

Meme Kanserlerinde HtrA2 Gen İfadesinin Analizi

Analysis of HtrA2 Gene Expression in Breast Cancers

Feridun Akkafa¹, Ahmet Arslan², Serdar Öztuzcu², H. İlyas Özardalı³, Avni Gökalp⁴, Esmâ Özkara², Zehra Bozdağ⁵, Celalettin Camcı⁶, Alper Aytekin⁴

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Şanlıurfa

²Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Gaziantep

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD, Afyon

⁴Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, Gaziantep

⁵Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD, Gaziantep

⁶Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji BD, Gaziantep

Yazışma adresi: Feridun Akkafa, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir yerleşkesi, 63000, Şanlıurfa, Tel: (0414) 3183133 Fax: (0414) 3183192
e-mail: feridunakkafa@yandex.com

Geliş tarihi / Received: 14.01.2014

Kabul tarihi / Accepted: 26.02.2014

Bu çalışma; XIII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresinde (27-30 Ekim 2013) poster bildiri olarak sunulmuştur.

Özet

Amaç: Bu çalışmada meme kanserli hastaların tümörlü dokularında ve çevresindeki normal dokularında, High temprature requirement factor A2 (HtrA2) geninin hem mRNA hem de protein ifade seviyelerinin tespitini amaçladık.

Materyal ve metod: Cerrahi olarak 53 hastadan alınan dokularda mRNA ifade seviyelerinin tespiti qRT-PCR ile taze dokularda çalışıldı. Aynı hastalara ait parafine gömülü dokularda ise immünohistokimyasal yöntemle protein tespiti yapıldı. HtrA2 ifade seviyeleri ile hastaların klinik ve patolojik özellikleri arasındaki ilişkiler analiz edildi.

Bulgular: Tümörlü dokulardaki HtrA2 geni mRNA ifade seviyeleri, bitişik normal dokulardakiler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.074$). HtrA2 proteini, %90.6 hastanın (48/53) tümör dokusunda pozitif olarak tespit edilirken, %9.4 hastanın (5/53) tümör dokusunda ise tespit edilmedi. Tümörlü dokulardaki HtrA2 protein ifadesi, bitişik normal dokulardakiler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.007$).

Sonuç: Meme tümör dokularında, HtrA2'nin farklı ifade seviyelerinde tespit edilmesi ile apoptotik yolağı etkinleştirebileceği söz konusu olabilir. Bu nedenle meme kanserinde özellikle IAP'lerin ifade seviyelerinin de tespit edilmesinin önemli olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: HtrA2, qRT-PCR, immünohistokimya, meme kanseri, apoptozis.

Abstract

Background: The purposes of this study were to measure both the protein and mRNA expression levels of HtrA2 gene in human with breast cancer tissues and their adjacent normal breast tissues.

Methods: mRNA expression levels in tissues taken surgically from 53 patients detection of fresh tissues

were studied by qRT-PCR. The protein detection is done in paraffin-embedded tissues of the same patients through immunohistochemical method. The relationships between patients clinical, pathologic features and HtrA2 expression levels are analyzed.

Results: Expression levels of HtrA2 mRNA in tumor tissues was not significantly different statically compared with adjacent normal tissues ($p=0.074$). While HtrA2 protein level is to identified positively in tumor tissue of patients 90.6%(48/53), there is no detection of HtrA2 protein expression in tumor tissues of patients 9.4%(5/53). Expression of HtrA2 protein in tumor tissues was significantly different statically compared with adjacent normal tissues ($p=0.007$).

Conclusions: It is possible that apoptotic pathway may be activated by the different expression levels of HtrA2 in breast tumor tissues. Therefore, we concluded that it is particularly important to detect the expression levels of IAPs in breast cancer.

Key words: HtrA2, qRT-PCR, immunohistochemistry, breast cancer, apoptosis.

