



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«Επιδράσεις της φαρμακολογικής διατάραξης του
πρωτεύοντος κροσσού σε πρωτογενή κύτταρα κακοήθους
μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα σε φαινοτύπους 2 και 3
διαστάσεων»***

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΖΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΖΩΤΗΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



Στεργιοπούλου Ελπινίκη του Ιωάννη

ΛΑΡΙΣΑ, 2023

UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR'S THESIS

***“Effects of pharmacological primary cilium perturbation in
primary malignant pleura mesothelioma cells in 2D and
3D related phenotypes”***

SUPERVISING PROFESSOR: ZAROGIANNIS SOTIRIOS, ASSOCIATE PROFESSOR OF PHYSIOLOGY

CO-SUPERVISING PROFESSOR: BALATSOS NIKOLAOS, ASSISTANT PROFESSOR OF BIOCHEMISTRY

Stergiopoulou Elpiniki

LARISA, 2023

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Σωτήριος Ζαρογιάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(επιβλέπων)

Νικόλαος Μπαλατσός

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (συνεπιβλέπων)

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Εργαστήριο της Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μέρος των πειραμάτων που έχουν διεξαχθεί κατά την ερευνητική εργασία που υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «1^η Προκήρυξη Ερευνητικών Έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ & Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας» (Αριθμός Έργου 3221).



Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο ο οποίος με εμπιστεύτηκε για να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του. Με έκανε μέλος της ερευνητικής του ομάδας, με στήριξε σε όλη τη διάρκεια ακόμα και όταν οι συνθήκες δεν ήταν ευνοϊκές, με καθοδήγησε, μου έδωσε πολύτιμες συμβουλές και με βοήθησε να κάνω τα πρώτα μου βήματα στο χώρο της έρευνας. Παράλληλα, ευχαριστώ πολύ και τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο και τον κύριο Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο οι οποίοι δέχτηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, μου προσέφεραν σημαντική βοήθεια και διέθεσαν χρόνο για την πτυχιακή μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τα θερμά μου ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Rajesh Jagirdar, χωρίς τον οποίο δε θα είχα αυτή την εργασία σήμερα, ο οποίος πίστεψε σε μένα, με στήριξε, μου μεταλαμπάδευσε πολύτιμες γνώσεις, και μου χάρισε πολύ από τον χρόνο του προκειμένου να με βοηθήσει. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Πιταράκη Ελεάννα και τον υποψήφιο διδάκτορα Λευτέρη Παπάζογλου για τον χρόνο τους, τις γνώσεις που μου προσέφεραν, την πολύτιμη βοήθεια τους και τις σημαντικές συμβουλές που μου έδωσαν τα οποία με βοήθησαν σε όλη την πορεία μου. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όμως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου καθώς με έκαναν μέλος της ομάδας τους με το άψογο κλίμα που πάντα επικρατεί και την άψογη συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους μου που ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζαν καθ' όλη τη διάρκεια και με βοήθησαν να καταφέρω όσα ήθελα μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Πρωτεύοντας Κροσσός είναι ένα μη κινητό μονήρες οργανίδιο του κυττάρου που μοιάζει με κεραία το οποίο προεξέχει από την κυτταρική μεμβράνη. Εντοπίζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων λαμβάνοντας σήματα από το περιβάλλον. Μέσω αυτών των σημάτων συμβάλει τελικά και στην ανάπτυξη των κυττάρων. Παρόλο που έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του πρωτεύοντα κροσσού στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων δεν είναι πλήρως γνωστός ο ρόλος του σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ασθενείς με μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα οι οποίοι εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση του γονιδίου BBS1 του συμπλόκου BBSome του Πρωτεύοντος Κροσσού είχαν αυξημένη επιβίωση. Εξετάσαμε την επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του πρωτεύοντος κροσσού χρησιμοποιώντας θειϊκό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και της επιμήκυνσης του πρωτεύοντος κροσσού με τη χρήση χλωριούχου λιθίου (LC) στη κυτταρική βιωσιμότητα, την κυτταρική μετανάστευση, την κυτταρική προσκόλληση σε φαινοτύπους 2D και στον σχηματισμό σφαιροειδών, στη διήθηση σφαιροειδών και στη συστολή γέλης κολλαγόνου σε φαινοτύπους 3D. Η διερεύνηση έγινε σε πρωτογενή κύτταρα κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα (pMPM). Διαπιστώθηκε πως η φαρμακολογική εξασθένηση ή επιμήκυνση του πρωτεύοντος κροσσού επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, την ικανότητα προσκόλλησης τους, την κυτταρική μετανάστευση, τον σχηματισμό σφαιροειδών, τη διήθηση σφαιροειδών και την συστολή γέλης κολλαγόνου στα κύτταρα pMPM σε σύγκριση με κύτταρα Control που δεν έλαβαν αντίστοιχη αγωγή. Τελικά, ο πρωτεύοντας κροσσός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο σε καλοήγη όσο και σε κακοήγη μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα.

