνει κατά την εξέλιξη της νόσου (Devetzi et al., 2013) και η συμβολή της στο διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, συνηγούνται στη συμμετοχή της *KLK7* στην προώθηση της μικρο-διήθησης και της μετάστασης, μέσω της αποδόμησης συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως η φμπρονεκτίνη (Ramani and Haun, 2008α) ή πρωτεϊνών των δεσμοσωμάτων (Ramani et al., 2008) ή μέσω της μείωσης της βιτρονεκτίνης που συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση (Ramani and Haun, 2008β) ή ακόμη μέσω της συμμετοχής της στη μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα, όπως έχει δειχθεί στην περίπτωση του καρκίνου του παγκρέατος (Johnson et al., 2007). Τα δεδομένα της παρούσας Διατριβής συμφωνούν με τους Walker και συν. (2014) στο ότι η *KLK7* παίζει ρόλο στην προώθηση του καρκίνου στο παχύ έντερο.

Ο λειτουργικός ρόλος της KLK14 στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει διερευνηθεί από τις ερευνητικές ομάδες των Gratio και συν. (2011) και Chung και συν. (2012) (Gratio et al., 2011; Chung et al., 2012). Οι Gratio και συν. (2011) έδειξαν ότι η KLK14 επάγει την ενδοκύτωση του υποδοχέα πρωτεασών PAR2, η οποία συνοδεύεται από αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} και αυξημένη φωσφορυλίωση των κινασών MEK1/2 και ERK1/2, με αποτέλεσμα την επαγωγή μιτογόνων σημάτων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Gratio et al., 2011). Οι Chung και συν. (2012) πρότειναν ότι η KLK14 μέσω της ενεργοποίησης του PAR2, αποτελεί πιθανώς έναν αυτοκρινή και παρακρινή ρυθμιστή της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο (Chung et al., 2012). Επίσης, η KLK14 υδρολύει τις πρωτεΐνες φμπρονεκτίνη και κολλαγόνο τύπου I, II και III της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, καθώς και η λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου IV της βασικής μεμβράνης, συνεπώς πιθανότατα ενέχεται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας κατά τη διήθηση και μετάσταση του καρκίνου (Felber et al., 2005; Borrego et al., 2007β). Η KLK14 μπορεί να διασπάσει, ακόμη, τις πρωτεΐνες IGFBP-2 και IGFBP-3 που δεσμεύουν τους αυξητικούς παράγοντες IGFs, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των IGF-I και IGF-II, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων (Borrego et al., 2007β).

Στην παρούσα Διατριβή δείχθηκε ότι μετά από καταστολή κατά 50% της έκφρασης του *KLK14* με τη μέθοδο RNAi, διαπιστώθηκε ιδιαίτερα μεγάλη μείωση, της τάξης του 80%, στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου DLD-1 να διηθούν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ ($p=0,006$) (Invasion assay). Είναι γνωστό ότι η καρκινική κυτταρική σειρά DLD-1 χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό κακοήθειας (Duke's C). Δεν παρατηρήθηκε επίπτωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά την αποσιώπηση του *KLK14* με siRNAs. Επομένως, η έκφραση της KLK14 συμβάλλει πολύ σημαντικά στο διηθητικό δυναμικό των κυττάρων του παχέος εντέρου *in vitro* και φαίνεται να διαδραματίζει έναν ιδιαίτερο ρόλο στον καρκινικό φαινότυπο.

Η υπερ-έκφραση του *KLK14* κατά την πορεία του καρκίνου στο παχύ έντερο (Devetzi et al., 2013) και η σημαντική συμβολή της στο διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, υποδηλώνουν ένα ρόλο της KLK14 στη διήθηση και τη μετάσταση, μέσω της αποδόμησης συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της βασικής μεμβράνης, όπως η φμπρονεκτίνη, όλοι οι τύπου του κολλαγόνου και η λαμινίνη. Τα

δεδομένα που προέκυψαν στην παρούσα Διατριβή για την KLK14 φαίνεται να συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης που διατύπωσαν οι Chung και συν. (2012) ότι η KLK14 που παράγεται από όγκους του παχέος εντέρου προάγει την καρκινογένεση, μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων PARs και αντιπροσωπεύει έναν αυτοκρινή/παρακρινή ρυθμιστή της καρκινογένεσης (Chung et al., 2012).

Συμπερασματικά, και τα δυο ενζυμα συνδέονται με την αυξημένη διηθητικότητα και το μεταστατικό δυναμικό των όγκων που τα εκφράζουν.

5.6. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η αποσιώπηση του γονιδίου *KLK7* είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της συμπεριφοράς των κυττάρων όσον αφορά στη διηθητικότητά τους. Για τη διερεύνηση του κατά πόσο η μεταβολή αυτή αντανακλά μεταβολές στο πρωτεϊνικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων HCT 116, τα κυτταρολύματα των κυττάρων HCT 116 που είχαν διαμολυνθεί με *KLK7* siRNAs και με μη στοχεύοντα (Non-targeting) siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα ελέγχου, αναλύθηκαν με τη μεθοδολογία της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Έγινε ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που προσδιορίστηκαν και ακολούθησε στατιστική επεξεργασία. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 1895 πρωτεΐνες, 43 εκ των οποίων είχαν πολύ σημαντική διαφορική έκφραση ($p < 0,01$) μεταξύ δειγμάτων στα οποία αποσιωπήθηκε η έκφραση του γονιδίου *KLK7* και των δειγμάτων ελέγχου.

Μεταξύ των πρωτεϊνών με πολύ σημαντική μείωση της έκφρασής τους μετά την καταστολή του *KLK7* βρέθηκαν δυο μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins), τα HSP90B1 και HSPA4, τα οποία ενέχονται στην απόκριση σε κυτταρικό στρες. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόκριση σε κυτταρικό στρες υπερ-εκφράζονται στον καρκίνο διαδραματίζοντας αντι-αποπτωτικό ρόλο, πιθανά διότι διευκολύνουν τα καρκινικά κύτταρα να προσαρμόζονται στις συνθήκες του μικρο-περιβάλλοντός τους και να επιβιώνουν μέσα σε αυτό (Zorzi and Bonvini, 2011). Η μέγιστη μείωση έκφρασης παρατηρήθηκε στο μεταγραφικό συμπράγοντα TRIM28 (Transcription intermediary factor 1-beta), ο οποίος ρυθμίζει τη μεταγραφή μέσω της

παύσης της RNA πολυμεράσης II και της αναστολής της επιμήκυνσης σε πολλά γονίδια θηλαστικών (Bunch et al., 2014).

Αντίθετα, τη μέγιστη αύξηση έκφρασης μετά την καταστολή του *KLK7* εμφάνισε η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη ANP32B, η οποία προάγει την κυτταρική επιβίωση. Επίσης, σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε σε δυο μέλη της οικογένειας των αννεξινών, στις αννεξίνες 1 και 3, οι οποίες ρυθμίζονται από τα επίπεδα Ca^{2+} και είναι εξαρτώμενες από φωσφολιπίδια μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ενέχονται σε πληθώρα σημαντικών βιολογικών διαδικασιών, όπως η μεταγωγή σημάτων, η φαγοκυττάρωση και η φλεγμονή, αλλά και ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Πολλές αννεξίνες, μεταξύ των οποίων οι 1 και 3, απορρυθμίζονται στον καρκίνο και έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του όγκου, τη διήθηση και τη μετάσταση είτε προάγοντας ή αναστέλλοντας τον (Guo et al., 2013).

Συμπερασματικά, εντοπίστηκαν 43 πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται σημαντικά μετά την καταστολή της *KLK7*, οπότε φαίνεται ότι η έκφρασή τους συνδέεται με αυτήν. Καμία από τις πρωτεΐνες που προσδιορίστηκαν δεν έχει αναφερθεί να συμμετέχει σε κάποιο κοινό ενδοκυτταρικό μονοπάτι με την *KLK7*. Πρέπει, λοιπόν, να διαπιστωθεί αν υπάρχει άμεση σχέση ή σχέση εξάρτησης μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και της *KLK7* και μέσω ποιών ρυθμιστικών μηχανισμών ή αν η αποσιώπηση του *KLK7* προκαλεί μεταβολές σε σηματοδοτικά μονοπάτια, των οποίων η τελική επίπτωση είναι η μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών. Άλλωστε, η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων εντός των κυττάρων είναι τόσο μεγάλη που η απορρύθμιση της έκφρασης ή της δράσης ενός μορίου μπορεί να επηρεάζει με άμεσους ή εμμεσους τρόπους πληθώρα άλλων μορίων που συμμετέχουν σε διαφορετικές διαδικασίες. Τα ευρήματα της Πρωτεομικής ανάλυσης μπορούν να αποτελέσουν αφετηρία για τη μελλοντική διερεύνηση των σχέσεων της *KLK7* με τα μόρια που προσδιορίστηκαν, ώστε να διαλευκανθούν οι τυχόν αλληλεπιδράσεις τους και πιθανά να οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέων ρόλων του γονιδίου αυτού στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη του ρόλου των ιστικών καλλικρεϊνών 7 και 14 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Μαρίνα Ν. Δεβετζή

Διδακτορική Διατριβή

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου ή ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες στις Η.Π.Α. και είναι ένας από τους κυρίαρχους τύπους καρκίνου στις δυτικές βιομηχανοποιημένες χώρες. Οι ανθρώπινες ιστικές καλλικρεΐνες (KLKs) αποτελούν μια υποοικογένεια 15 εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης, οι οποίες κωδικοποιούνται από 15 δομικά όμοια γονίδια που εδράζονται σε στενή διαδοχή στο χρωμόσωμα 19q13.4. Κύρια θέση εντόπισής τους είναι το κυτταρόπλασμα των αδενικών επιθηλιακών κυττάρων, από όπου εκκρίνονται. Πληθώρα μελετών έχει δείξει ότι η έκφραση των καλλικρεϊνών σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης απορρυθμίζεται στον καρκίνο και έχει συσχετιστεί με την πρόγνωση, γι' αυτό οι καλλικρεΐνες έχουν προταθεί ως νέοι υποσχόμενοι βιοδείκτες καρκίνου ή ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι.

Η ανθρώπινη ιστική καλλικρεΐνη 7 (KLK7) είναι μια εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης με ειδικότητα χυμοθρυψίνης. Η μεταγραφή του γονιδίου *KLK7* παράγει 4 εναλλακτικά mRNA μετάγραφα, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την έλλειψη ενδιάμεσων κωδικών εξωνίων και τη δομή των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών τους. Το ώριμο ένζυμο συμμετέχει στον πρωτεολυτικό καταρράκτη αντιδράσεων κατά τη φυσιολογική απολέπιση του δέρματος, αλλά και στη μετάβαση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα και στην πέψη συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας κατά την καρκινογένεση.

Η ανθρώπινη ιστική καλλικρεΐνη 14 (KLK14) είναι εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης με διττή ειδικότητα, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης. Το γονίδιο *KLK14* μεταγράφεται παράγοντας ένα μοναδικό mRNA μετάγραφο. Φυσιολογικά, συμμετέχει στους πρωτεολυτικούς καταρράκτες της απολέπισης της κεράτινης στιβάδας του δέρματος μαζί με την *KLK7* και της ρευστοποίησης του σπέρματος, αλλά και στην αποδόμηση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στη διάσπαση πρωτεϊνών που δεσμεύουν τους αυξητικούς παράγοντες τύπου ινσουλίνης (IGFBPs) κατά την ανάπτυξη, τη διήθηση και τη μετάσταση του καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας Διατριβής είναι η ανάλυση και η κλινική αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης τόσο σε καρκινικούς και όσο και σε μη καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου, η μελέτη των mRNA μεταγράφων των δυο γονιδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και ιστούς, καθώς και η διερεύνηση του βιολογικού τους ρόλου στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η συνολική έκφραση mRNA των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* προσδιορίστηκε ποσοτικά σε καρκινικούς, φυσιολογικούς και αδενωματώδεις ιστούς παχέος εντέρου. Η έκφραση mRNA των *KLK7* και *KLK14* είναι σημαντικά αυξημένη στον καρκίνο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό ($p < 0,001$ και $p = 0,035$, αντίστοιχα), όπως επίσης και στον καρκίνο σε σύγκριση με τα αδενώματα ($p < 0,001$ και για τα δυο). Τα επίπεδα έκφρασής τους δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ καρκινικού και αδενωματώδους ιστού (AUC=0,669 για το *KLK7* και AUC=0,708 για το *KLK14*, $p < 0,001$ και για τα δυο), με την έκφραση mRNA του *KLK14* να έχει πιο ισχυρή διακριτική ικανότητα. Επίσης, δείχθηκε ότι τα δυο γονίδια συν-εκφράζονται σε μέτριο βαθμό και στους τρεις τύπους ιστού που εξετάστηκαν (φυσιολογικοί ιστοί $rs = 0,667$, $p < 0,001$; αδενώματα $rs = 0,373$, $p = 0,001$; καρκινώματα $rs = 0,478$, $p < 0,001$), οπότε η έκφρασή τους απορρυθμίζεται συγχρονισμένα στον καρκίνο. Η υψηλή έκφραση mRNA του *KLK7* και του *KLK14* σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τη διήθηση στους λεμφαδένες ($p = 0,015$ και $p = 0,019$, αντίστοιχα) και με προχωρημένο στάδιο TNM της νόσου ($p = 0,004$ και $p = 0,043$, αντίστοιχα). Η υψηλή έκφραση mRNA του *KLK14* σχετίζεται σημαντικά με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου (DFS) και ολικής (OS) επιβίωσης ($p = 0,003$ και $p = 0,016$, αντίστοιχα) των ασθενών με καρκίνο, ενώ η υψηλή έκφραση mRNA του *KLK7* βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά μόνο με συντομότερη DFS

επιβίωση ($p=0,004$). Συνεπώς, η έκφραση mRNA τόσο του *KLK7* όσο και του *KLK14* θα μπορούσε να αποτελέσει υποψήφιο δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο στο παχύ έντερο, ωστόσο αλλά κανένας από τους δυο πιθανούς δείκτες δεν είναι ανεξάρτητος.

Προσδιορίστηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση των πρωτεασών *KLK7* και *KLK14* σε τομές παραφίνης καρκινικών, φυσιολογικών και αδενωματοδών ιστών παχέος εντέρου. Το πρότυπο εντόπισης των *KLK7* και *KLK14* εμφανίζει κατά βάση μεγάλη ομοιότητα στα τρία είδη ιστού που εξετάστηκαν. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση των δυο πρωτεασών στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, εκτός από κάποια ασθενή χρώση της *KLK14* σε στρωματικά κύτταρα. Αντίθετα, στα νεοπλασματικά αδενικά επιθήλια, αδενωματούδη ή καρκινικά, και οι δυο πρωτεάσες εντοπίστηκαν με έντονη έκφραση, ιδιαίτερα προς την αυλική επιφάνεια αλλά και στα εκκρίματα, εικόνα που συμβαδίζει με την εκκριτική τους φύση. Η κυτταρική εντόπισή τους είναι κυτταροπλασματική, ομοιογενής για την *KLK7* και κοκκιώδης για την *KLK14*. Η ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι η έκφραση της *KLK7* είναι σημαντικός ανεξάρτητος δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης για την DFS επιβίωση ($p=0,02$) και οριακά για την OS ($p=0,054$) των ασθενών, ενώ η έκφραση της *KLK14* δεν βρέθηκε να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση.