Giriş

Meme kanseri dünyanın birçok bölgesinde kadınlarda görülen en yaygın kanser olup tüm ülkelerde bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Kadınlar arasında kanserden ölüm nedenlerinin en başında yer almaktadır (1,2). Türkiye'de ise kadınlarda görülen kanserler arasında birinci sırada yer almaktadır (3).

Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadik olmakla birlikte yaklaşık %20'si kalıtsal nedenlidir (4). Meme kanseri ve diğer kötü huylu kanser dokularının gelişimi, hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar (4). Bu adımlardan biri de programlı hücre ölümlerinin (apoptozis) kaybolmasıdır. Duktal meme karsinomlarında apoptozis kaybı ile hastalığın ilerlemesi arasında yakın ilişkinin olması yanında ilave genetik hasarlarında katkısı olduğu bilinmektedir (4).

High temprature requirement factor A family (HtrA) protein ailesi, bir serin proteaz ailesi proteinlerdir (5,6). Bilinen HtrA ailesi proteinleri HtrA1 (7), HtrA2 (8), HtrA3 (9) ve HtrA4 (NCBI giriş numarası: NM_001081187)'dür.

HtrA2 İnsanlarda normal doku ve hücre tiplerinde

yaygın olarak ifadelenir ve Omi olarak da adlandırılır. HtrA2 proteini, memeli hücrelerinde ilk olarak sıcaklık şoku ve tunicamycin ile uyarılmış strese cevapta ifade seviyesi artmış olan, stres etkinleştirici bir proteaz olarak tespit edildi. HtrA2 nukleusta kodlanan bir protein olup büyük oranda mitokondri zarlar arası alanda bulunur (8). Apoptozis sırasında mitokondriden sitozole salınır (10). Ayrıca endoplazmik retikulum ve nukleusta da bulunur (10). Ancak nukleustaki tespiti ve işlevi henüz belirlenmemiştir (8).

HtrA2 proteini apoptozis ve bir çok nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde etkili olan bir proteindir (10,11). Mitokondri içerisinde iken koruyucu şaperon işlevi gösterir ve sitozole salınır salınmaz proapoptotik bir molekül olur (12).

Apoptozis kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız şekilde gerçekleşen biyolojik bir olaydır (13). Serin proteaz olan HtrA2 proteini, apoptotik uyarıdan sonra mitokondriden sitozole salınarak apoptozisi, proteaz aktivitesi ile kaspaz bağımsız tarzda uyarır. Ayrıca apoptozisi engelleyici proteinlere (inhibitor of apoptosis protein =IAP) bağlanarak onları parçalayıp, kaspaz baskılayıcı aktivitesini ortadan kaldırarak uyarır. Bu işlevinden dolayı da hücre ölümünü teşvik eder (10). Bu nedenle, kanser

dokularında apoptosisin bir düzenleyicisi olan HtrA2 ifade seviyelerinin analizi, kanser gelişimini anlamamız için gereklidir. Bu çalışma ile meme kanserli dokularda HtrA2 mRNA ve protein ifade seviyeleri tespit edilerek, meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesine olası katkılarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma için, Gaziantep Üniversitesi 16.12.2010 tarih ve 12/2010-07 sayılı etik kurul kararı alınmıştır.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında ameliyat sonrası hastalardan (n=53) alınan kanserli ve sağlıklı dokular sıvı azot tankına alındı. Daha sonra -80 °C de saklandı. Moleküler çalışmalar Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik laboratuvarında ve aynı hastalara ait arşiv dokularından immunohistokimyasal yöntemle protein tespiti, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

RNA eldesi; Normal ve tümörlü dokular 25 mg'lık parçalara ayrılarak homojenizatör (Kinematica, Gmdh, Switzerland) ile homojenize edildi. QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 52304) aracılığıyla üretici firmanın önerdiği yöntem ile RNA'lar elde edildi ve -80 °C 'de saklandı.

cDNA sentezi; Qiagen miScript Reverse Transcription Kit kullanıldı. cDNA sentezi; 37°C'de 60 dak, 95 °C'de 5 dk olacak şekilde PCR cihazı AB Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler ayarlanarak gerçekleştirildi.