ABSTRACT:

The Primary Cilium is a non-motile single antenna-like organelle of the cell that protrudes from the cell membrane. It is found in almost all mammalian cells. It plays an important role in cell proliferation, apoptosis and communication among cells by receiving signals from the environment contributing to cell growth. Although, the existence of primary cilium on the surface of mesothelial cells has been confirmed, its role is not completely known in normal or pathological conditions. Recent studies showed that patients with malignant pleural mesothelioma with higher expression of the BBS1 gene of the BBSome complex of the Primary Cilium had increased survival. Here we examined the effect of pharmacological deciliation of the Primary Cilium using ammonium sulfate (AS) or chloral hydrate (CH) or its elongation using lithium chloride (LC) on cell viability, cell migration, cell adhesion in phenotypes 2D and in spheroid formation, spheroid invasion and collagen gel formation in 3D phenotypes. The study was conducted on primary malignant pleura mesothelioma cells (pMPM). We found that pharmacological deciliation or elongation of the Primary Cilium affects cell viability, cell adhesion, cell migration, spheroid formation, spheroid invasion, and collagen gel contraction in pMPM cells compared to control cells without treatment. Finally, we found that the Primary Cilium plays an important role in both benign and malignant pleural mesothelial cells.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πρωτεύοντας κροσσός.....	12
1.2. Φυσιολογία του πρωτεύοντα κροσσού.....	16
1.2.1 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στον κυτταρικό κύκλο.....	16
1.2.2 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στην κυτταρική σηματοδότηση.....	18
1.2.3 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	22
1.2.4 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στην κυτταρική μετανάστευση.....	22
1.2.5 BBSome.....	23
1.2.6 Αυτοφαγία.....	24
2. Καρκινογένεση.....	25
3. Μεσοθηλιακά κύτταρα.....	25
3.1 Δομή και εντοπισμός.....	26
3.2 Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων.....	29
3.3 Μεσοθηλιακά κύτταρα και πρωτεύοντας κροσσός.....	30
4. Μεσοθηλίωμα.....	31
4.1 Παράγοντες που το προκαλούν	31
4.2 Βιολογική επιρροή του αμιάντου.....	33
4.3 Μεσοθηλίωμα και πρωτεύοντας κροσσός.....	33
4.4 Θεραπεία.....	34
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5. Σκοπός πτυχιακής εργασίας.....	35
6. Υλικά και μέθοδοι	35