Τα εναλλακτικά mRNA μετάγραφα των γονιδίων *KLK7* και *KLK14* ανιχνεύτηκαν σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου (HT-29, HCT 116, DLD-1, Caco2, LS 180) και σε δεξαμενές cDNA από ιστούς παχέος εντέρου ταξινομημένους με βάση τον ιστολογικό τους τύπο. Τα εναλλακτικά μετάγραφα 1, 2 και 3 του *KLK7* εκφράζονται στις κυτταρικές σειρές και στις δεξαμενές cDNA, ενώ το *KLK7* μετάγραφο 4 όχι. Η έκφραση των *KLK7* μεταγράφων 1 και 2, των οποίων η μετάφραση παράγει την ίδια λειτουργική πρωτεΐνη, αυξάνεται στα αδενώματα και στον καρκίνο. Αντίθετα, η έκφραση του *KLK7* μεταγράφου 3, το οποίο πιθανώς μεταφράζεται σε πρωτεΐνη που δεν διαθέτει ενεργότητα πρωτεάσης σερίνης, εμφανίζει την υψηλότερη τιμή της στη φυσιολογική δεξαμενή cDNA, ενώ κατά την πορεία της καρκινικής εξαλλαγής βαθμιαία μειώνεται και τελικά χάνεται, οπότε ίσως έχει κάποιο φυσιολογικό ρυθμιστικό ρόλο. Το *KLK14* mRNA μετάγραφο εκφράζεται έντονα στις κυτταρικές σειρές, εκτός της Caco2, στην οποία εκφράζεται ασθενώς. Στις δεξαμενές cDNA, η έκφραση του *KLK14* mRNA μεταγράφου παρουσιάζει την υψηλότερη αύξησή της στα αδενώματα, ενώ στην πορεία της νόσου εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένη

σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό. Ίσως το *KLK14* μετάγραφο παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της νεοπλασίας. Στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, εκτός της Caco2, και σε ορισμένες δεξαμενές cDNA εντοπίστηκε ένα νέο *KLK14* mRNA μετάγραφο μικρότερου μήκους από το κλασικό, από το οποίο απουσιάζει το ενδιάμεσο κωδικό εξώνιο 5.

Μετά την αποσιώπηση της έκφρασης του *KLK7* με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (siRNAs), διαπιστώθηκε μείωση της τάξης του 50% στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT 116 για διήθηση στο υπόστρωμα GFR Matrigel™ ($p=0,016$). Ομοίως, μετά από καταστολή της έκφρασης του *KLK14* με τη χρήση siRNAs, διαπιστώθηκε ιδιαίτερα μεγάλη μείωση της τάξης του 80% στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου DLD-1 να διηθούν το υπόστρωμα GFR Matrigel™ ($p=0,006$). Συνεπώς, η έκφραση των πρωτεασών *KLK7* και *KLK14* συμβάλλει στο διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου *in vitro* ενισχύοντας τον μεταστατικό φαινότυπο, αλλά δεν βρέθηκε να έχει επίπτωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους.

Η αποσιώπηση του γονιδίου *KLK7* είχε ως αποτέλεσμα μεταβολή στο πρωτεϊνικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων HCT 116, όπως έδειξε η Πρωτεομική ανάλυση. Μεταξύ των πρωτεϊνών με πολύ σημαντική ($p<0,01$) μείωση της έκφρασής τους μετά την καταστολή του *KLK7* βρέθηκαν δυο μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins), τα HSP90B1 και HSPA4, τα οποία ενέχονται στην απόκριση σε κυτταρικό στρες, καθώς και ο μεταγραφικός συμπαράγοντας TRIM28. Αντίθετα, τη μέγιστη αύξηση έκφρασης εμφάνισε η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη ANP32B και δυο μέλη της οικογένειας των αννεξινών, τα ANXA1 και ANXA3, τα οποία απορρυθμίζονται στον καρκίνο και έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του όγκου, τη διήθηση και τη μετάσταση.

Συμπερασματικά, οι *KLK7* και *KLK14* έχουν σημαντικά αυξημένη έκφραση στις νεοπλασίες του παχέος εντέρου, μεταβάλλουν την έκφρασή τους συγχρονισμένα κατά την πορεία της νόσου και σχετίζονται με προχωρημένο στάδιο TNM και διήθηση στους λεμφαδένες, αλλά και με την επιβίωση των ασθενών. Μπορούν να συμβάλλουν στην πρόγνωση, αλλά όχι ως ανεξάρτητοι δείκτες. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων των αδενωμάτων και των αδενοκαρκινωμάτων, από όπου εκκρίνονται και η υπερ-έκφρασή τους ενισχύει σημαντικά το διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων.

ABSTRACT

Study of the role of tissue kallikrein-related peptidases 7 and 14 in colon cancer

Marina N. Devetzi

Ph.D. Thesis

Department of Biological Applications and Technologies

Faculty of Health Sciences

University of Ioannina

Colon or colorectal cancer constitutes the third leading cause of cancer death in men and women in the U.S.A. and it is generally one of the prevalent cancer types in western industrialized countries. Human tissue kallikreins (KLKs) form a subfamily of 15 secreted serine proteases, which are encoded by 15 structurally similar genes that colocalize in tandem on chromosome 19q13. KLKs are localized primarily in the cytoplasm of glandular epithelia, from which they are secreted. A plethora of studies have shown that kallikrein expression on the mRNA and/or protein levels is deregulated in cancer and it has been correlated with prognosis, so kallikrein proteases have been proposed as promising novel tumor biomarkers or as potential therapeutic targets.

Human tissue kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a secreted serine protease with chymotrypsin-like specificity. *KLK7* gene transcription produces 4 alternative mRNA splice variants that differ due to the absence of intermediate coding exons and the structure of 5' and 3' untranslated regions. The mature enzyme participates in the proteolytic cascade of normal skin desquamation, as well as in epithelial to mesenchymal transition and cleavage of extracellular matrix components during cancer progression. *KLK7* gene expression has been correlated with unfavorable prognosis in breast, ovarian, cervical, brain and colon cancer, but with favorable prognosis in lung adenocarcinoma.

Human tissue kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a secreted serine protease with dual specificity, trypsin- and chymotrypsin-like. *KLK14* gene is transcribed into a

single mRNA transcript. Normally, KLK14 participates in proteolytic cascades during desquamation of the stratum corneum, together with KLK7, and semen liquefaction, as well as in extracellular matrix protein degradation and cleavage of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) during tumor growth, invasion and metastasis. *KLK14* gene expression has been correlated with poor prognosis in breast, ovarian and prostate cancer.

The aim of the present thesis was the analysis and clinical evaluation of the expression of *KLKs* 7 and 14 at the mRNA and protein levels in cancerous and non-cancerous colon tissues, the study of *KLKs* 7 and 14 mRNA transcript variants in colon cancer cell lines and tissues, as well as the investigation of their biological role in colon cancer.

KLK7 and *KLK14* mRNA expression was quantitatively assessed in cancer, normal and adenomatous colon tissues. There is significantly higher mRNA expression of *KLK7* and *KLK14* in cancer tissues than normal ones ($p < 0.001$ and $p = 0.035$, respectively), as well as in cancer tissues compared to adenomas ($p < 0.001$ for both of them). mRNA expression levels of both genes have discriminatory value between cancer and adenoma tissues (AUC=0.669 for *KLK7* and AUC=0.708 for *KLK14*, $p < 0.001$ for both), with *KLK14* obtaining greater distinguishing power. Moreover, both genes were shown to be fairly co-expressed in all three types of colon tissues examined (normal $r_s = 0.667$, $p < 0.001$, adenomas $r_s = 0.373$, $p = 0.001$, carcinomas $r_s = 0.478$, $p < 0.001$), thus their expression is deregulated in cancer in a coordinated manner. High mRNA expression of *KLK7* and *KLK14* is statistically significantly associated with positive nodal status ($p = 0.015$ and $p = 0.019$, respectively), as well as more advanced TNM stage of the disease ($p = 0.004$ and $p = 0.043$, respectively). *KLK14* high mRNA expression is significantly associated with shorter disease-free (DFS) and overall survival (OS) of cancer patients ($p = 0.003$ and $p = 0.016$, respectively), whereas *KLK7* high mRNA expression is significantly associated only with shorter DFS ($p = 0.004$). Therefore, *KLK7* and *KLK14* gene expression could be regarded as candidate markers of unfavorable prognosis for colon cancer patients, nevertheless not independent.

KLK7 and *KLK14* protease expression was immunohistochemically evaluated in paraffin-embedded colon cancer, adenoma and normal tissues. Localization pattern of *KLK7* and *KLK14* proteins is primarily similar in all three types of tissue examined. There is

no immunostaining in normal epithelial cells for none of the two KLKs, except for some slight KLK14 immunostaining observed in stromal cells. Both proteases are intensely expressed in neoplastic glandular epithelia, adenomatous or cancerous, especially towards the luminal surface and in the secretions, which confirms their secretory nature. Their cellular localization is cytoplasmic, homogeneous for KLK7 but granular for KLK14. Survival analysis demonstrated that KLK7 expression is a significant independent indicator of poor prognosis for DFS ($p=0.02$) and marginally for OS ($p=0.054$) of colon cancer patients, whereas KLK14 expression was not found to be associated with survival time.

KLK7 and *KLK14* mRNA transcript variants were detected in colon cancer cells lines (HT-29, HCT 116, DLD-1, Caco2, LS 180) and cDNA pools from tissues classified according to histological type. *KLK7* splice variants 1, 2 and 3 are expressed in cell lines and cDNA pools, whereas *KLK7* variant 4 was not detected. *KLK7* splice variants 1 and 2, which produce the same functional protein isoform, showed increased expression in adenomas and cancer. On the contrary, *KLK7* splice variant 3, which produces a protein without serine protease activity, showed its higher expression in normal tissues and a gradual decrease and loss during the course of the disease, possibly exhibiting a physiological regulatory role. The single *KLK14* mRNA transcript is intensely expressed in cell lines, except Caco2, in which it was slightly detected. *KLK14* mRNA transcript showed its higher expression in adenoma cDNA pool, while in the following stages of the disease it was not intensely increased compared to normal tissue. This transcript may play a role in the early tumorigenesis. In cell lines, except Caco2, and in certain cDNA pools, a new shorter than the classical *KLK14* mRNA isoform was detected, lacking the intermediate coding exon 5.

KLK7 gene expression silencing with the use of small interfering RNAs (siRNAs) resulted in a 50% decrease of the invasive capacity of HCT 116 colon cancer cells to infiltrate GFR MatrigelTM membrane ($p=0.016$). Likewise, *KLK14* gene expression silencing with siRNAs resulted in a particularly high 80% decrease of the invasive capacity of DLD-1 colon cancer cells to infiltrate GFR MatrigelTM membrane ($p=0.006$). Therefore, KLK7 and KLK14 expression is associated with the invasive capacity of colon cancer cells *in vitro* by enhancing their metastatic phenotype, but without any impact on their proliferative ability.

KLK7 gene silencing with siRNAs altered the protein profile of HCT 116 colon cancer cells, as demonstrated by Proteomic analysis. Among proteins with very significant ($p < 0.01$) decreased expression after *KLK7* knockdown, were two members of the heat shock protein family, HSP90B1 and HSPA4, which are implicated in cellular stress response, as well as the transcription co-factor TRIM28. On the other hand, major increase was observed in the expression of anti-apoptotic protein ANP32B and two members of the annexin protein family, ANXA1 and ANXA3, which are deregulated in cancer and have been correlated with tumor growth, invasion and metastasis.

In conclusion, kallikrein-related peptidases 7 and 14 are significantly upregulated in colon adenomas and cancer, their expression is coordinately altered during the course of the disease and correlated with advanced TNM stage and nodal invasion, as well as with patients' survival time. They can contribute to prognosis, but not as independent factors. They are localized in the cytoplasm of epithelial cells of adenomas and adenocarcinomas from which they are secreted and their over-expression significantly enhances the invasive and metastatic potential of cancer cells.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexopoulou DK, Kontos CK, Christodoulou S, Papadopoulos IN, Scorilas A. KLK11 mRNA expression predicts poor disease-free and overall survival in colorectal adenocarcinoma patients. *Biomark Med.* 2014, 8: 671-685.
- Alexopoulou DK, Papadopoulos IN, Scorilas A. Clinical significance of kallikrein-related peptidase (KLK10) mRNA expression in colorectal cancer. *Clin Biochem.* 2013, 46: 1453-1461.
- American Cancer Society. Colorectal cancer facts & figures 2011-2013. Atlanta: American Cancer Society, 2011.
- Anwar S, Frayling IM, Scott NA and Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *Br J Surg.* 2004, 91: 1275–1291.
- Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954, 139: 846-852.
- Aust DE, Baretton GB. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2010, 457: 291-297.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004, 116: 281-297.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature.* 2004, 432: 324-331.
- Beaufort N, Debela M, Creutzburg S, Kellermann J, Bode W, Schmitt M, Picard D, Magdolen V. Interplay of human tissue kallikrein 4 (hK4) with the plasminogen activation system: hK4 regulates the structure and functions of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). *Biol Chem.* 2006, 387: 217–222.
- Beaufort N, Plaza K, Utzschneider D, Schwarz A, Burkhart JM, Creutzburg S, Debela M, Schmitt M, Ries C, and Magdolen V. Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biol Chem.* 2010, 391: 581–587.
- Bender E. The second coming of RNAi. *The Scientist* (<http://www.the-scientist.com>). Sept. 2014.
- Bennett 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: 24562–24570.
- Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology.* 2013, 62: 367-386.

- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 1992, 44: 1–80.
- Bindukumar B, Schwartz SA, Nair MP, Aalinkeel R, Kawinski E, Chadha KC. Prostate-specific antigen modulates the expression of genes involved in prostate tumor growth. *Neoplasia.* 2005, 7: 241-252.
- Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2014, 20: 6786-6808.
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010, 11: 889-896.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU. Παθολογική ανατομική. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2007.
- Boenisch T, Farmillo AJ, Stead RH. Handbook of immunochemical staining methods. Edited by SJ Naish, DAKO Corporation, Carpinteria, California USA, 1989.
- Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010, 138: 2073-2087.
- Borgoño CA and Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004, 4: 876–890.
- Borgoño CA, Grass L, Soosaipillai A, Yousef GM, Petraki CD, Howarth DH, Fracchioli S, Katsaros D, Diamandis EP. Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 2003, 63: 9032-9041.
- Borgoño CA, Michael IP, and Diamandis EP, Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res.* 2004, 2: 257-280.
- Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, Jayakumar A, Kapadia R, Clayman GL, Sotiropoulou G, Diamandis EP. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem.* 2007 α , 282: 3640-3652. .
- Borgoño CA, Michael IP, Shaw JL, Luo LY, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP. Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem.* 2007 β , 282: 2405-2422.
- 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.
- Braff MH, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, and Gallo RL. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun.* 2005, 73: 6771–6781.