qRT – PCR; Real Time PCR HtrA2 ifadesinin tespiti (Cat.No: QT00205149) Hs-HTRA2-1-SG 1 -sense ve antisense primerleri ile çalışıldı. Housekeeping gen olarak β-aktin (ACTB RefSeq Accession no: NM_001101.3) kullanıldı. Beta aktin ile birlikte, HtrA2 için hazırlanan her bir mix,

her hasta için 24 µl (12.5 µl, 2X RT Real-Time SYBR Green PCR Master Mix, 2.5 µl, 10x QuantiTect Primer Assay, 9 µl Rnase- free water) 0.1 lik tüplere dağıtıldı. Üzerine 1 µl 50 ng' a seyreltilmiş cDNA ilave edildi. Qiagen Rotor-Gene QReal-time cihazı kullanılarak PCR yapıldı. 50 °C'de 2 dak, 95 °C'de 15 dak, 40 siklus; 15 sn 94 °C, 30 sn 55 °C, 30 sn 72 °C PCR şartlarına tabi tutuldu.

İmmünohistokimyasal analiz; Parafin bloklardan 4µ kalınlığında kesit alınarak hazırlanan slaytlara deparafinizasyon işlemi uygulandı. 10 mmol/L citrate buffer (pH:6) ile muameleden sonra %5'lik hidrojen peroksit ile 5 dk muamele edildi. 5 dk PBS ile yıkandı. 5 dk protein blok (Super block, Syctek lab, USA. Lot:23871, ref:AAA125) ile muamele edildi. Slaytlar mouse monoclonal antibody HtrA2 (4H216): sc-71285 Santa Cruse Biotechnology, USA) ile 3 saat oda sıcaklığında nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Standard streptavidin–biotin–immunoperoxidase metod ile (Dako Universal kit; Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) sekonder antikor DAKO (K0690) LSAB (labeled streptavidin-biotin) System (Biotinylated link Universal) ile 40 dk inkübe edildi. DAKO (K0690) LSAB System-HRP (Streptavidin HRP) ile 40 dk inkübe edildi. Her aşama sonunda slaytlar 5 dk PBS ile yıkandı. DAKO (K3468) DAB (3,3'-diaminobenzidine) chromogen ile 20 dk muamele edildikten sonra, distile su ve alkol aşamalarından geçirilerek ışık mikroskopunda incelendi. Alınan kesitin tamamı taranarak, normal ve tümörlü doku hücrelerinin %30'u ve fazlasında sitoplazmik boyanmanın görüldüğü örnekler immünopozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analiz için SPSS 16.0 Windows uyumlu program kullanılarak, nonparametrik Kruskal Wallis testi, Mann-Whitney-U testi, Chi-square (X^2) testi uygulandı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

Meme kanserli hastalarda (n=53) HtrA2 geninin mRNA seviyeleri (Δ ct değerleri) normalizasyonu tümörlü doku/ β -aktin, normal doku/ β -aktin oranı ile yapıldı. Meme kanserli hastaların tümörlü dokularındaki mRNA ifade seviyesinin, bitişik normal dokulardaki mRNA ifade seviyesi ile karşılaştırıldığında, istatistiksel bir anlamlılık görülmedi ($p=0.074$) (Tablo 1.). Menopoz öncesi hastalarda ki mRNA ifade seviyesinin, menopoz sonrası hastalara göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü ($p=0.043$). Hastaların diğer klinik ve patolojik özellikleri ile mRNA ifade seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 2).