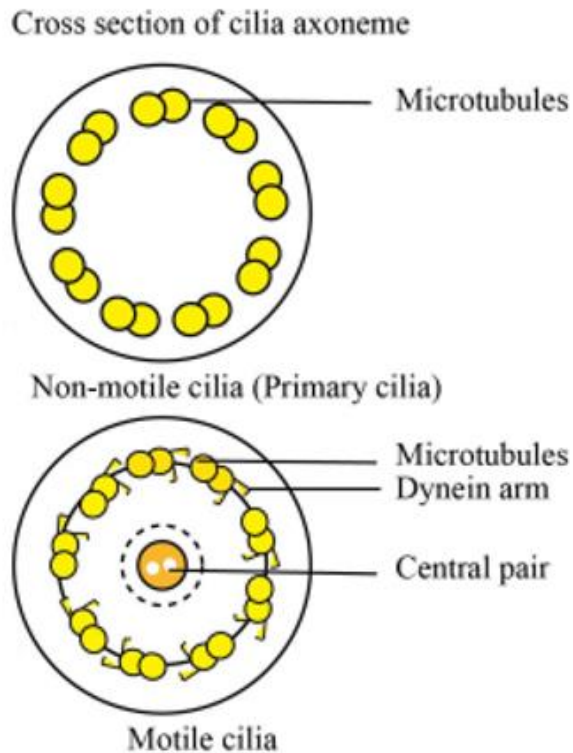
6.1 Κυτταροκαλλιέργεια.....	35
6.2 Επώαση των κυττάρων με φάρμακα.....	36
6.3 Δοκιμή βιωσιμότητας κυττάρου.....	36
6.4 Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης.....	36
6.5 Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης.....	37
6.6 Δοκιμή σχηματισμού σφαιροειδών όγκων σε 3D καλλιέργειες.....	38
6.7 Δοκιμή εισβολής σφαιροειδούς όγκου σε 3D καλλιέργειες.....	38
6.8 Δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου.....	38
6.9 Στατιστική ανάλυση.....	39
7.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
7.1 Η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε σημαντικά μετά την χορήγηση όλων των φαρμάκων.....	39
7.2 Η κυτταρική προσκόλληση μειώθηκε σημαντικά στα pMPM κύτταρα.....	40
7.3 Η κυτταρική μετανάστευση μειώθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση όλων των φαρμάκων	42
7.4 Ο σχηματισμός σφαιροειδών μειώθηκε σημαντικά με χορήγηση φαρμάκων που παρεμποδίζουν τον πρωτεύοντα κροσσό.....	43
7.5 Η δοκιμασία εισβολής των κυτταρικών όγκων μειώθηκε σημαντικά στα κύτταρα pMPM από τα φάρμακα που τροποποιούν των πρωτεύοντα κροσσό.....	44
7.6 Η δημιουργία γέλης κολλαγόνου μειώθηκε σημαντικά στα κύτταρα pMPM με τη χρήση των φαρμάκων AS, CH και LC.....	45
8.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

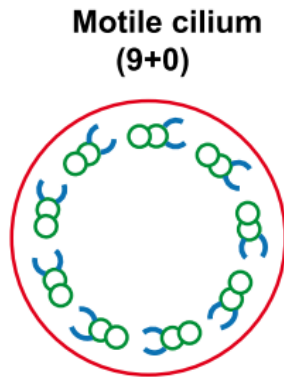
1.1 Πρωτεύοντας κροσσός

Ο πρωτεύοντας ή πρωτοπαθής κροσσός είναι ένα μη κινητό μονήρες οργανίδιο του κυττάρου με μήκος 3-10μm και πάχος 0.2-0.3μm το οποίο προεξέχει από την κυτταρική μεμβράνη. Παρόλο που για πολλά χρόνια οι επιστήμονες θεωρούσαν πως αποτελεί δομικό κατάλοιπο, σήμερα γνωρίζουμε πως λειτουργεί σαν κυτταρική κεραία και παίζει βασικό ρόλο ως μηχανοευαίσθητος, φωτοευαίσθητος, χημειοευαίσθητος και βιοχημικός αισθητήρας. Το οργανίδιο αυτό ανήκει στις βλεφαρίδες, μεμβρανικές προεκτάσεις της κυτταρικής επιφάνειας, η βασική δομή των οποίων είναι το αξόνημα, που αποτελείται από μικροσωληνίσκους και τις συνδεόμενες σε αυτούς πρωτεΐνες. Οι βλεφαρίδες χωρίζονται σε κινητές και μη. Οι κινητές εμφανίζουν μια χαρακτηριστική διάταξη η οποία αποτελείται από 9 ζεύγη μικροσωληνίσκων περιφερειακά και 2 μικροσωληνίσκους στο κέντρο, οι οποίοι ενώνονται με τους περιφερειακούς μέσω των αξονημικών ακτίνων. Το μοτίβο αυτό ονομάζεται «9+2». Παράλληλα, οι κεντρικοί μικροσωληνίσκοι είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους μέσω της πρωτεΐνης νεξίνης, ενώ στον έναν από τους δυο είναι προσδεδεμένοι δύο βραχίονες δυνεΐνης, οι οποίοι προσδίδουν στις βλεφαρίδες την παλμική τους κίνηση. Οι μη κινητές, στις οποίες ανήκει και ο πρωτεύοντας κροσσός αποτελούνται από 9 ζεύγη μικροσωληνίσκων και το μοτίβο αυτό ονομάζεται «9+0» λόγω απουσίας του κεντρικού ζεύγους μικροσωληνίσκων. (1)