- 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: 30033-30040.
- Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2005, 124: 198-203.
- Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem.* 2004, 37: 584-594.
- Bunch H, Zheng X, Burkholder A, Dillon ST, Motola S, Birrane G, Ebmeier CC, Levine S, Fargo D, Hu G, Taatjes DJ, Calderwood SK. TRIM28 regulates RNA polymerase II promoter-proximal pausing and pause release. *Nat Struct Mol Biol.* 2014, 21: 876-883.
- Burda JE, Radulovic M, Yoon H, Scarisbrick IA. Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendrogliopathy. *Glia.* 2013, 61: 1456-1470.
- Bustin SA, Murphy J. RNA biomarkers in colorectal cancer. *Methods.* 2013, 59: 116-125.
- 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, 10:7252-7259.
- Candi E, Schmidt R and Melino G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6: 328–340.
- Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ and Sheils OM. BRAF^{V600E}: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther.* 2011, 10: 385-394.
- Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2007, 53: 351-73.
- Catenacci DV, Kozloff M, Kindler HL, Polite B. Personalized colon cancer care in 2010. *Semin Oncol.* 2011, 38: 284-308.
- Chan AT and Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010, 138: 2029–2043.
- Chao J, Bledsoe G, Yin H, Chao L. The tissue kallikrein-kinin system protects against cardiovascular and renal diseases and ischemic stroke independently of blood pressure reduction. *Biol Chem.* 2006, 387: 665–675.
- Chibaudel B, Tournigand C, Andre T, and de Gramont A. Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2012, 4: 75–89.
- Cho WCS. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer.* 2007, 6: 25.
- Chou RH, Lin SC, Wen HC, Wu CW and Chang WS. Epigenetic activation of human kallikrein 13 enhances malignancy of lung adenocarcinoma by promoting N-cadherin expression and laminin degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, 409: 442-447.

- Chung H, Hamza M, Oikonomopoulou K, Gratio V, Saifeddine M, Virca GD, Diamandis EP, Hollenberg MD, Darmoul D. Kallikrein-related peptidase signaling in colon carcinoma cells: targeting proteinase-activated receptors. *Biol Chem*. 2012, 393: 413-420.
- Clements JA, Willemsen NM, Myers SA, Dong Y. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004, 41: 265-312.
- Compton C. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*. 2003, 16: 376-388.
- Cox DR. Regression models and life tables. *J Royal Stat Soc. Series B*. 1972, 34: 181-220.
- Cummings LC, Cooper GS. Colorectal cancer screening: Update for 2011. *Semin Oncol*. 2011, 38: 483-489.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol*. 2003, 162: 1503–1513.
- Davidson B, Trope CG, Reich R. The role of the tumor stroma in ovarian cancer. *Front Oncol*. 2014, 4: 104.
- Debela M, Beaufort N, Magdolen V, Schechter NM, Craik CS, Schmitt M, Bode W, Goettig P. Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7. *Biol Chem*. 2008, 389: 623-632.
- de Gramont A, de Gramont A, Chibaudel B, Bachet JB, Larsen AK, Tournigand C, Louvet C, André T. From chemotherapy to targeted therapy in adjuvant treatment for stage III colon cancer. GERCOR (French Oncology Research Group). *Semin Oncol*. 2011, 38: 521-532.
- Descargues P, Deraison C, Bonnart C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Elias P, Barrandon Y, Zambruno G, Sonnenberg A, Hovnanian A. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet*. 2005, 37: 56-65.
- Devetzi M, Trangas T, Scorilas A, Xynopoulos D, Talieri M. Parallel overexpression and clinical significance of kallikrein-related peptidases 7 and 14 (KLK7 & KLK14) in colon cancer. *Thromb Haemost*. 2013, 109: 716-725.
- Diamandis EP and Yousef GM. Human tissue kallikreins: A family of new cancer biomarkers. *Clin Chem*. 2002, 48: 1198-1205.
- 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: 1710-1720.

- 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.
- Dong Y, Wu WK, Wu CW, Sung JJ, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Br J Cancer.* 2011, 104: 893-898.
- Dorn J, Gkazepis A, Kotszsch M, Kremer M, Propping C, Mayer K, Mengele K, Diamandis EP, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Clinical value of protein expression of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in ovarian cancer. *Biol Chem.* 2014, 395: 95-107.
- Duffy MJ. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res.* 1996, 2: 613-618.
- Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol.* 1932, 35: 323-332.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. (Eds.) *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed., Springer, 2010.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2: 161-174.
- Egelrud T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 2000, 208: 44-45.
- Eissa A, Amodeo V, Smith CR, Diamandis EP. Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) is an active serine protease in human epidermis and sweat and is involved in a skin barrier proteolytic cascade. *J Biol Chem.* 2011, 286: 687-706.
- Eissa A and Diamandis EP. Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. *Biol Chem.* 2008, 389: 669-680.
- Emami N and Diamandis EP. New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Mol Oncol.* 2007 α , 1: 269-287.
- Emami N and Diamandis EP. Human tissue kallikreins: A road under construction. *Clin Chim Acta.* 2007 β , 381: 78-84.
- Emami N and Diamandis EP. Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. Possible function in seminal plasma and skin. *J Biol Chem.* 2008 α ; 283: 3031-3041.
- Emami N and Diamandis EP. Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. *Clin Chem.* 2008 β , 54: 1600-1607.
- Emami N, Deperthes D, Malm J, Diamandis EP. Major role of human KLK14 in seminal clot liquefaction. *J Biol Chem.* 2008, 283: 19561-19569.

- Emami N, Scorilas A, Soosaipillai A, Earle T, Mullen B, Diamandis EP. Association between kallikrein-related peptidases (KLKs) and macroscopic indicators of semen analysis: their relation to sperm motility. *Biol Chem*. 2009, 390: 921–929.
- Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990, 61: 759-767.
- Felber LM, Borgoño CA, Cloutier SM, Kündig C, Kishi T, Ribeiro Chagas J, Jichlinski P, Gygi CM, Leisinger HJ, Diamandis EP, Deperthes D. Enzymatic profiling of human kallikrein 14 using phage-display substrate technology. *Biol Chem*. 2005, 386: 291-298.
- Feldman M, Friedman L, Brandt L. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 2010, 9th ed., Saunders, Elsevier.
- 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, and Zhu ZG. Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006, 21: 1596–1603.
- Fisher A. Mechanism of the proteolytic activity of malignant tissue cells. *Nature*. 1946, 157: 442.
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012, 3: 153-173.
- Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004, 48: 411-424.
- 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: 897–899.
- Fritzsche F, Gansukh T, Borgoño CA, Burkhardt M, Pahl S, Mayordomo E, Winzer KJ, Weichert W, Denkert C, Jung K, Stephan C, Dietel M, Diamandis EP, Dahl E, Kristiansen G. Expression of human Kallikrein 14 (KLK14) in breast cancer is associated with higher tumour grades and positive nodal status. *Br J Cancer*. 2006, 94: 540-547.
- García-Bilbao A, Armañanzas R, Ispizua Z, Calvo B, Alonso-Varona A, Inza I, Larrañaga P, López-Vivanco G, Suárez-Merino B, Betanzos M. Identification of a biomarker panel for colorectal cancer diagnosis. *BMC Cancer*. 2012, 26: 12-43.
- Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011, 135: 1269-1277.
- George B and Kopetz S. Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep*. 2011, 13: 206–215.
- Gibbs RA. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Anal Chem*. 1990, 62:1202-1214.

- Gomis-Rüth FX, Bayés A, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Tsetsenis T, Villegas V, Avilés FX, Coll M. The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family. *J Biol Chem*. 2002, 277: 27273-27281.
- Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis*. 2014, 7: 9-18.
- Gratio V, Beaufort N, Seiz L, Maier J, Virca GD, Debela M, Grebenchtchikov N, Magdolen V, and Darmoul D. Kallikrein-related peptidase 4, a new activator of the aberrantly expressed protease-activated receptor 1 in colon cancer cells. *Am J Pathol*. 2010, 176: 1452–1461.
- Gratio V, Lorient C, Virca GD, Oikonomopoulou K, Walker F, Diamandis EP, Hollenberg MD, Darmoul D. Kallikrein-related peptidase 14 acts on proteinase-activated receptor 2 to induce signaling pathway in colon cancer cells. *Am J Pathol*. 2011, 179: 2625-2636.
- Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev*. 2005, 19: 877-890.
- Guo C, Liu S, Sun MZ. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncol*. 2013, 9: 1773-1793.
- Hanley JA and McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982, 143: 29-36.
- Hansen KK, Oikonomopoulou K, Li Y, Hollenberg MD. Proteinases, proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of cancer and diseases of the cardiovascular, musculoskeletal, nervous and gastrointestinal systems. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008, 377: 377-392.
- Hansson L, Strömquist M, Bäckman 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: 19420-19426.
- Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: A review. *Surgeon*. 2011, 9: 200-210.
- Hashem NN, Mara TW, Mohamed M, et al. Human kallikrein 14 (KLK14) expression in salivary gland tumors. *Int J Biol Markers*. 2010, 25: n32-37.
- He J and Efron JE. Screening for colorectal cancer. *Adv Surg*. 2011, 45: 31-44.
- Henkhaus RS, Gerner EW, Ignatenko NA. Kallikrein 6 is a mediator of K-RAS-dependent migration of colon carcinoma cells. *Biol Chem*. 2008 α , 389: 757-764.
- Henkhaus RS, Roy UK, Cavallo-Medved D, Sloane BF, Gerner EW, Ignatenko NA. Caveolin-1-mediated expression and secretion of kallikrein 6 in colon cancer cells. *Neoplasia*. 2008 β , 10: 140-148.
- Herceg Z and Ushijima T. Introduction: epigenetics and cancer. *Adv Genet*. 2010, 70: 1-23.

- Holzschleiter L, Biermann JC, Kotzsch M, Prezas P, Farthmann J, Baretton G, Luther T, Tjan-Heijnen VC, Talieri M, Schmitt M, Sweep FC, Span PN, Magdolen V. 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: 1070-1079.
- Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ, Rho S, Kim J, Kim JH, Choi DS, Kim YK, Hwang D, Gho YS. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*. 2009, 10: 556.
- Hooper JD, Bui LT, Rae FK, Harvey TJ, Myers SA, Ashworth LK, Clements JA. Identification and characterisation of KLK14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle. *Genomics*. 2001, 73: 117-122.
- Iakovlev V, Siegel ER, Tsao MS, Haun RS. Expression of kallikrein-related peptidase 7 predicts poor prognosis in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012, 21: 1135-1142.
- Ignatenko NA, Babbar N, Mehta D, Casero RA Jr, and Gerner EW. Suppression of polyamine catabolism by activated Ki-ras in human colon cancer cells. *Mol Carcinog*. 2004, 39: 91-102.
- Imai K and Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008, 29: 673-680.
- Inoue Y, Yokobori T, Yokoe T, Toiyama Y, Miki C, Mimori K, Mori M, Kusunoki M. Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010, 17: 3037-3042.
- Jia L, Shen HC, Wantroba M, Khalid O, Liang G, Wang Q, Gentschein E, Pinski JK, Stanczyk FZ, Jones PA, Coetzee GA. Locus-wide chromatin remodeling and enhanced androgen receptor-mediated transcription in recurrent prostate tumor cells. *Mol Cell Biol*. 2006, 26: 7331-7341.
- Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS. Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer*. 2007, 109: 1811-1820.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009, 9: 239-152.
- Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009, 119: 1420-1428.
- Kang Z, Janne OA, and Palvimo JJ. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol*. 2004, 18: 2633-2648.

- Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol*. 2010, 4: 496-510.
- Kaplan EL and Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958, 53:457-481.
- Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol*. 2008, 153 Suppl 1: S230-40.
- Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003, 2: 14.
- Kelley, R.K., and Venook, A.P. Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: is there a role for gene expression profiling? *Clin Colorectal Cancer*. 2011, 10: 73–80.
- Kennell J, Cadigan KM. APC and beta-catenin degradation. *Adv Exp Med Biol*. 2009, 656: 1-12.
- Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta*. 2012, 1826: 103–111.
- Kheirleisid EA, Miller N, Kerin MJ. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *Am J Mol Biol*. 2013, 3: 72-80.
- Kim JT, Song EY, Chung KS, Kang MA, Kim JW, Kim SJ, Yeom YI, Kim JH, Kim KH, and Lee HG. Up-regulation and clinical significance of serine protease kallikrein 6 in colon cancer. *Cancer*. 2011, 117: 2608 -2619.
- Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Ann Oncol*. 2009, 20: 1020-1025.
- Kirihara T, Matsumoto-Miyai K, Nakamura Y, Sadayama T, Yoshida S, Shiosaka S. Prolonged recovery of ultraviolet B-irradiated skin in neuropsin (KLK8)-deficient mice. *Br J Dermatol*. 2003, 149: 700–706.
- Kishibe M, Bando Y, Terayama R, Namikawa K, Takahashi H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Jiang YP, Mitrovic B, Perez D, Iizuka H, Yoshida S. Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *J Biol Chem*. 2007, 282: 5834–5841.
- Komatsu N, Saijoh K, Otsuki N, Kishi T, Micheal IP, Obiezu CV, Borgono CA, Takehara K, Jayakumar A, Wu HK, Clayman GL, Diamandis EP. Proteolytic processing of human growth hormone by multiple tissue kallikreins and regulation by the serine protease inhibitor Kazal-Type5 (SPINK5) protein. *Clin Chim Acta*. 2007, 377: 228-236.
- Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, Takehara K, Diamandis EP. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *Br J Dermatol*. 2005, 153: 274-281.

- Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Toyama T, Ohka R, Takehara K, and Saijoh K. Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J Invest Dermatol.* 2003, 121: 542–549.
- 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: 106-112.
- Kontos CK, Mavridis K, Talieri M, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs) in gastrointestinal cancer: mechanistic and clinical aspects. *Thromb Haemost.* 2013, 110: 450-457.
- Kontos CK, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clin Chem Lab Med.* 2012, 50: 1877-1891.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006, 27: 95-125.
- Kulda V, Pesta M, Topolcan O, Liska V, Treska V, Sutnar A, Rupert K, Ludvikova M, Babuska V, Holubec L Jr, Cerny R. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010, 200: 154-160.
- Kurlender L, Borgoño CA, 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: 1-14.
- Laiho P, Kokko A, Vanharanta S, Salovaara R, Sammalkorpi H, Järvinen H, Mecklin JP, Karttunen TJ, Tuppurainen K, Davalos V, Schwartz S, Arango D, Mäkinen MJ, Aaltonen LA. Serrated carcinomas form a subclass of colorectal cancer with distinct molecular basis. *Oncogene.* 2007, 26: 312-320.
- Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011, 8: 686-700.
- 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: 407-446.
- Lawrence T. The Nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, 1:a001651.
- Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010, 138: 2088-2100.
- Lesk AM and Fordham WD. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol.* 1996, 258: 501-537.