HtrA2 proteini, %90.6 hastanın (48/53) tümör dokusunda pozitif olarak tespit edilirken, %9.4 hastanın (5/53) tümör dokusunda ise tespit edilmedi (Resim 1). HtrA2 proteininin tümörlü dokulardaki ifadesinin, normal meme dokulardaki protein ifadesi ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi ($p=0,007$) (Tablo 1.). Hasta tümörlerinin histolojik derecesi ile protein ifadesi arasında anlamlılık tespit edildi. Yaş, tümör evresi, menopoz durumları, lenf nodu metastazı ile tümörlü dokularındaki protein ifadesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. (Tablo 2.). Ayrıca ER, PR, ve HER-2 durumları ile tümörlü dokulardaki protein ifadesi arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Tartışma

Meme kanseri en erken teşhis edilebilen kanser tipi olmakla birlikte, genelde etiyolojisi bilinmez. Meme kanserleri cinsiyete özgün özellik gösteren bir hastalık olup, genellikle kadınlarda görülür ve kadın yaşı ile ilgili olup 50 yaş civarında görülür (14). Çalışmamızda 53 meme kanserli hastanın yaş dağılımı incelendiğinde en küçüğünün 24, en büyüğünün ise 78 yaşında olduğu ve ortalama yaşın da 50.3 yaş olduğu tespit edilmiştir.

Östrojenle muamele edilerek akut oksidatif stres oluşturulan erkek Suriye hamster böbrek dokularında, östrojen muamelesi ile HtrA2 ifadesinde ilk beş saat içerisinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak 6 ay gibi uzun süreli östrojen muamelesinin üçüncü ayından itibaren HtrA2 ifade seviyesinde anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür (15).

İlerlemiş mide kanserli hastaların, yüzey mukoza hücreleri ve normal mide mukoza hücrelerindeki mukoza nick hücrelerinde HtrA2 ifadesi olmadığı veya çok zayıf olduğu görülmüştür. HtrA2 ifade seviyesinin mide kanserinin gelişmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (16).

Ovaryum kanserlerinde ise HtrA2 mRNA seviyesi ve protein seviyelerinin, normal dokularla karşılaştırıldıklarında az bir miktarda azaldığı görülmüştür. Ovaryum tümörlerinden borderline tümörlerde HtrA2 mRNA seviyesinin, normal over dokularıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüş ve bu durumun malignite gelişimine katkısı olabileceği ileri sürülmüştür (17). HtrA2 ifade seviyesinin düşmesinin apoptotik sinyallerin engellenmesine yol açabileceği ve kanser gelişimi ve ilerleyişine katkı sağlama adına hücre çoğalmasını arttırabileceği ileri sürülmüştür (17).

Endometrium kanserlerinin HtrA2 mRNA ve protein ifade seviyesinde, normal endometrium dokularıyla karşılaştırıldıklarında azalma olduğu görülmüştür. Menopoz durumları, tümörün derecesi, histolojik tipleri ve klinik evrelerindeki mRNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmamıştır (18).

Prostat kanserli hastalarda HtrA2'nin mRNA ve protein ifade seviyelerinin, normal prostat dokularıyla karşılaştırıldığında, tümörlü dokularda arttığı görülmüştür. Bu çalışmada iyi huylu prostatik hiperplazili ve normal prostat doku örneklerinde ise immünopozitiflik görülmemiş veya çok çok zayıf görülmüştür. Bu durumda apoptosis yolğunun neden

işlemediği anlaşılmamıştır(19).

Mide kanserli hastaların tümörlü dokularındaki HtrA2 protein ifade seviyesinin, normal dokulardakine göre anlamlı bir şekilde fazla olduğu bulunmuş ve bu durum tümör farklılaşması, lenf nodu metastazı ve tümör evresi ile ilişkilendirilmiştir (20).

Çalışmamızda meme kanserli hastaların tümörlü dokuları ile tümör çevresindeki normal dokuları arasındaki HtrA2 mRNA ifade seviyesinde istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilmemiştir. Ancak tümörlü dokularındaki HtrA2 protein seviyesinin anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. HtrA2 proteini, hastaların %90.6'sının (48/53) tümör dokusunda pozitif olarak tespit edilirken, %9.4'ünün (5/53) tümör dokusunda ise tespit edilememiştir (Tablo 1.).

HtrA2 mRNA ifade seviyesinin meme kanserli hastaların % 98'nin tümörlü dokusunda normal ve yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. Tümörlü dokulardaki protein ifade seviyesinin ise normal dokularla karşılaştırıldığında, hastaların % 74'ünde değişmemiş veya bir miktar artmış olduğu gözlenmiştir.