Εικόνα 1. Δομή κινητών και μη βλεφαρίδων (2)

Ωστόσο, εξαίρεση από τα παραπάνω μοτίβα αποτελεί το μοτίβο «9+0» με κίνηση, το οποίο εμφανίζεται μόνο κατά την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου. Οι βλεφαρίδες του συγκεκριμένου μοτίβου περιστρέφονται προκειμένου να προωθήσουν την κατεύθυνση του ρευστού μόνο προς τα αριστερά, μια διαδικασία απαραίτητη για να δημιουργηθεί η ασύμμετρία ανάμεσα στην αριστερή και την δεξιά πλευρά του σώματος που οδηγεί στην ασύμμετρη δομή και τις ασύμμετρες θέσεις των εσωτερικών οργάνων στα σπονδυλωτά κατά την εμβρυογένεση. Η δομή αυτή ονομάζεται nodal cilium και περιλαμβάνει βραχίονες δυνεΐνης στους οποίους οφείλεται η κίνηση.(3)



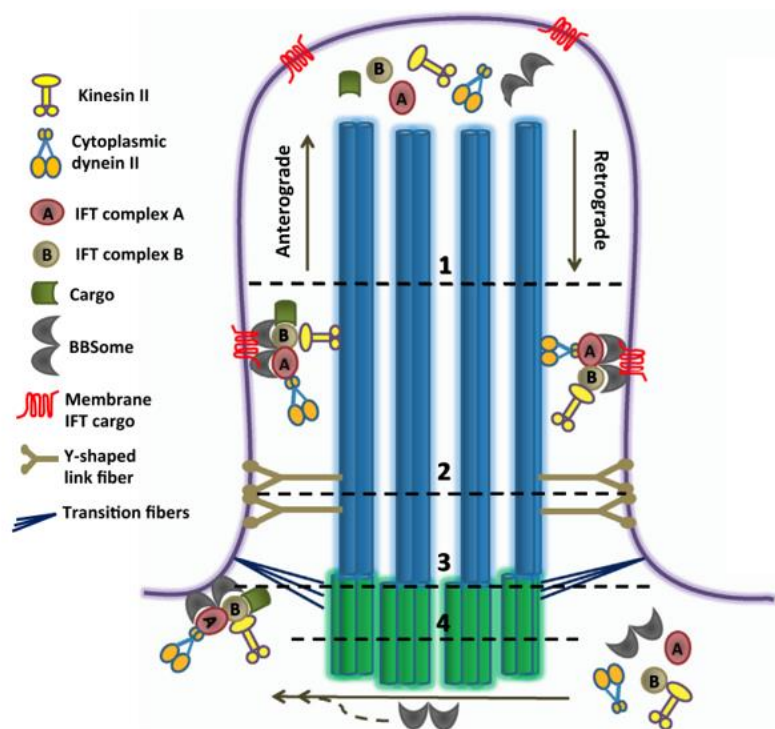
Εικόνα 2. Δομή κινητού κροσσού «9+0» (3)

Κατά τον διαχωρισμό των κυττάρων, το μητρικό κεντριόλιο μετατρέπεται σε βασικό σωματίο για να εκκινήσει τον σχηματισμό των κροσσών. Το βασικό σωματίο είναι ένα κεντριόλιο που βρίσκεται αγκυροβολημένο στην πλασματική μεμβράνη, και αποτελείται από 9 τριπλέτες μικροσωληνίσκων. Το μητρικό κεντριόλιο διαθέτει τα άπω προσαρτήματα (distal appendages) τα οποία είναι απαραίτητα προκειμένου να αγκυροβολήσουν το μητρικό κεντριόλιο στην πλασματική μεμβράνη και να μετατραπούν στις μεταβατικές ίνες (transition fibers) του βασικού σωματίου. Αυτές οι διαδικασίες αποσκοπούν στο να δημιουργηθεί τελικά το αξόνημα (axoneme), που είναι η βασική δομή του Πρωτεύοντος Κροσσού, η οποία προέρχεται από το βασικό σωματίο.