- Li W, Zhao Y, Ren L, Wu X. Serum human kallikrein 7 represents a new marker for cervical cancer. *Med Oncol*. 2014, 31: 208.
- Li X, Liu J, Wang Y, et al. Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Sci*. 2009; 100: 601-607.
- Lie YS, Petropoulos CJ. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol*. 1998, 9:43-48.
- Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol*. 2002, 16: 1243-1256.
- Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001, 25:402-408.
- Loktionov A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening. *Int J Cancer*. 2007, 120: 2281-2289.
- López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007, 7: 800-808.
- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*. 2008, 389: 695-700.
- Lundström A, Egelrud T. Evidence that cell shedding from plantar stratum corneum in vitro involves endogenous proteolysis of the desmosomal protein desmoglein I. *J Invest Dermatol*. 1990, 94: 216-220.
- Lundwall A and Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2008, 65: 2019-2038.
- Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ, Olsson AY, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stenman UH, Stephan C, Talieri M, Yousef GM. A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol Chem*. 2006, 387: 637-641.
- Luo LY, Shan SJC, Elliot 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: 742–750.
- Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, Little SP, Sotiropoulou G, Becker GW, and Diamandis EP. Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6, autoactivation, substrate specificity and regulation by inhibitions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003, 307: 948–955.

- 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: 806-811.
- Malm J, Hellman J, Magnusson H, Laurell CB, Lilja H. Isolation and characterization of the major gel proteins in human semen, semenogelin I and semenogelin II. *Eur J Biochem.* 1996, 238: 48-53.
- Malm J, Hellman J, Hogg P, Lilja H. Enzymatic action of prostatespecific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn²⁺, a tight-binding inhibitor. *Prostate.* 2000, 45: 132-139.
- Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- Markowitz SD and Bertagnolli MM. Molecular Origins of Cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009, 361: 2449-2460.
- Matsuda Y, Oshio S, Yazaki T, Umeda T, Akihama S. The effect of some proteinase inhibitors on liquefaction of human semen. *Hum Reprod.* 1994, 9: 664-668.
- Medici D, Hay ED and Olsen BR. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor beta3. *Mol Biol Cell.* 2008, 19: 4875-4887.
- Meissner F, Mann M. Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nat. Immunol.* 2014, 15: 112-117.
- Meister G and Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004, 431: 343-349.
- 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: 506-515.
- Mills AA. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev.* 2005, 19: 2091-2099.
- Mo L, Zhang J, Shi J, Xuan Q, Yang X, Qin M, Lee C, Klocker H, Li QQ, Mo Z. Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res.* 2010, 30: 3413-3420.
- Mohamed MM and Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006, 6: 764-775.
- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 2010, 2: 151-158.

- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 2005, 99: 6–38.
- Naini BV, Odze RD. Advanced precancerous lesions (APL) in the colonic mucosa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013, 27: 235-256.
- Nakamura T, Mitsui S, Okui A, Kominami K, Nomoto T, Ukimura O, Kawauchi A, Miki T, Yamaguchi N. Alternative splicing isoforms of hippostasin (PRSS20/KLK11) in prostate cancer cell lines. *Prostate.* 2001, 49: 72-78.
- Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013, 6: 120-128.
- Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol.* 2009, 4: 343-364.
- Obiezu CV and Diamandis EP. Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett.* 2005, 224: 1-22.
- Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, Murayama S, and Mori M. Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 2889–2893.
- Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Andrade-Gordon P, Cottrell GS, Bunnett NW, Diamandis EP, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem.* 2006, 281: 32095–32112.
- Oikonomopoulou K, DeAngelis RA, Chen H, Diamandis EP, Hollenberg MD, Ricklin D, Lambris JD. Induction of complement C3a receptor responses by kallikrein-related peptidase 14. *J Immunol.* 2013, 191: 3858-3866.
- Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006, 6: 227-239.
- Paliouras M and Diamandis EP. The Kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. *Biol Chem.* 2006 α , 387: 643-652.
- Paliouras M and Diamandis EP. Coordinated steroid hormone-dependent and independent expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 β , 102: 7–19.
- Pampalakis G and Sotiropoulou G. Multiple mechanisms underlie the aberrant expression of the human kallikrein 6 gene in breast cancer. *Biol Chem.* 2006, 387: 773-782.
- Pampalakis G, Diamandis EP, and Sotiropoulou G. The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers. *Biol Chem.* 2006, 387: 795-799.

- Pampalakis G, Sotiropoulou G. Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1776: 22-31
- Papachristopoulou G, Avgeris M, Charlaftis A, Scorilas A. Quantitative expression analysis and study of the novel human kallikrein-related peptidase 14 gene (KLK14) in malignant and benign breast tissues. *Thromb Haemost*. 2011, 105: 131-137.
- Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res*. 1980, 40: 2428-2432.
- Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 2009, 284: 34211-34222.
- Pasic MD, Olkhov E, Bapat B, Yousef GM. Epigenetic regulation of kallikrein-related peptidases: there is a whole new world out there. *Biol Chem*. 2012, 393: 319-330.
- Patai AV, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2013, 19: 607-615.
- Pavlou MP, Diamandis EP, Blasutig IM. The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem*. 2013, 59: 147-157.
- Petraki C, Dubinski W, Scorilas A, Saleh C, Pasic MD, Komborozos V, Khalil B, Gabril MY, Streutker C, Diamandis EP, and Yousef GM. Evaluation and prognostic significance of human tissue kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2012, 208: 104–108.
- Petraki CD, Papanastasiou PA, Karavana VN, Diamandis EP. Cellular distribution of human tissue kallikreins: immunohistochemical localization. *Biol Chem*. 2006, 387: 653-663.
- Picard D. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab*. 2006, 17: 229–235.
- Picard N, Van Abel M, Campone C, Seiler M, Bloch-Faure M, Hoenderop JG, Loffing J, Meneton P, Bindels RJ, Paillard M, Alhenc-Gelas F, Houillier P. Tissue kallikrein-deficient mice display a defect in renal tubular calcium absorption. *J Am Soc Nephrol*. 2005, 16: 3602-3610.
- Pinto D, Clevers H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell*. 2005, 97: 185-196.
- Planque C, de Monte M, Guyétant S, Rollin J, Desmazes C, Panel V, Lemarié E, Courty Y. KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 329: 1260-1266.
- Planque C, Bléchet C, Ayadi-Kaddour A, Heuzé-Vourc'h N, Dumont P, Guyétant 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: 781-786.

- Polgár L, Halász P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases. *Biochem J.* 1982, 207: 1-10.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004, 4: 71-78.
- Poulogiannis G, Frayling IM and Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology.* 2010, 56: 167-179.
- Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis EP, Krüger 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 α , 387: 807-811.
- 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 β , 387: 1607-1612.
- Pritchard CC and Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* 2011, 60: 116-129.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013, 19: 1423-1437.
- Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res.* 2012, 4: 376-389.
- Rabien A, Fritzsche F, Jung M, Diamandis EP, Loening SA, Dietel M, Jung K, Stephan C, Kristiansen G. High expression of KLK14 in prostatic adenocarcinoma is associated with elevated risk of prostate-specific antigen relapse. *Tumour Biol.* 2008, 29: 1-8.
- Ramachandran R, Mihara K, Chung H, Renaux B, Lau CS, Muruve DA, DeFea KA, Bouvier M, Hollenberg MD. Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem.* 2011, 286: 24638–24648.
- Ramachandran R, Noorbakhsh F, DeFea K, Hollenberg MD. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2012, 11: 69-86.
- Ramani VC, Haun RS. The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 α ; 369: 1169-1173.
- Ramani VC, Haun RS. Expression of kallikrein 7 diminishes pancreatic cancer cell adhesion vitronectin and enhances urokinase-type plasminogen activator shedding. *Pancreas.* 2008 β ; 37: 399-404.
- Ramani VC, Hennings L, Haun RS. Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: 373.

- Ramani VC, Kaushal GP, Haun RS. Proteolytic action of kallikrein-related peptidase 7 produces unique active matrix metalloproteinase-9 lacking the C-terminal hemopexin domains. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1813: 1525-1531.
- Rao AR, Motiwala HG, Karim OM. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int*. 2008, 101: 5-10.
- Rattenholl A and Steinhoff M. Role of proteinase-activated receptors in cutaneous biology and disease. *Drug Dev Res*. 2003, 59: 408-416.
- Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, Goldblum JR, Guillem JG, Kahi CJ, Kalady MF, O'Brien MJ, Odze RD, Ogino S, Parry S, Snover DC, Torlakovic EE, Wise PE, Young J, Church J. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. 2012, 107: 1315-1329.
- Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol*. 2002, 57: 109-128.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, and 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: 362-365.
- Ross JS. Biomarker-based selection of therapy for colorectal cancer. *Biomark Med*. 2011, 5: 319-332.
- Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, van de Velde C, Morreau H, van Velthuysen L, Glas AM, van't Veer L.J., and Tollenaar R. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011, 29: 17-24.
- 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: 283-288.
- Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2008, 54: 1951-60.
- Scarlsbrick IA, Linbo R, Vandell AG, Keegan M, Blaber SI, Blaber M, Sneve D, Lucchinetti CF, Rodriguez M, Diamandis EP. Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol Chem*. 2008, 389: 739-745.

- Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C, Pozza A, Scarpa M, Kotsafti A, Angriman I. Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2014, 20: 6774-6785.
- Sceneay J, Smyth MJ, Moller A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*. 2013, 32: 449–464.
- Schepeler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjøt L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhøffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res*. 2008, 68: 6416-6424.
- Schultz RM and Liebman MN. Structure-function relationship in protein families. In: *textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, T.M. Devlin ed. New York, USA: Wiley-Liss, Inc. 1997, 1-2-116.
- Shah R, Jones E, Vidart V, Kuppen PJ, Conti JA, Francis NK. Biomarkers for early detection of colorectal cancer and polyps: Systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014, 23: 1712-1728.
- Shah SN, Hile SE and Eckert KA. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Res*. 2010, 70: 431-435.
- Sharma JN, Narayanan P. Hypertension and diabetes: Contribution of the kallikrein - kinin system. *J Diabetes Metab*. 2011, S4:004.
- Shaw JL and Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem*. 2007; 53:1423–1432.
- Shaw JL and Diamandis EP. A potential role for tissue kallikrein-related peptidases in human cervico-vaginal physiology. *Biol Chem*. 2008 α , 389: 681-688.
- Shaw JL and Diamandis EP. Regulation of human tissue kallikrein-related peptidase expression by steroid hormones in 32 cell lines. *Biol Chem*. 2008 β , 389: 1409-1419.
- Shiosaka S and Ishikawa Y. Neuropsin-a possible modulator of synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat*. 2011, 42: 24-29.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006, 42: 717-727.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014, 64:9-29.
- Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD. Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *J Dent Res*. 1998, 77: 377–386.

- Sipos F and Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol.* 2012, 18: 601-608.
- Smith RS Jr, Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol Chem.* 2008, 389: 725-730.
- Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2010, 160: 191-203.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem.* 2009, 284: 32989-32994.
- 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: 381-391.
- Stefansson K, Brattsand M, Ny A, Glas B, Egelrud T. Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biol Chem.* 2006, 387: 761-768.
- 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: 18-25.
- Suzuki Y, Nomura J, Koyama J and Horii I. The role of proteases in stratum corneum: Involvement in stratum corneum desquamation. *Arch Dermatol Res.* 1994, 286: 249-253.
- Takada K, Takiguchi M, Konno A, Inaba M. Autoimmunity against a tissue kallikrein in IQI/Jic Mice: a model for Sjogren's syndrome. *J Biol Chem.* 2005, 280: 3982-3988.
- 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.* 2011, 32: 737-744.
- Talieri M, Devetzi M, Scorilas A, et al. Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 expression. *Anticancer Res.* 2011; 31: 3093-3100.
- Talieri M, Devetzi M, and Manfred Schmitt. Clinical relevance of Kallikrein-related peptidases in gastric and colorectal cancer. *Kallikrein-related peptidases, Vol.2, Novel cancer-related biomarkers.* Walter de Gruyter, 2012.
- 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: 180-186.

- 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 α , 101: 741-747.
- 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 β , 100: 1659-1665.
- Tamura H, Ishikawa Y, Hino N, Maeda M, Yoshida S, Kaku S, Shiosaka S. Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus *in vivo*. *J Physiol*. 2006, 570: 541-551.
- Tan OL, Whitbread AK, Clements JA and 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: 697-705.
- Tanaka T, Isono T, Yoshiki T, Yuasa T, Okada Y. A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative splicing. *Cancer Res*. 2000, 60: 56-59.
- Tejpar S. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007, 21: 1071-1087.
- Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, and Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000, 1: 91–100.
- Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010, 138: 2101-2114.
- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002, 2: 569–579.
- Thiel A, Ristimäki A. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Front Oncol*. 2013, 3:281.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2: 442–454.
- Thompson DM, Krupey J, Freedman SO, Gold P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969, 64: 161-167.
- Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA, Richard DJ, O'Byrne KJ. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Front Oncol*. 2014, 4: 127.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8681–8686.

- Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*. 2003, 27: 65-81.
- Two AM, Del Rosso JQ. Kallikrein 5-mediated inflammation in rosacea: clinically relevant correlations with acute and chronic manifestations in rosacea and how individual treatments may provide therapeutic benefit. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014, 7: 20-25.
- Vakrakou A, Devetzi M, Papachristopoulou G, Malachias A, Scorilas A, Xynopoulos D, Talieri M. Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) expression in the progression of colon adenoma to carcinoma. *Biol Chem*. 2014, 395: 1105-1117.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007, 9: 654–659.
- Vandell AG, Larson N, Laxmikanthan G, Panos M, Blaber SI, Blaber M, Scarisbrick IA. Protease-activated receptor dependent and independent signaling by kallikreins 1 and 6 in CNS neuron and astroglial cell lines. *J Neurochem*. 2008; 107: 855-870.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002, 111: 241-250.
- 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: 631–643.
- Vilar E and Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010, 7: 153-162.
- Walker F, Nicole P, Jallane A, Soosaipillai A, Mosbach V, Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Magdolen V, Darmoul D. Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. *Biol Chem*. 2014, 395: 1075-1086.
- Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003, 787(1):197-206.
- Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut*. 2006, 55: 115-122.
- Wang JY, Wang YH, Jao SW, Lu CY, Kuo CH, Hu HM, Hsieh JS, Chong IW, Cheng TL, Lin SR. Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. *Oncol Rep*. 2006, 16: 1245-1252.

- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2001, 344: 1196–1206.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature.* 2001, 411:834-842.
- Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* 2010, 70: 9621-9630.
- Weber GF. Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer Lett.* 2008, 270: 181-190.
- Werle E. Zur Kenntnis des haushalts des Kallikreins. *Biochem Z.* 1934, 269: 415–434.
- White NM, Bui A, Mejia-Guerrero S, Chao J, Soosaipillai A, Youssef Y, Mankaruos M, Honey RJ, Stewart R, Pace KT, Sugar L, Diamandis EP, Doré J, Yousef GM. Dysregulation of kallikrein-related peptidases in renal cell carcinoma: potential targets of miRNAs. *Biol Chem.* 2010 α , 391: 411-423.
- White NM, Chow TF, Mejia-Guerrero S, Diamandis M, Rofael Y, Faragalla H, Mankaruos M, Gabriel M, Girgis A, and Yousef GM. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2010 β , 102: 1244-1253.
- Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans.* 2013, 41: 245-251.
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N and Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009, 6: 359-362.
- Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010, 31: 31-38.
- Wu JS. Rectal cancer staging. *Clin Colon Rectal Surg.* 2007, 20: 148-157.
- Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li J, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 2007, 67: 2649-2656.
- Xi Z, Klock 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: 2365-2370.
- Yamamoto M, Miyai M, Matsumoto Y, Tsuboi R, Hibino T. Kallikrein-related peptidase-7 regulates caspase-14 maturation during keratinocyte terminal differentiation by generating an intermediate form. *J Biol Chem.* 2012, 287: 32825-32834.

- Yamasaki K, Schaubert 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: 2068–2080.
- Ye JJ, Cao J. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. *World J Gastroenterol.* 2014, 20: 4288-4299.
- 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: 31852-31864.
- Yousef GM and Diamandis EP. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem.* 2002 α , 383: 1045-1057.
- Yoon H, Blaber SI, Li W, Scarisbrick IA, Blaber M. Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 2013, 394: 137-147.
- Yousef GM. microRNAs: a new frontier in kallikrein research. *Biol Chem.* 2008, 389: 689-694.
- Yousef GM and Diamandis EP. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: Emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem.* 2003 α , 36: 443-452.
- Yousef GM and Diamandis EP. Expanded human tissue kallikrein family – A novel panel of cancer biomarkers. *Tumor Biol.* 2002 β , 23: 185-192.
- Yousef GM and Diamandis EP. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem.* 2002 α , 383: 1045-1057.
- Yousef GM and Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev.* 2001, 22: 184-204.
- Yousef GM and Diamandis EP. Tissue kallikreins: new players in normal and abnormal cell growth? *Thromb Haemost.* 2003 β , 90: 7-16.
- Yousef GM, Bharaj BS, Yu H, Pouloupoulos J, Diamandis EP. Sequence analysis of the human kallikrein gene locus identifies a unique polymorphic minisatellite element. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 α , 285: 1321–1329.
- Yousef GM, Borgoño CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A and Diamandis EP. *In-silico* analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. *Anticancer Res.* 2004 β , 24: 43–52.
- Yousef GM, Borgoño CA, Scorilas A, Ponzzone 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: 1287-1293.
- Yousef GM, Chang A, Scorilas A, and Diamandis EP. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 α , 276: 125-133.

- Yousef GM, Elliott MB, Kopolovic AD, Serry E, Diamandis EP. Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochim Biophys Acta*. 2004**α**, 1698: 77-86.
- Yousef GM, Fracchioli S, Scorilas A, Borgoño 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**β**, 119: 346-355.
- Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta*. 2003**α**, 329: 1-8.
- Yousef GM, Magklara A, Chang A, Jung K, Katsaros D, Diamandis EP. Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res*. 2001**β**, 61: 3425-3431.
- Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, Magklara A, Borgoño CA, Kishi T, Memari N, Michael P, Sidiropoulos M, Kurlender L., Economopolou K, Kapadia C, Komatsu N, Petraki C, Elliott M, Scorilas A, Katsaros D, Levesque MA, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv. Clin Chem*. 2005**α**, 39: 11-79.
- 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**β**, 254: 119-128.
- 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**γ**, 56: 287-292.
- Yousef GM, White NM, Michael IP, Cho JC, Robb JD, Kurlender L, Khan S, Diamandis EP. Identification of new splice variants and differential expression of the human kallikrein 10 gene, a candidate cancer biomarker. *Tumour.Biol*. 2005**β**, 26: 227-235.
- Zhang CY, Zhu Y, Rui WB, Dai J, Shen ZJ. Expression of kallikrein-related peptidase 7 is decreased in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2014.
- Zhang R, Shi H, Chen Z, Feng W, Zhang H, Wu K. Effects of kallikrein-related peptidase 14 gene inhibition by small interfering RNA in ovarian carcinoma cells. *Mol Med Rep*. 2012, 5: 256-259.
- 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: 934-940.

Zhao H, Dong Y, Quan J, Smith R, Lam A, Weinstein S, Clements J, Johnson NW, Gao J. Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011, 33: 566-572.

Zorzi E, Bonvini P. Inducible hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity. *Cancers (Basel)*. 2011, 3: 3921-3956.

Αγνάντη ΝΙ, Μαλάμου-Μήτση Β, Στεφάνου Δ, Μπαή Μ, Μπατιστάτου Α. Γενική –Ειδική Παθολογική Ανατομική, Εκδόσεις Θεοδωρίδου, Ιωάννινα, 2005.

Μαργαρίτης ΛΧ, Γαλανόπουλος ΒΚ, Κεραμάρης ΚΕ, Μαρίνος ΕΣ, Παπασιδέρη ΙΣ, Στραβοπόδης ΔΙ, Τρουγκάκος ΙΠ. Βιολογία Κυττάρου. 4^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2008.

Σκορίλας Α. Αρχές Κλινικής Χημείας και Μοριακής Διαγνωστικής. Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, 2009.

Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου Φ. Διήθηση και μετάσταση στον καρκίνο. Δελτίο Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών. 2009, 56: 48-65.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

Devetzi M, Trangas T, Scorilas A, Xynopoulos D, Talieri M. Parallel overexpression and clinical significance of kallikrein-related peptidases 7 and 14 (*KLK7* & *KLK14*) in colon cancer. *Thrombosis & Haemostasis*. 2013, 109(4): 716-725.

B. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. **Devetzi M**, Talieri M, Trangas T, Samiotaki M, Panayotou G. Silencing of Kallikrein-related peptidase 7 (*KLK7*) in HCT116 colon cancer cells: Invasiveness and Proteomic analysis. *Clin Chem Lab Med*, eA32, 2014.

2. **Devetzi M**, Talieri M, Trangas T, Scorilas A, Poulakis A, Basioukas S, Kypraios D, Xynopoulos D. Clinical impact of human Kallikrein-related peptidases 7 and 14 in colorectal cancer. *Gut*, 60 (Suppl.3), A20, 2011.

3. **Devetzi M**, Papachristopoulou G, Petrou V, Arnogiannaki N, Scorilas A, Kypraios D, Xynopoulos D, Talieri M. Immunohistochemical localization and clinical evaluation of Kallikrein-related peptidase 14 (*KLK14*) in colon cancer. *Clin Chem Lab Med*, eA46, 2014.

4. **Devetzi M**, Trangas T, Scorilas A, Poulakis A, Katerinis P, Xynopoulos D, Apostolaki A, Talieri M. Human Kallikrein-related peptidase 14 (*KLK14*) expression in colorectal cancer and non-cancer tissues. 4th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-related peptidases (ISK 2011), Rhodes Island, Greece, P30, 2011.

5. **Devetzi M**, Talieri M, Trangas T, Samiotaki M, Panayotou G. Down-regulation of Kallikrein-related peptidase 7 (*KLK7*) in HCT116 colon cancer cells: Impact on invasiveness and proteomic analysis. 64th Congress of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece, P66, 2013.

Parallel overexpression and clinical significance of kallikrein-related peptidases 7 and 14 (*KLK7* & *KLK14*) in colon cancer

Marina Devetzi^{1,2}; Theoni Trangas²; Andreas Scorilas³; Dimitris Xynopoulos⁴; Maroulio Talieri¹

¹G. Papanicolaou Research Center of Oncology, Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece; ²Department of Biological Applications & Technologies, School of Sciences and Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, Athens, Greece; ⁴Department of Gastroenterology, Saint Savvas Cancer Hospital, Athens, Greece

Summary

Currently available colon cancer (CC) markers lack sensitivity and specificity. Kallikrein-related peptidases (*KLKs*) present a new class of biomarkers under investigation for diverse diseases, including cancer. *KLKs* are co-expressed in various tissues participating in proteolytic cascades. *KLK7* in human tumours facilitates metastasis by degrading components of the extracellular matrix. *KLK14* promotes tumorigenesis by activating proteinase-activated receptors. In the present study we examined the concomitant expression of *KLK7* and *KLK14* in 245 colonic tissue specimens from 175 patients; 70 were pairs of cancerous-normal tissues, 31 were cancerous tissues and 74 were colonic adenomas. We used quantitative real-time PCR and proved that both genes are up-regulated in CC at the mRNA level. Receiver-operating characteristic (ROC) analysis of our results showed that both genes

have discriminatory value between CC and adenoma tissues, with *KLK14* obtaining greater distinguishing power (area under the curve [AUC]=0.708 for *KLK14*; AUC=0.669 for *KLK7*). Current work showed that the two genes are fairly co-expressed in all three types of colon tissues examined (normal $r_s=0.667$, $p<0.001$, adenomas $r_s=0.373$, $p=0.001$, carcinomas $r_s=0.478$, $p<0.001$). *KLK14* is associated with shorter disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of patients ($p=0.003$, $p=0.016$ respectively), whereas *KLK7* only with shorter DFS ($p=0.004$). *KLK7* and *KLK14* gene expression can be regarded as markers of poor prognosis for CC patients with discriminating power between CC and adenoma patients.

Keywords

KLK7, *KLK14*, co-expression, colon cancer, cell lines

Correspondence to:

Dr. Maroulio Talieri
Department of Cellular Physiology
G. Papanicolaou Research Center of Oncology, Saint Savvas Cancer Hospital
171, Alexandras Avenue, Athens 11522, Greece
Tel: +30 210 6409522, Fax: +30 210 6424163
E-mail: talieri@agsavvas-hosp.gr or litsa.talieri@yahoo.com

Financial support:

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program „Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

Received: July 25, 2012

Accepted after major revision: October 20, 2012

Prepublished online: December 6, 2012

doi:10.1160/TH12-07-0518

Thromb Haemost 2013; 109: 716–725

Introduction

Colon cancer (CC) is by far the most common malignancy of the gastrointestinal tract representing the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females (1). Although endoscopy remains currently the most important screening procedure with therapeutic value (polypectomy) for CC (2), prognostic and/or predictive markers for this type of malignancy lack specificity and sensitivity. As a consequence, new biomarkers are needed. Proteases provide good candidates, since they have long been associated with cancer progression, due to their ability to degrade extracellular matrices (ECMs) which facilitates invasion and metastasis (3). Proteases participate in multiple physiological processes, such as blood pressure regulation, skin desquamation and semen liquefaction (4). Pathological conditions, such as tumour metastasis, are attributed to deregulated protease activation systems (5).

Kallikrein-related peptidases (*KLKs*) are 15 serine proteases that cluster on chromosome 19q13.4, and play important roles in different physiologic processes. Their tissue co-expression patterns led to the hypothesis that the encoded proteins participate in proteolytic cascades (6). Abnormal expression of *KLKs* interferes with different stages of cancer growth. *KLKs* are being widely examined as cancer biomarkers, mostly in steroid-hormone-regulated cancers, since steroid hormones play an important role in the regulation of *KLK* transcription (7). However, recent studies indicate that other mechanisms cooperate in *KLK* regulation as well (4).

The *KLK7* gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE), originally purified from skin by Egelrud (8), is a chymotrypsin-like enzyme, cloned and characterised by Hansson et al. (9). Its genomic characterisation, mapping, tissue expression and hormonal regulation were reported by Yousef et al. (10). Functionally, *KLK7* with *KLK5* have been suggested to cata-

lyse the degradation of intercellular cohesive structures in the stratum corneum, by degrading corneodesmosomes, the junctional structures that mediate corneocyte cohesion, as a prerequisite for stratum corneum desquamation (11). KLK7 in human tumours facilitates metastasis by directly degrading components of the ECM, such as fibronectin and may, thus, play an important role in tumourigenesis (12). KLK7 also degrades desmosomal proteins like desmoglein1 and desmoglein2, contributing to diminished cell-cell adhesion and facilitating tumour cell invasion (13). In pancreatic cancer KLK7 diminishes cancer cell adhesion to vitronectin and enhances urokinase-type plasminogen activator receptor (uPA) shedding (14). Also KLK7 can activate MMP-9 in pathological conditions like cancer leading to gelatinolytic activity (15).

The physiological role of KLK7 in the desquamation process of the stratum corneum was shown by Egelrud (16). Different pathologies of the skin are attributed to deregulation of *KLK7* expression (17-20). Brattsand et al. (21) reported that pro-KLK7 and pro-KLK14 can be activated *in vitro* by KLK5, which can also activate its own precursor, and that KLKs 5, 7 and 14 are in catalytically active form in the stratum corneum resembling, thus, a proteolytic cascade. Recently, Martins et al. (22) showed a coordinated decrease in the expression of KLKs 6, 7, 8 and 13 (in terms of mRNA and protein) suggesting a role of these proteases in the epithelial to mesenchymal transition of primary cutaneous melanoma. Moreover, KLK7 induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells, implying a role in prostate cancer invasion and progression (23).

KLK7 is highly expressed in the normal cervix, ovaries, testis, esophagus, stomach, but it demonstrates low expression in the normal colon (24). *KLK7* has been shown to be differentially expressed in various cancer types; it is either up-regulated as in ovarian, intracranial, colorectal, cervical, and oral squamous carcinoma (25-29) or down-regulated as in melanoma, prostate and lung cancer (22, 30, 31), whereas in breast cancer there are contradictory reports (32-34).

KLK14 was cloned by Yousef et al. (35) and characterised by Hooper et al. (36). It is highly expressed at the mRNA level in the normal brain, prostate, testis and thymus, whereas it has low expression in the normal colon (24). *KLK14* is a secreted protease that has dual activity, trypsin- and chymotrypsin-like, with a preference for cleavage after arginine residues and it is under steroid-hormone regulation (37, 38). Stefansson et al. (39) detected *KLK14* at the plantar stratum corneum in addition to higher levels of *KLK5* and *KLK7* and revealed that it is present in its catalytically active form and responsible for as much as 50% of the total trypsin-like activity in this tissue. Its catalytic activity is regulated by autolytic cleavage that leads to enzymatic inactivation, by the inhibitory serpins (α 1-antitrypsin, α 2-antiplasmin, antithrombin III and α 1-antichymotrypsin) and by citrate and Zn^{++} ions (38). Functionally, *KLK14* is involved in proteolytic cascades of skin and seminal plasma contributing to their homeostasis (4). Furthermore, Felber et al. (37) identified potential substrates for human *KLK14*, among them laminin alpha-5 and collagen IV, which also constitute major components of the ECM.

Physiologically, *KLK14* takes part in epidermal desquamation (38) and its deregulation leads to illnesses such as atopic dermatitis (40) or acute eczematous atopic skin (20). A major role in seminal clot liquefaction is also attributed to *KLK14* by activating several other pro-KLKs and cleaving directly semenogelins I and II (5).

KLK14 is over-expressed in breast, prostate, ovarian, and salivary gland tumours (41-43). *KLK14* is produced by colonic tumours and promotes tumourigenesis by activating proteinase-activated receptors (PARs) (44, 45).