Çeşitli çalışmalarda HtrA2'nin IAP proteinlerini bağladığı ve apoptozisi teşvik ettiği gösterilmiştir (10,21). Çeşitli kanserlerde IAP'nin aşırı ifadesi tespit edilmiş olup kötü prognozla ilişkilendirilmiştir(22).

Bu durumda HtrA2'nin IAP'leri serin proteaz etkisi ile bağlayarak parçaladıkları göz önüne alındığında, HtrA2'nin tümörlü dokularda tespit edilmiş olan bu miktarları ile apoptotik yolağı etkinleştirebileceği de söz konusu olabilir. Dolayısıyla meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde apoptotik yolağın işlevsizliğinin bu açıdan söz konusu olamayacağı fikri ileri sürülebilir.

Ayrıca HtrA2 geninin normal ve meme kanserli dokulardaki mRNA ve protein ifadesinin

çalışmamızda bu şekilde tespit edilmiş olması ile genin mRNA'sının posttranskripsiyonel ve/veya posttranslasyonel farklılıklarından kaynaklanabileceği hipotezini de ayrıca desteklemektedir(18).

Menopoz öncesi hastaların tümörlü dokularındaki HtrA2 mRNA ifade seviyesi, menopoz sonrası hastalardakine göre yüksek olarak tespit edilmiştir. Hastaların diğer klinik özellikleri ile mRNA ifade seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Protein ifade seviyesinin; tümörün histolojik derecesinin artması ile arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu durumun, histolojik derecelemedeki hasta sayılarının uyumsuzluğu ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Sonuç olarak; apoptotik yolağın işlevsizliğinde, HtrA2 serin proteaz seviyesinden başka etkenlerinde olabileceği düşünülerek bu konuda daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Meme kanserlerinde apoptotik mekanizmaların etkinliğinin tam olarak anlaşılabilmesi için, özellikle IAP'lerin ifade seviyelerinin tespit edilmesinin önemli olacağını düşünerek, bu konuda çalışmaları başlatmış bulunmaktayız. Ayrıca HtrA2'nin nukleustaki protein seviyesinin, öncelikle meme kanserinde olmak üzere tüm kanser tiplerinde, immünoelektron mikroskopu ile tespit edilmesi gerekir. Çeşitli kanserlerde HtrA2 geninin özendirici (promoter) bölgesi dahil, bütün genin taranarak mutasyon tespitine yönelik çalışmaların da yapılması yararlı olabilir.

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Yönetim Birimi tarafından TF12.1 nolu proje ile desteklenmiş olup, teşekkür ederiz. Ayrıca Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi; Tıbbi Patoloji AD. Öğretim Üyelerine, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Uz Dr Ozan Balakan'a teşekkür ederiz.

Tablo 1. Meme kanserli hastaların HtrA2 mRNA ve Protein ifade seviyeleri (n=53)

	mRNA	p	HtrA2				Chi-square (X ²) p
			-	+	++	+++	
Tümörlü meme doku	1.27±0.36	0.074	5	7	33	8	0.007
Tümör çevresi normal doku	1.19±0.39		7	37	8	1	