Οι μεταβατικές ίνες είναι απαραίτητες για την στρατολόγηση των δομικών στοιχείων της ενδομαστιγικής μεταφοράς (IFT), ένα αμφίδρομο σύστημα μεταφοράς κατά μήκος των μικροσωληνίσκων που εδράζεται ανάμεσα στην άκρη και τη βάση του κροσσού. Η IFT συνθέτει και διατηρεί το αξόνημα επιτρέποντας τη μεταφορά τουμπουλίνης, κινασών, καναλιών ιόντων και μεμβρανικών πρωτεϊνών με τη βοήθεια δυο πρωτεϊνών-μεταφορέων. Οι πρωτεΐνες-μεταφορείς είναι η κινεσίνη II, η οποία πραγματοποιεί τη μεταφορά από τη βάση στο άκρο του κροσσού, ενώ η κυτταροπλασματική δυνεΐνη II

μεταφέρει το φορτίο από το άκρο στη βάση. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες-μεταφορείς συνδέονται με τα φορτία τους μέσω κάποιων πρωτεϊνών προσαρμογής (adaptors) , των IFT σωματιδίων (particles), οι οποίοι αποτελούνται από δυο σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τον IFT A και τον IFT B και περιλαμβάνουν 22 πρωτεΐνες. (4)

Επιπλέον, ένα άλλο σύμπλοκο πρωτεϊνών, το BBSome, είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά πρωτεϊνών στους κροσσούς του οποίου η λειτουργία θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω. Παράλληλα, η περιοχή που βρίσκεται πάνω από το βασικό σωματίδιο σχηματίζει τη μεταβατική ζώνη, η οποία αναγνωρίζεται από την παρουσία των ινών σύνδεσης σχήματος Y. Οι ίνες σύνδεσης σχήματος Y συνδέουν τους μικροσωληνίσκους με τη μεμβράνη του κροσσού. Το μονό άκρο του Y προσδένεται στους μικροσωληνίσκους, ενώ το διπλό άκρο του Y είναι συνδεδεμένο στην μεμβράνη. Η μεταβατική ζώνη αποτελείται από τουλάχιστον δύο διακριτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από 10-16 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. (5)



:

Εικόνα 3. Σύνθεση του πρωτεύοντος κροσσού (4)