In the present study we examined the concomitant expression of *KLK7* and *KLK14* in the same cohort of colon cancer samples, their normal counterparts and in colonic adenomas, using real-time PCR. We showed that *KLK14* is an unfavourable prognostic indicator for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of patients, whereas *KLK7* reveals poor prognosis only for OS. Both of them have discriminatory value between CC and adenoma tissues, especially *KLK14*.

Materials and methods

Study group

In this study were included 245 colonic tissue specimens obtained from 175 patients at Saint Savvas Cancer Hospital of Athens, from 2002 to 2011. CC specimens were acquired from 101 patients who underwent surgery for primary infiltrating CC. For 70 out of 101 CC patients, normal paired colonic mucosa, sufficiently separated from the tumour (at least 10 cm), was also available. As normal paired tissues from now on, we consider the non-cancer tissue adjacent to the colonic tumour. All cases under study came from total surgical removal. No chemotherapy or radiotherapy was administered before surgery. Our study also comprised 74 colonic adenomas, which were resected during colonoscopy, but were not included in the survival analysis. Cancerous, adenoma and normal colonic tissues were evaluated by eosin-hematoxylin staining of paraffin sections. Informed consent was obtained from all patients. The samples were followed by an updated database containing clinical and histological information about the tumour (tumour size, grade, stage, etc.) that was used for the statistical analysis of the results. The staging was performed according to the TNM system, as introduced by the American Joint Committee on Cancer (46). Cancer patients' mean age was 68.4 ± 1.2 with a range of 31.0-92.0 years, while adenoma patients' age ranges from 41.0-86.0 years, with a mean of 67.76 ± 1.34 years. Follow-up information ranged from 1 to 111 months. Two time-to-event outcomes after surgery were recorded: DFS and 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. Investigations were carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1995, as revised in Tokyo 2004.

Ethics

Agreement of the Institute's Ethics Committee for the scientific analysis of the tumour tissues had been obtained as well as patients' written informed consent.

RNA isolation – reverse transcription

Upon collection, colon tissue samples were immersed in RNA-later® solution (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA) and kept at -80°C , until RNA extractions were performed. After tissue homogenisation, total RNA was extracted with NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), which yields highly pure RNA, according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed using oligo(dT) primer, with the SuperScript™ II Reverse-Transcriptase pre-amplification system (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), as described elsewhere (47).

Selection of the most stably expressed reference gene

We used the geNorm™ Housekeeping Gene Selection Kit with PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, Southhampton, UK), containing a panel of six candidate reference genes (*GAPDH*, *18S RNA*, *B2M*, *EIF4A2*, *YWHAZ*, *CYC1*) in order to determine the most constitutively expressed housekeeping gene in normal and CC tissues. The expression of the six candidate genes was measured in 20 high quality cDNA samples of each colon tissue type by quantitative real-time PCR using PerfectProbe™ technology protocols (PrimerDesign Ltd) and the data were analysed by the geNorm™ software, according to the manufacturer's instructions. Cytochrome c-1 (*CYC1*) was found to be the best reference gene for accurate normalisation of *KLK7* and *KLK14* gene expression in colon samples, and therefore it was used as reference.

Quantitative real-time PCR

Singleplex fluorescent-based quantitative real-time PCR assay (qPCR) was performed for the determination of *KLK14* and *KLK7* mRNA expression levels in the colon specimens on an ABI Prism 7500 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We implemented the PerfectProbe™ assay technology (PrimerDesign Ltd), which provides a more sensitive detection than TaqMan chemistry. *KLK7* and *KLK14* gene-specific primers designed by PrimerDesign were used for quantification, detecting the four identified *KLK7* transcript variants (NCBI Ref. Sequences: NM_005046 variant 1, NM_139277 variant 2, NM_001207053 variant 3 and NM_001243126 variant 4) and the one identified *KLK14* mRNA form (NCBI Ref. Sequence: NM_022046). For *KLK7* target gene, the primers used were: sense 5' – GCA CTC TCA AAC ACT GGA ACT – 3', anti-sense 5' – CCT AAG ATT AGA GTT ACT GGG TCA A – 3' (PCR product length 112bp). For *KLK14* target gene, the primers used were: sense 5' – AGA AGC TGG ATT GAG GAA ACG – 3', anti-sense 5' – TCC TGG

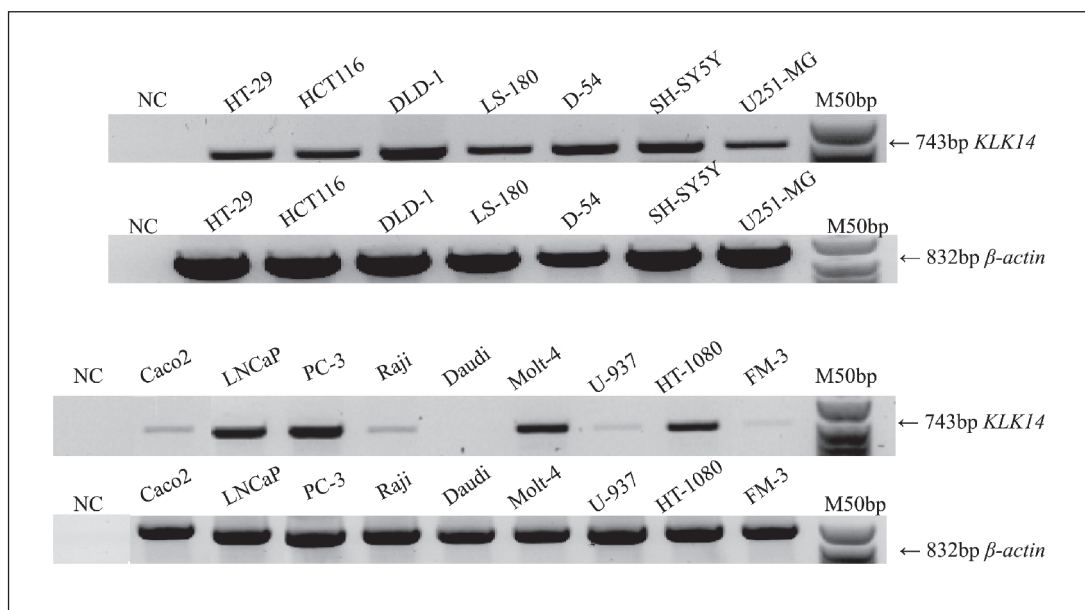
GTC CTG AGT AGA GA – 3' (PCR product length 103bp). The endogenous control *CYC1* gene expression was quantified with the use of PerfectProbe™ reference gene assay kit (PrimerDesign Ltd). HT29 colon cancer cell line, which expresses highly both target genes, was used as calibrator.

The final 20 μl reaction volume includes 10 μl of Gene Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μl of reconstituted PerfectProbe™ primer mix, 4 μl PCR-grade water and 5 μl cDNA template containing 100 ng of cDNA in PCR-grade water. The two-step thermal protocol for PerfectProbe™ method includes: an enzyme activation step at 95°C for 10 minutes (min) followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds (sec), data collection at 50°C for 30 sec and final extension at 72°C for 15 sec. Both *KLK7* and *KLK14* targets and *CYC1* reference gene were amplified in separate triplicate reactions for each sample and the average CT value was calculated. The assessment of *KLK7* and *KLK14* mRNA expression was carried out by relative quantification analysis using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ comparative method (48), where *CYC1* expression was used for the genes' expression normalisation in samples and in the HT29 colon cancer cell line, which was the calibrator.

Statistical analysis

The X-tile algorithm was used to generate an optimal cut-off point for *KLK7* and *KLK14* (49), after correction for the use of minimum p-value statistics, as there are no established cut-off points concerning their expression in CC. According to this cut-off, *KLK7* and *KLK14* mRNA expression was classified as high or low and associations between *KLK7* or *KLK14* mRNA expression status and other qualitative clinicopathological parameters were analysed using the Chi-square (χ^2) or the Fisher's Exact test, where appropriate. A Logistic regression model was developed to evaluate the association (i.e. hazard ratio [HR] and its confidence interval) between the potential prognostic marker and DFS or OS. This analysis was conducted at both univariate and multivariate levels. The multivariate models were adjusted for tissue grade, TNM stage and size of the tumours. Survival analysis was performed by constructing Kaplan-Meier DFS and OS curves for *KLK7*-high and *KLK7*-low patients or *KLK14*-high and *KLK14*-low patients, and the Wilcoxon Signed log-rank test was used to compare survival between subgroups of patients. Associations between *KLK7* or *KLK14* expression status and carcinoma or adenoma tissues were calculated by the Mann-Whitney test. Furthermore, associations between *KLK7* and *KLK14* expression status in carcinoma, in adenoma or in normal tissues were evaluated by the Spearman's correlation coefficient. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were constructed for *KLK7* and *KLK14* expression levels in carcinoma versus adenoma tissues, by plotting sensitivity versus (1-specificity). The areas under the ROC curves (AUC) were analysed by Hanley and McNeil method. Other analyses of statistical links between biological and clinical parameters were performed using standard tests. A p-value of 0.05 (or less) was considered as statistically significant.

Figure 1: Ethidium bromide stained agarose gel of RT-PCR for KLK14 and β -actin (endogenous control) genes in various cancer cell lines. NC: negative control, M: DNA marker.



Cell lines and culture conditions

All 16 human cancer cell lines examined were obtained from the American Tissue Type Collection (Manassas, VA, USA). From the cell lines examined, LNCaP and PC-3 are prostate cancer cell lines; DLD-1, HT-29, LS-180, HCT116 and Caco2 are colon adenocarcinoma cell lines; D-54, SH-SY5Y, U251-MG are brain cancer cell lines; Raji and Daudi are Burkitt's lymphoma cell lines; Molt-4 is acute lymphoblastic leukemia cell line; U-937 is histiocytic lymphoma cell line; HT1080 is a fibrosarcoma cell line and, finally

FM-3 is melanoma cell line. All culture media were obtained from Invitrogen and supplemented with 10% fetal bovine serum, as well as 40 mg/l Gentamicin sulfate. All cells were grown at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

RT-PCR

KLK7 gene expression was determined in various cell lines, including colon, in our previous work (27). For the amplification of *KLK14*, a pair of gene-specific primers was designed to detect

Table 1: Distribution of numerical variables in patients of primary CC of the study.

Variable	Mean \pm SE	Range	Percentiles (Median)				
			10	25	50	75	90
Cancer patients							
<i>KLK7</i> (RQ units)							
Cancer (N=99)	1.13 \pm 0.44	0.001–39.7	0.006	0.032	0.17	0.68	1.87
Normal (N=67)	0.84 \pm 0.53	0.001–35.5	0.001	0.001	0.003	0.19	1.48
<i>KLK14</i> (RQ units)							
Cancer (N=101)	5.37 \pm 6.64	0.36–474.18	1.17	2.27	8.07	39.95	94.15
Normal (N=70)	21.05 \pm 5.51	0.06–317.63	0.68	1.41	4.01	18.01	58.42
Age (years)	68.4 \pm 1.2	31.0–92.0	54.6	60.0	68.0	77.5	83.2
Tumour size (cm)	4.17 \pm 0.16	1.20–12.00	2.50	3.17	4.00	5.00	6.10
DFS (months)	23.3 \pm 3.1	1.0–111.0	1.0	3.0	11.0	30.0	62.8
OS (months)	26.5 \pm 2.9	1.0–111.0	3.0	7.0	14.0	34.0	62.8
Adenoma patients							
<i>KLK7</i> (RQ units) (N=74)	0.56 \pm 0.31	0.001–21.34	0.002	0.006	0.039	0.17	0.69
<i>KLK14</i> (RQ units) (N=74)	12.98 \pm 4.05	0.11–232.26	0.39	0.87	2.24	8.01	31.0
Age (years)	67.76 \pm 1.34	41.0–86.0	54.0	59.0	71.0	76.0	81.0

Table 2: KLK7 and KLK14 expression in pairs of primary cancerous and normal colon tissues.

Variable	Number of patients (%)	P-value *
<i>KLK7</i>		
Higher in cancer vs. normal	56 (83.6)	
Lower in cancer vs. normal	10 (14.9)	<0.001
Approx. equal in both tissues	1 (1.5)	
<i>KLK14</i>		
Higher in cancer vs. normal	45 (64.3)	
Lower in cancer vs. normal	25 (35.7)	0.035
Approx. equal in both tissues	0 (0.0)	

* Calculated by the Wilcoxon Signed Ranks Test.

KLK14 mRNA form (NCBI Ref. Sequence NM_022046). Forward primer anneals to the start of exon 3 and reverse primer anneals to the middle of exon 7 [forward 5'- GCCCTCAGC CCCTAAAATGTT CC - 3'; reverse 5'- AGCTTCTG-TACTTGCACAGGTTGG - 3' (amplicon length 743bp)]. After optimisation, PCR was carried out in a 20 µl reaction mixture containing 100 ng of cDNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 µM each dNTP (deoxynucleoside triphosphates), 0.25 µM of each primer, and 2 units of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) on a thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). The cycling conditions for *KLK14* were: a denaturation step at 94°C for 9 min, followed by 36 cycles of 94°C for

30 sec, 68°C for 50 sec and 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 8 min. Reference gene *β-actin* was amplified as described elsewhere (27). Equal amounts of PCR products for *KLK14* and *β-actin* genes were electrophoresed on 1.5% agarose gels and visualised by ethidium bromide staining.

Results

Tissue *KLK7* and *KLK14* expression analysis and relation to clinical and pathological variables

► Figure 1 shows the *KLK14* expression profile in different cell lines examined during the method development procedure. We have presented the expression of *KLK7* in the same cell lines in a previous study (27). In the current study we examined 245 colon tissues, obtained from 175 patients, for the expression of *KLK7* and *KLK14* genes, using quantitative real-time PCR: 101 colon tumours, for 70 of which paired normal mucosa was also available, and 74 adenomas. For *KLK7* gene expression 67 normal samples yielded analysable data, whereas for *KLK14* all 70 normal tissues were analysed.