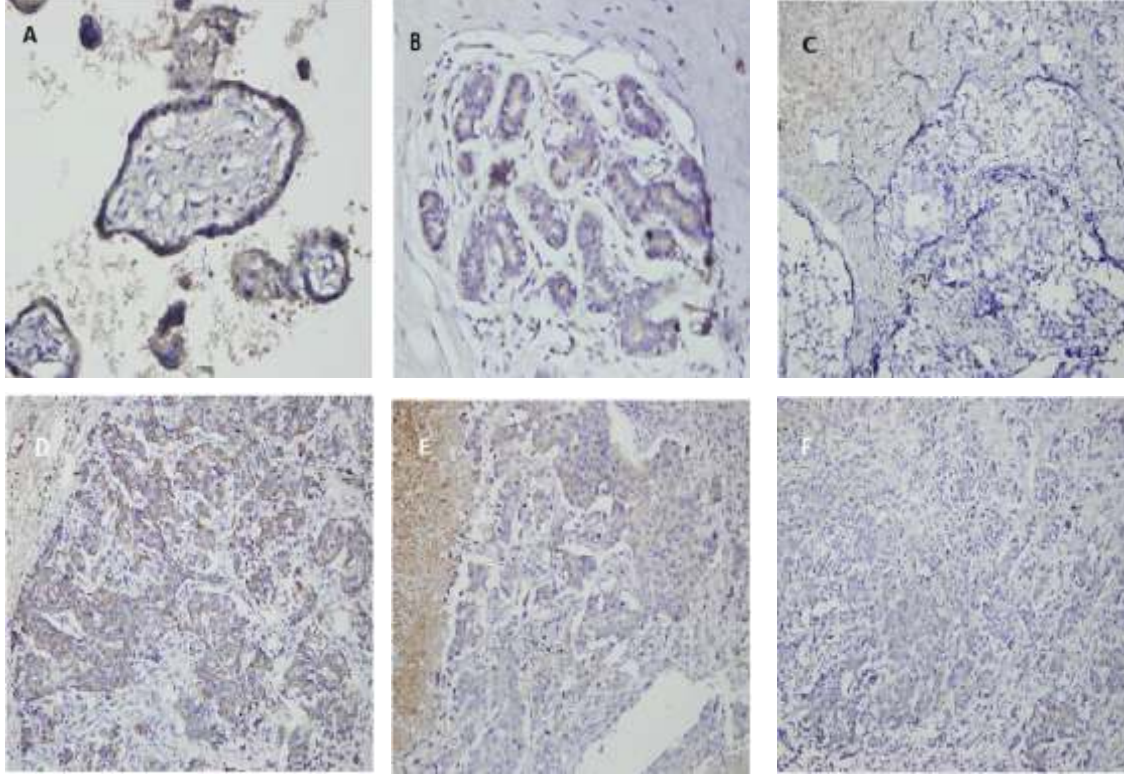
Boyanma yoğunluğu; - ; (negatif), +; (zayıf pozitif), ++; (orta derece pozitif) ve +++; (kuvvetli pozitif).

Tablo2. Meme kanserli dokularda HtrA2 mRNA ve protein ifade seviyeleri ve hastaların klinik-patolojik özellikleri ile ilişkileri (n=53)

Klinik-patolojik özellikler	n	mRNA ifade seviyesi	p	HtrA2 boyanma yoğunluğu				(X ²) p
				-	+	++	+++	
Yaş								
<50	28	1.37±0.61	0.144	1	5	18	4	0.362
>50	25	1.24±0.27		4	2	15	4	
Histolojik grade								
I	5	1.12±0.61	0.722	2	2	1	0	0.004
II	26	1.04±0.27		3	3	19	1	
III	22	1.13±0.37		0	2	13	7	
Tümör evresi								
I-II	39	1.30±0.39	0.333	4	5	24	6	0.986
III-IV	14	1.23±0.41		1	2	9	2	
Menopoz durumu								
Premenopoz	28	1.16±0.30	0.043	1	4	19	4	0.468
Postmenopoz	25	1.00±0.35		4	3	14	4	
Lenf nodu metastazi								
Negatif	18	1.30±0.41	0.639	3	2	10	3	0.605
Pozitif	35	1.23±0.33		2	5	23	5	

Boyanma yoğunluğu; - ; (negatif), +; (zayıf pozitif), ++; (orta derece pozitif) ve +++; (kuvvetli pozitif).

Resim1. HtrA2'nin immünohistokimyasal yöntemle tespiti. A. Pozitif kontrol: İnsan plasenta dokusu trofoblastik hücreler (IHK, DAB, X200) B. Normal meme dokusu glandüler hücreler (IHK, DAB, X400) C. Negatif kontrol: Meme tümör dokusunda: D; kuvvetli pozitif, E; orta derece pozitif, F; zayıf pozitif, boyanma (IHK, DAB, X200).



Yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular (Conflict of interest statement) : Yok (None)

Kaynaklar

1) Kesteloot ECH, Zhang J. Differences in breast cancer mortality worldwide: unsolved problems. *European Journal of Cancer Prevention* 2006; 15(5): 416-423.
 2) www.worldwideweb.com. (Erişim tarihi:28.02.2012)
 3)Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Organlara, cinsiyete ve yaşa göre kanser sıklığının dağılımı ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser, *Kanserle Savaş Daire Başkanlığı* 2006; <http://www.saglik.gov.tr/TR> (Erişim tarihi: 01.03.2012)
 4) Consen SD, Grushko TA, Olopade OI. Cancer of the Breast. In: *Cancer Principles and Practice of oncology*. Devita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (Eds). 8 th Ed. 2008; p.1595-1605.
 5) Lipinska B, Sharma S, Georgopoulos C. Sequence analysis and regulation of the HtrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(21):10053-10067.
 6) Strauch KL, Beckwith J. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(5):1576-1580.
 7) Zumbunn J, Trueb B. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett*. 1996;398(2-3):187-192.
 8) Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, Clinkenbeard H, Hanning C, Amegadzie B, Davis JB, Dingwall C, Livi GP, Creasy CL. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress

response. *Eur J Biochem* 2000; 267(18):5699-5710.
 9) Nie GY, Hampton A, LI Y, Findlay JK, Salamonsen LA. Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem. J* 2003; 371(1): 39-48.
 10) Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 2001;8(3): 613-621
 11) Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Teismann P, Abuin A, Grau E, Geppert M, Livi GP, Creasy CL, Martin A, Hargreaves I, Heales SJ, Okada H, Brandner S, Schulz JB, Mak T, Downward J. Neuroprotective role of the reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 2004;24(22):9848-9862.
 12) Su D, Su Z, Wang J, Yang S, Ma J. UCF-101, a novel Omi/HtrA2 inhibitor, protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Anat Rec (Hoboken)* 2009;292: 854-861.
 13) Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandennebe P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16): 2861-2874.
 14) Cole P, Rodu B. Descriptive Epidemiology: Cancer statistics, In: *Cancer Principles Practice of Oncology*, Eds: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. 6 th ed. p.228-234.
 15) Zurawa JD, Kobiela J, Stefaniak T, Wozniak A, Narkiewicz J, Wozniak M, Limon J, Lipinska B. Changes in expression of serine proteases HtrA1 and HtrA2

during estrogen-induced oxidative stress and nephrocarcinogenesis in male Syrian hamster. *Acta Biochimica Polonica*. 2008;55(1):9-19.
 16) Lee SH, Lee JW, Kim HS, Kim SY, Park WS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer. *APMIS* 2003; 111(5): 586-590.
 17) Narkiewicz J, Klasa MD, Zurawa JD, Skorko GJ, Emerich J, Lipinska B. Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clinical Biochemistry* 2008;41(7-8) 561-569.
 18) Narkiewicz J, Lipinska-Szumczyk S, Zurawa JD, Skorko GJ, Emerich J, Lipinska B. Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-β1 genes in primary endometrial cancer. *Oncology Reports* 2009; 21(6): 1529-1537.
 19) Hu XY, Xu YM, Chen XC, Ping H, Chen ZH, Zeng FQ. Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *APMIS* 2006;114(12): 893-898.
 20) Chen HL, Chen CQ, Ma JP et al. Association of Omi/HtrA2 expression and prognosis in patients with gastric carcinoma. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2010 Oct;13(10):766-9.
 21) Bhuiyan S, Fukunaga K. Activation of HtrA2, a Mitochondrial Serine Protease Mediates Apoptosis: Current Knowledge on HtrA2 Mediated Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Cardiovasc Ther* 2008; 26(3): 224-232.
 22) Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; 64(20):7183-7190.