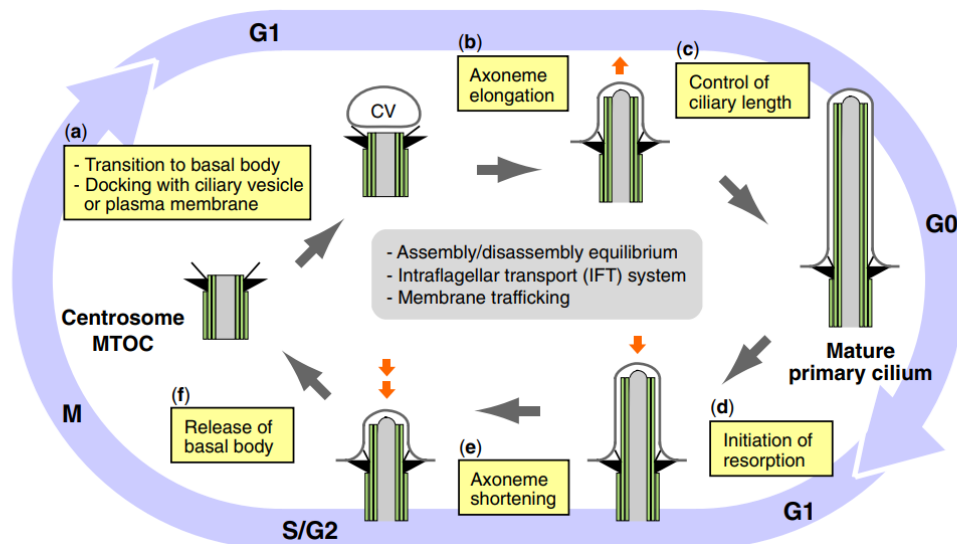
1.2 Φυσιολογία του πρωτεύοντα κροσσού

Ο πρωτεύοντας κροσσός παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και τη διατήρηση των ζωτικών οργάνων. Επιπρόσθετα, διατηρεί την ομοιόσταση του οργανισμού και παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση ελέγχοντας έτσι πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες όπως την κυτταρική μετανάστευση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση καθώς είναι ικανός να αντιλαμβάνεται τις αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος. Τέλος, συμμετέχει στον προγραμματισμό του κυτταρικού κύκλου και στον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου.(6,7)

1.2.1 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στον κυτταρικό κύκλο

Ο σχηματισμός και η αποσυναρμολόγηση του πρωτεύοντος κροσσού έχουν συσχετιστεί με τον κυτταρικό κύκλο. Ο σχηματισμός συμβαίνει κατά τη φάση G1/G0 του κυτταρικού κύκλου, ενώ η αποσυναρμολόγηση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Το πρώτο βήμα για την έναρξη του σχηματισμού του πρωτεύοντος κροσσού συμβαίνει κατά την έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο, όταν το κεντρόσωμα μετακινείται στην κυτταρική επιφάνεια και το μητρικό κεντριόλιο σχηματίζει το βασικό σωματίο από το οποίο θα επιμηκυνθεί το αξόνημα. Η δημιουργία του πρωτεύοντος κροσσού περιγράφεται μέσα από δυο μονοπάτια, ένα ενδοκυτταρικό και ένα εξωκυτταρικό. Στο εξωκυτταρικό μονοπάτι, αρχικά αγκυροβολάται το μητρικό κεντριόλιο στην πλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια σχηματίζονται οι μικροσωληνίσκοι.

Στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι, η επιμήκυνση του αξονήματος ξεκινά μέσα στο κυτταρόπλασμα μέσω αλληλεπίδρασης του μητρικού κεντριολίου με κυστίδια, τα βλεφαριδικά κυστίδια (CV), τα οποία προέρχονται από το σύμπλεγμα Golgi. Για να γίνει η επιμήκυνση, απαιτείται ο συντονισμός της IFT και της επιλεκτικής εισαγωγής ειδικών για τον κροσσό πρωτεϊνών μέσω ενός φραγμού της μεταβατικής ζώνης. Το μήκος του κροσσού καθορίζεται από την ισορροπία ανάμεσα στην συναρμολόγηση και την αποσυναρμολόγηση του. Όταν το κύτταρο εισέρχεται ξανά στον κυτταρικό κύκλο, η ισορροπία τείνει προς την αποσυναρμολόγηση, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την προσρόφηση του πρωτεύοντα κροσσό στο εσωτερικό του κυττάρου, μειώνοντας σταδιακά το μήκος του κροσσού. Τελικά, το βασικό σωματίο απελευθερώνεται από τον κροσσό και αυτό κατευθύνει τα κεντριόλια να λειτουργήσουν ως κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC). (8)



Εικόνα 4. Σχηματισμός πρωτεύοντα κροσσού σε σχέση με τον κυτταρικό κύκλο (8)

Επιπρόσθετα, στην αποσυναρμολόγηση του πρωτεύοντος κροσσού βασικό ρόλο παίζει η κινάση Aurora A (AURKA). Πιο συγκεκριμένα ο HEF1 ενεργοποιεί την AURKA, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την αποακετυλάση της ιστόνης 6 (HDAC6). Παράλληλα, η HDAC6 χρησιμοποιεί διάφορους μηχανισμούς για να οδηγήσει στην αποσυναρμολόγηση του πρωτεύοντος κροσσού, οι οποίοι μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν αποακετυλίωση της α -τουμπουλίνης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η αποσυναρμολόγηση του πρωτεύοντος κροσσού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διαδικασία της μίτωσης, υπογραμμίζοντας έτσι τη συμμετοχή που έχει κατά συνέπεια το κεντρόσωμα στην εγκαθίδρυση των πόλων της μιτωτικής ατράκτου και το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Τελικά, λειτουργεί ως ένας φραγμός στην είσοδο της φάσης S και M. (4,9)