The distribution of numerical variables in patients with primary CC of our study is presented in ► Table 1. We found that there is significant differential expression of the two *KLK* genes in the three types of colon tissue under study. *KLKs* 7 and 14 mRNA expression is significantly higher in CC specimens than normal counterparts ($p < 0.001$ and $p = 0.035$, respectively), as shown in ► Table 2. Moreover, *KLKs* 7 and 14 expression is significantly higher in CC specimens compared to adenoma specimens ($p < 0.001$ for both of them), as illustrated in ► Figure 2. Both *KLKs*

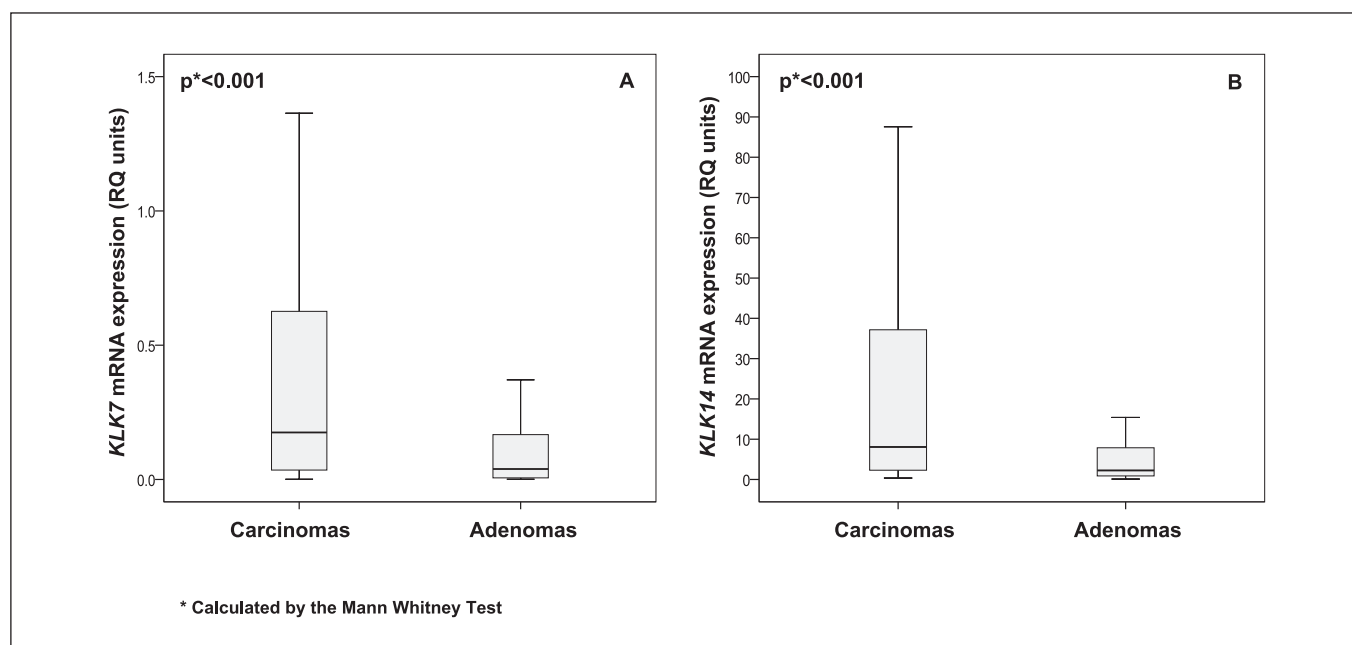


Figure 2: Mann-Whitney non-parametric test shows the significant differential expression of KLK7 (A) and KLK14 (B) in CC tissues and adenomas. Quartiles (25th, 50th-median, 75th percentiles) are within the box. The horizontal lines indicate the medians. The upper and nether horizontal lines indicate the 90th and 10th percentiles, respectively.

7 and 14 high mRNA expression is statistically significantly associated with positive nodal status ($p=0.015$ and $p=0.019$, respectively), as well as more advanced TNM stage of the disease, especially *KLK7* ($p=0.004$ and $p=0.043$, respectively), as shown in ► Table 3. Spearman's rank correlation coefficient (► Figure 3) revealed that mRNA expression of the two *KLK* genes is positively correlated in all types of colon tissue: cancer, adenoma and normal ($r_s=0.478$, $r_s=0.373$ and $r_s=0.667$, respectively), and the correlation is more significant in the normal tissue.

Evaluation of *KLK7* and *KLK14* gene expression in discriminating cancer from adenoma

In order to evaluate the discriminatory value of *KLKs* 7 and 14 mRNA expression profiles between cancer and adenoma patients, we performed ROC analyses. ROC curves were constructed for both *KLKs* expression levels, by plotting sensitivity versus (1-specificity). The AUC areas were analysed by Hanley and McNeil method. The ROC curves (► Figure 4) illustrate the discriminatory power of both *KLKs* 7 & 14 mRNA expression levels (especially *KLK14*) in distinguishing cancer from adenoma patients. *KLK14* mRNA expression shows fair discriminating power (AUC = 0.708; 95%CI = 0.630-0.786; $p<0.001$), whereas *KLK7* only has poor discriminating value (AUC = 0.669; 95%CI = 0.588-0.750; $p<0.001$).

Association of *KLK7* and *KLK14* expression status with DFS and OS of patients

Follow-up information (ranging 1-111 months) was available for 95 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, 25 patients (26.3%) had relapsed and 22 patients (23.2%) had died. Univariate analyses of *KLKs* 7 and 14 expression with regard to DFS and OS, using the Logistic regression model, revealed that high *KLK7* expression is a significant indicator of prognosis only for OS (HR=1.93, $p=0.032$), whereas high *KLK14* expression is a significant prognostic factor for DFS (HR=1.80, $p=0.018$) and OS (HR=2.18, $p=0.002$) (► Table 4). Multivariate analyses adjusted for tissue grade and TNM stage, showed no significant associations with DFS or OS of CC patients for neither *KLK* gene under study. Only tumour size showed a significant association with DFS (HR=2.08, $p=0.022$ for *KLK7* and HR=2.041, $p=0.014$ for *KLK14*) and OS (HR=2.80, $p=0.007$ for *KLK7* and HR=2.45, $p=0.006$ for *KLK14*). Survival curves determined by the Kaplan-Meier method for DFS and OS, demonstrated that high *KLK7* expression is significantly associated with shorter DFS ($p=0.004$), but not with OS of CC patients (► Figure 5). However, the same survival curves showed that high *KLK14* gene expression is significantly associated with shorter DFS ($p=0.003$) and OS ($p=0.016$) of CC patients (► Figure 6).

Table 3: Associations between *KLK7* and *KLK14* expression status and other clinical and pathological variables.

Variable	Total	No. of patients (%)		P-value ^b
		<i>KLK7</i> -low ^a	<i>KLK7</i> -high ^a	
Nodal status				
Negative	35	23 (65.7)	12 (34.3)	0.015
Positive	51	19 (37.3)	32 (62.7)	
Grade				
I/II	24	11 (45.8)	13 (54.2)	0.54
III	17	6 (35.3)	11 (64.7)	
TNM Stage				
I/II	37	26 (70.3)	11 (29.7)	0.004
III/IV	48	18 (37.5)	30 (62.5)	
Variable	Total	No. of patients (%)		P-value ^b
		<i>KLK14</i> -low ^c	<i>KLK14</i> -high ^c	
Nodal status				
Negative	36	13 (36.1)	23 (63.9)	0.019
Positive	53	7 (13.2)	46 (86.8)	
Grade				
I/II	25	7 (28.0)	18 (72.0)	0.26
III	18	2 (11.1)	16 (88.9)	
TNM Stage				
I/II	37	15 (70.3)	22 (59.5)	0.043
III/IV	50	7 (14.0)	43 (86.0)	

^aCut-off =0.18 RQ units equal to median. ^bFisher's Exact Test. ^cCut-off =2.28 RQ units equal to 25th percentile.

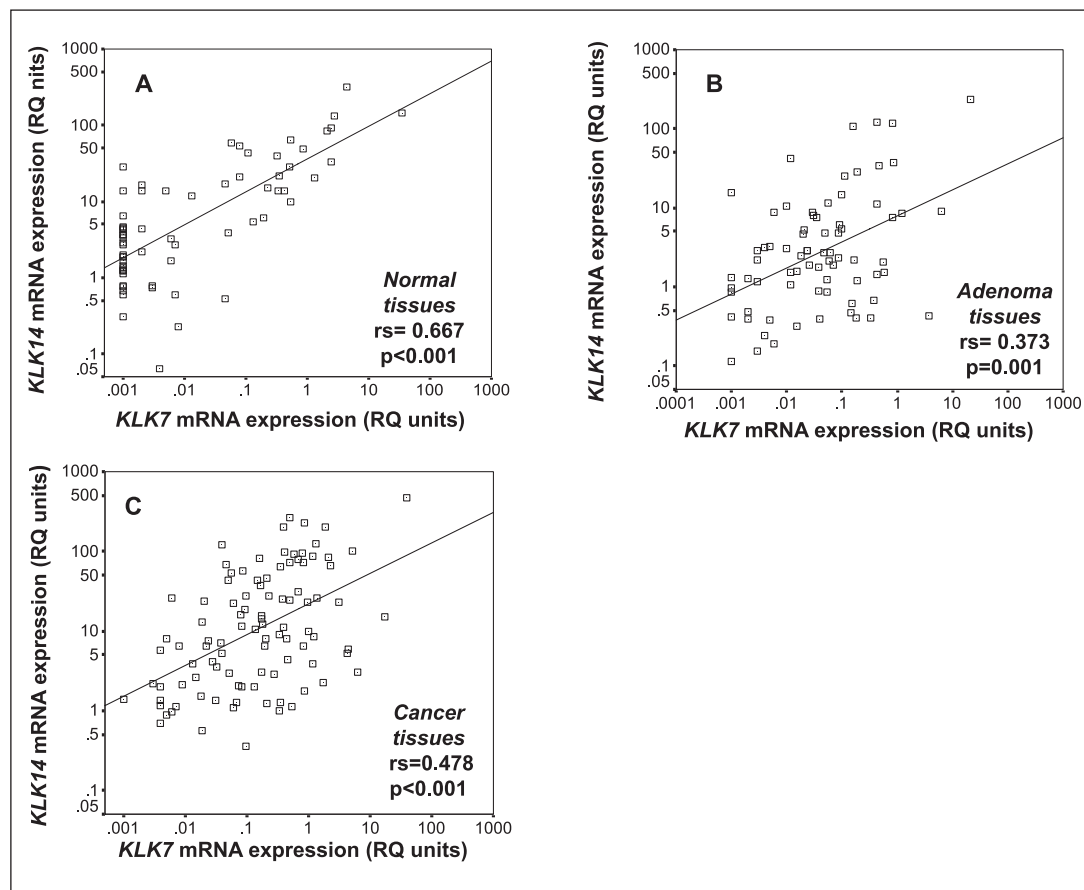


Figure 3: Spearman's correlation coefficient shows the positive correlation of KLK7 with KLK14 gene expression in the three types of colon tissue: normal (A), adenoma (B) and cancer (C).

Discussion

The goal of the current study was to analyse and to clinically evaluate the concomitant expression of *KLK7* and *KLK14* in CC samples and their normal mucosa counterparts, as well as in adenomas, since both enzymes are known to participate in KLK proteolytic cascades in the stratum corneum (21), in the seminal plas-

ma (5), in the salivary gland (43) and possibly in other tissues. Previously, others and we have also shown that *KLK5* and *KLK7* are co-expressed in breast cancer (33, 50).

In the present study we examined 245 colon tissues taken from 175 patients: 101 CC, 70 normal paired to CC and 74 adenoma tissues. Current work showed that the two genes are fairly or poorly co-expressed in the three types of colon tissues examined (normal

Univariate analysis	Disease-free survival			Overall survival		
	HR ^a	95% CI ^b	P-value	HR ^a	95% CI ^b	P-value
<i>KLK7</i>						
Low	1.00			1.00		
High	1.47	0.82–2.64	0.19	1.93	1.06–3.54	0.032
As continuous variable	1.24	0.89–1.73	0.18	1.32	0.91–1.92	0.13
<i>KLK14</i>						
Low	1.00			1.00		
High	1.80	1.10–2.93	0.018	2.18	1.32–3.61	0.002
As continuous variable	1.01	1.00–1.016	0.057	1.007	0.99–1.014	0.082
Grade (ordinal)	1.23	0.95–1.61	0.11	1.19	0.92–1.54	0.18
TNM stage (ordinal)	1.29	1.09–1.54	0.003	1.37	1.15–1.63	<0.001
Size (ordinal)	1.23	1.10–1.37	<0.001	1.27	1.13–1.43	<0.001

Table 4: Associations between KLK7 and KLK14 expression status and DFS or OS of patients.

rs=0.667, $p<0.001$; adenomas rs=0.373, $p=0.001$; carcinomas rs=0.478, $p<0.001$). Both genes are up-regulated at the mRNA level in CC and can distinguish CC from paired normal colon tissue, as well as CC from adenomas ($p<0.001$, $p<0.001$, respectively). *KLK14* is associated with shorter DFS and OS of patients ($p=0.003$, $p=0.016$, respectively), whereas *KLK7* only with shorter DFS ($p=0.004$). Therefore, they can be regarded as indicators of unfavourable prognosis for CC patients, nevertheless not independent. In our previous study (27) in which we also examined *KLK7* expression in CC, yet using semi-quantitative PCR method in a different cohort of CC samples than now, we had found *KLK7* association with both DFS and OS. Inoue et al. (51), examining *KLK7* expression in Japanese CC patients reported association only with OS. Despite the fact that there are some differences in the association of *KLK7* expression with DFS and OS of patients in the three studies, there is an agreement among them in the notion that *KLK7* is constantly up-regulated in CC. In both our studies *KLK7* expression is associated with TNM stage in contrast to Inoue et al. (51) findings reporting no such association. Additionally, in our previous work (27) we had some highly expressing normal colon samples, which we also had in the present study; the percentage of pairs with *KLK7* expression lower in cancer vs. normal in the two studies is fairly close (9.3% and 14.9%, respectively).

This is the first time that *KLK14* expression and its clinical significance are examined in CC tissue samples at the mRNA level. Gratio et al. (44) also examined *KLK14* immunostaining in clinical samples, adenocarcinomas and normal colonic tissues. In line with us, they reported that colon adenocarcinomas aberrantly express high levels of *KLK14* in contrast to normal colonic mucosa showing no *KLK14* staining in epithelial cells. In our previous study reporting on a multiparametric tissue KLK panel for CC, using

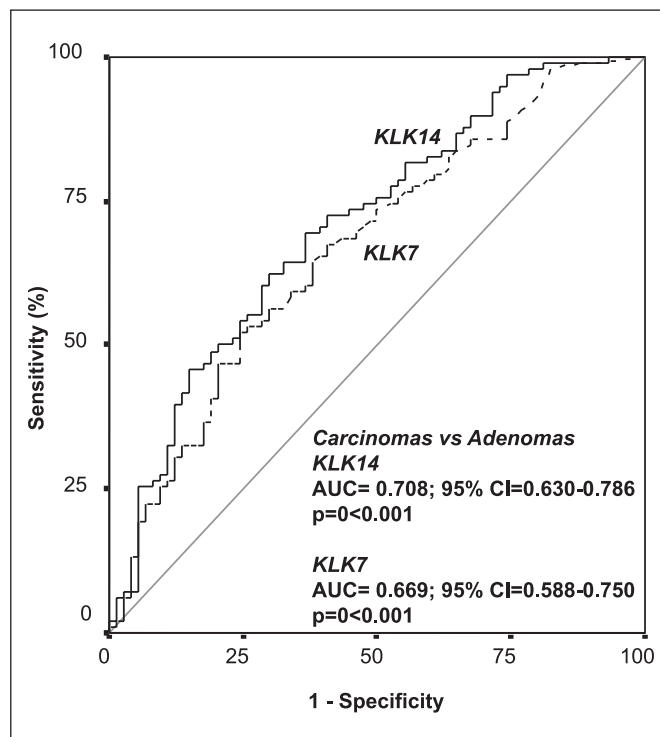


Figure 4: ROC curves of KLKs 7 and 14 mRNA expression levels between CC and adenoma patients.

ELISA we showed that *KLK7* has significantly higher expression in colorectal adenocarcinomas than their normal counterparts ($p<0.001$) (52). However, in the same study, *KLK14* expression was not statistically significantly different between CC and normal

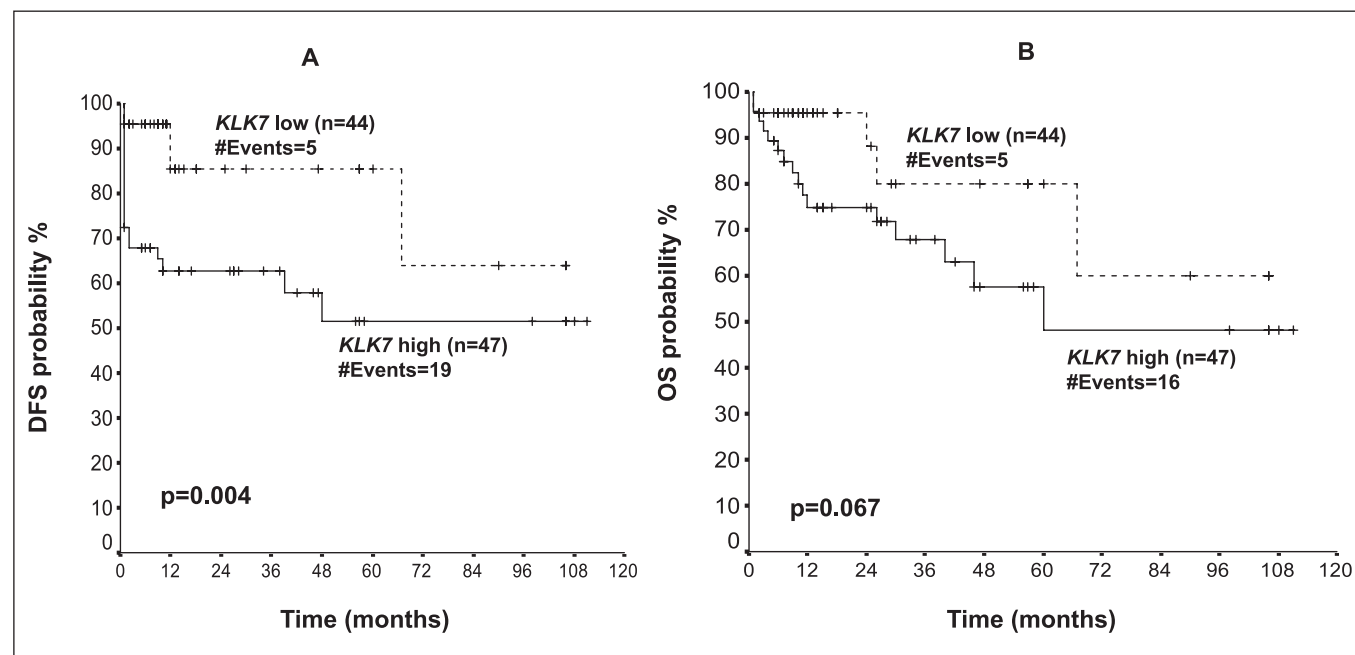


Figure 5: Kaplan-Meier curves for DFS (A) and OS (B) of CC patients with KLK7-high and KLK7-low gene expression.

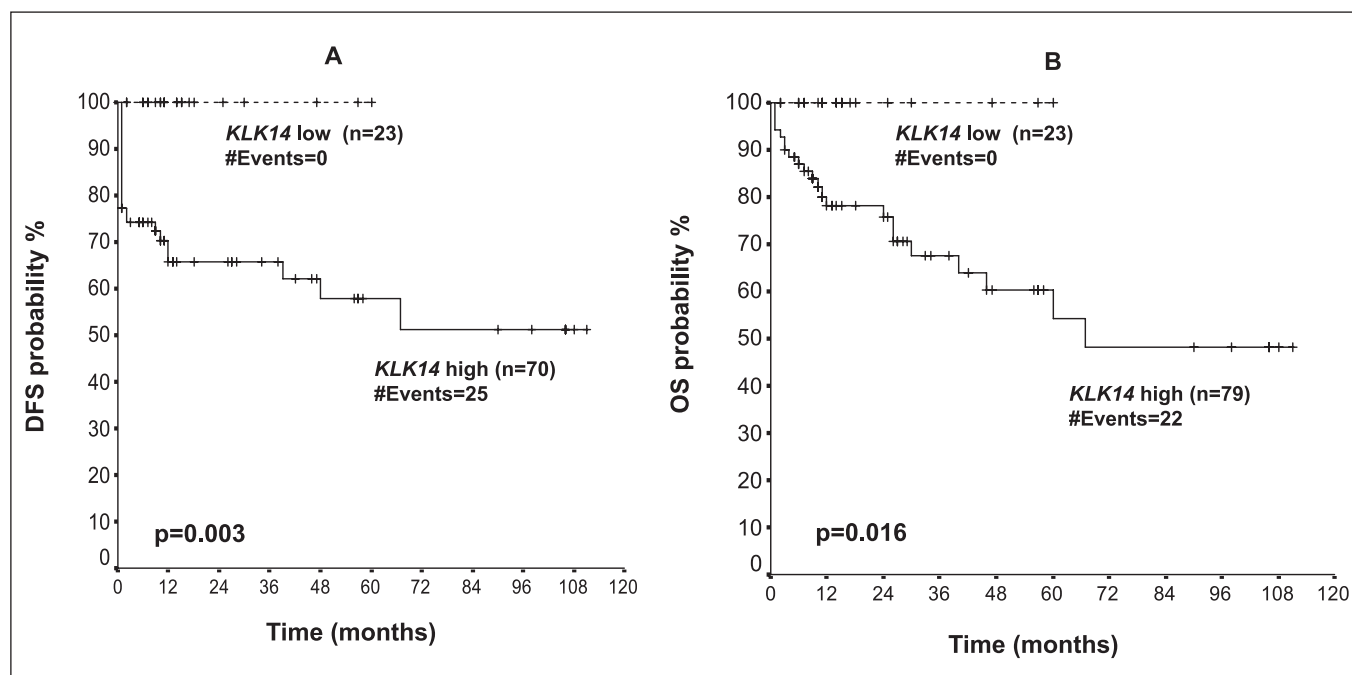


Figure 6: Kaplan-Meier curves for DFS (A) and OS (B) of CC patients with KLK14-high and KLK14-low gene expression.

colon tissue ($p=0.8738$). This controversy is probably due to the difference in the expression between mRNA and protein levels. Moreover, the clinical samples we used in the two studies originate from different patients.

ROC analyses of present results revealed that both genes have discriminatory value between CC and adenoma tissues, with *KLK14* obtaining greater discriminatory power than *KLK7* (*KLK14*, AUC=0.708; *KLK7*, AUC=0.669).

The expression of *KLK7* and *KLK14* in the CC cell lines of the present work was in agreement with data presented by Inoue et al. (51) and Gratio et al. (44), respectively, for the same CC cell lines examined. Also, all three studies showed that Caco2 cell line showing enterocyte-like differentiation and polarisation in culture has lower *KLK7* and *KLK14* expression in comparison to other highly aggressive CC cell lines such as HT-29, HCT116 or DLD-1.

KLK7 and *KLK14* co-expression and concomitant up-regulation in CC might suggest a potential cascade-like implication of the two enzymes in this tissue, similar to the one taking place in the stratum corneum desquamation, since there is a known epithelial cell exfoliating procedure in colon tissue (53). The functional role of *KLK7* in both physiology and pathological conditions like cancer has been extensively examined in various tissues, especially skin, pancreas and hormone-regulated tissues, nevertheless its physiological and/or pathological role in the colon remains poorly understood. Over-expression of *KLK7* during histological progression from normal colonic epithelium to adenomatous dysplasia and adenocarcinoma, might facilitate cancer microinvasion and finally metastasis. These can be accomplished by degradation of ECM components like fibronectin (12), by degradation of desmosomal proteins (13), by reduction of adhesion molecules like vitronectin and production of uPAR as in pancreatic cancer (14)

or *KLK7* might take part in the epithelial to mesenchymal transition as shown for melanoma (22).

On the other hand, present clinical work showing up-regulation of *KLK14* in CC supports the hypothesis reported by Chung et al. (45) that *KLK14* produced by colon tumours promotes tumourigenesis by activating PARs, representing an autocrine/paracrine regulator of colon tumourigenesis. Gratio et al. (44) have demonstrated that *KLK14* induces an increase in intracellular calcium in the CC cell line HT29 and that this calcium flux is associated with internalisation of *KLK14*-mediated activation of PAR2, as well as significant extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) phosphorylation, presumably by activating PAR2. Additionally, they suggested that *KLK14* signaling via PAR2 may represent a pathway for CC tumourigenesis and it could be regarded as possible therapeutic target for CC.

In the current clinical study we demonstrate *KLK7* and *KLK14* parallel over-expression in adenoma and CC compared to normal colonic tissue, which points to poor CC patient prognosis and thus, the two genes could serve as putative markers and/or therapeutic targets for this type of malignancy. We also provide insight into the discriminatory value of mRNA expression of the two *KLKs* between CC and adenoma tissues. Data reported previously by other clinical and functional studies together with present findings could imply the existence of a possible deregulated network of *KLK* interactions in CC, as it has been suggested for other aforementioned tissues, but more work is necessary in the future in order to shed light into the biological role of *KLKs* 7 and 14 both in colon physiology and pathology.

Conflicts of interest

None declared.

References

- Jemal, A, Bray, F, Center, M, et al. Global cancer statistics. *CA* 2011; 61: 69-90.
- He J, Efron JE. Screening for colorectal cancer. *Adv Surg* 2011; 45: 31-44.
- Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumor suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 800-808.
- Emami N, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: A road under construction. *Clin Chim Acta* 2007; 381: 78-84.
- Emami N, Diamandis EP. Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. Possible function in seminal plasma and skin. *J Biol Chem* 2008; 283: 3031-3041.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 2009; 284: 32989-32994.
- 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: 407-446.
- Egelrud T. Purification and preliminary characterisation of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 200-204.
- Hansson L, Strömqvist M, Bäckman A, et al. Cloning, expression, and characterisation of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 19420-19426.
- Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, et al. The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family-genomic characterisation, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene* 2000; 254: 119-128.
- Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 2005; 122: 1235-1244.
- Ramani VC, Haun RS. The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 1169-1173.
- Ramani VC, Hennings L, Haun RS. Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 373.
- Ramani VC, Haun RS. Expression of kallikrein 7 diminishes pancreatic cancer cell adhesion vitronectin and enhances urokinase-type plasminogen activator shedding. *Pancreas* 2008; 37: 399-404.
- Ramani VC, Kaushal GP, Haun RS. Proteolytic action of kallikrein-related peptidase 7 produces unique active matrix metalloprotease-9 lacking the C-terminal hemopexin domains. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1525-1531.
- Egelrud T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl* 2000; 208: 44-45.
- Ekholm E, Egelrud T. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 195-200.
- Jonson B, Horn T, Sander C, et al. Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in ichthyoses and squamoproliferative processes. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 358-362.
- Descargues P, Deraison C, Prost C, et al. Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1622-1632.
- Voegeli R, Doppler S, Joller P, et al. Increased mass levels of certain serine proteases in the stratum corneum in acute eczematous atopic skin. *Int J Cosmet Sci* 2011; 33: 560-565.
- Brattsand M, Stefansson K, Lundh Ch, et al. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 198-203.
- Martins WK, Esteves GH, Almeida OM, et al. Gene network analyses point to the importance of human tissue kallikreins in melanoma progression. *BMC Med Genomics* 2011; 4: 76.
- Mo L, Zhang J, Shi J, et al. Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion progression. *Anticancer Res* 2010; 30: 3413-3420.
- Shaw JLV, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 2007; 53: 1423-1432.
- Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, et al. Overexpression of the human kallikrein genes KLK4, 5, 6 and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 2006; 387: 807-811.
- Prezas P, Scorilas A, Yfanti Ch, et al. The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem* 2006; 387: 1607-1612.
- Talieri M, Mathioudaki K, Prezas P, et al. Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2009; 101: 741-747.
- Termini L, Maciag PC, Soares FA, et al. Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2010; 127: 485-490.
- Zhao H, Dong Y, Quan J, et al. Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011; 33: 566-572.
- Xuan Q, Yang X, Mo L, et al. Expression of the serine protease kallikrein 7 and its inhibitor antileukoprotease is decreased in prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1796-1801.
- Planque C, de Monte M, Guyétant S, et al. KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 1260-1266.
- Talieri M, Diamandis EP, Gourgiotis D, et al. Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost* 2004; 91: 180-186.
- Li X, Liu J, Wang Y, et al. Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Sci* 2009; 100: 601-607.
- Holzschneider L, Biermann JC, Kotsch 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: 1070-1079.
- Yousef GM, Magklara A, Chang A, et al. Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down regulated in different malignancies. *Cancer Res* 2001; 61: 3425-3431.
- Hooper JD, Bui LT, Rae FK, et al. Identification and characterisation of KLK14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle. *Genomics* 2001; 73: 117-122.
- Felber LM, Borgono CA, Cloutier SM, et al. Enzymatic profiling of human kallikrein 14 using phage-display substrate technology. *Biol Chem* 2005; 386: 291-298.
- Borgono CA, Michael IP, Shaw JLV, et al. Expression and functional characterisation of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem* 2007; 282: 2405-2422.
- Stefansson K, Brattsand M, Ny A, et al. Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biol Chem* 2006; 387: 761-768.
- Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, et al. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* 2007; 16: 513-519.
- Borgono CA, Grass L, Soosaipillai A, et al. Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 9032-9041.
- Zhang R, Shi H, Chen Z, et al. Effects of kallikrein-related peptidase 14 gene inhibition by small interfering RNA in ovarian carcinoma cells. *Mol Med Report* 2012; 5: 256-259.
- Hashem NN, Mara TW, Mohamed M, et al. Human kallikrein 14 (KLK14) expression in salivary gland tumors. *Int J Biol Markers* 2010; 25: n32-37.
- Gratio V, Loriot C, Virca GD, 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: 2625-2636.
- Chung H, Hamza M, Oikonomopoulou K, et al. Kallikrein-related peptidase signaling proteinase-activated receptors. *Biol Chem* 2012; 393: 2011-2031.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed., Springer, 2010.
- Talieri M, Devetzi M, Scorilas A, et al. Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants expression in breast cancer and their clinical impact. *Tumour Biol* 2012; 33: 1075-1084.
- 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: 402-408.
- Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimisation. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7252-7259.
- Talieri M, Devetzi M, Scorilas A, et al. Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 expression. *Anticancer Res* 2011; 31: 3093-3100.
- Inoue Y, Yokobori T, Yokoe T, et al. Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3037-3042.
- Talieri M, Li L, Zheng Y, et al. A multiparametric tissue kallikrein-related peptidase panel for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 1659-1665.
- Loktionov A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening. *Int J Cancer* 2007; 120: 2281-2289.