1.2.2 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στην κυτταρική σηματοδότηση:

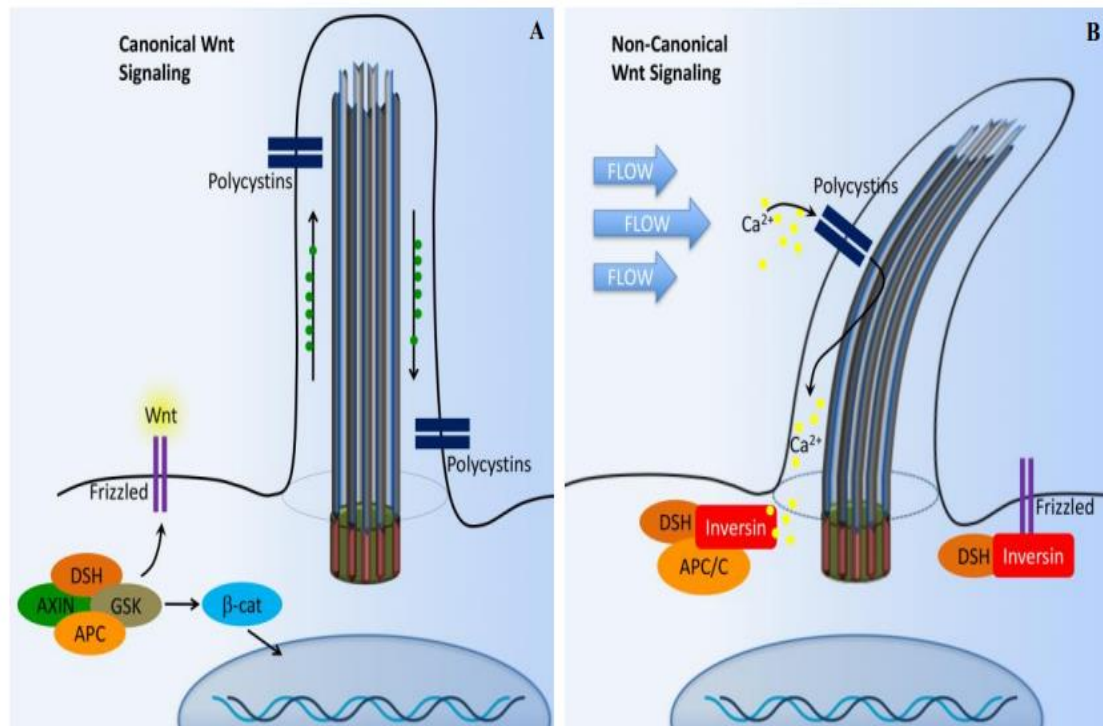
Ο πρωτεύοντας κροσσός παίζει σημαντικό ρόλο σε μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη

μορφογένεση. Κατά συνέπεια διαταραχές στη λειτουργία αυτών των μονοπατιών έχουν ως συνέπεια την εμφάνιση ασθενειών. Τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο πρωτεύοντας κροσσός είναι τα μονοπάτια Wnt και Hedgehog. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt συμμετέχει στην κυτταρική μετανάστευση, στην εγκατάσταση της επίπεδης κυτταρικής πολικότητας, στην νευρική προτυποποίηση, στην ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος και στην οργανογένεση. Η σηματοδότηση μέσω Wnt χωρίζεται σε δυο κατηγορίες: την κανονική και τη μη κανονική σηματοδότηση.

Πιο αναλυτικά, στην κανονική σηματοδότηση λόγω της καταστολής του συμπλόκου καταστροφής της β-κατενίνης, το οποίο αποτελείται από αζίνη, APC, ένζυμα κινάσης καζεΐνης 1 (CK1) και την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK-3β) είναι υψηλά τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-κατενίνης. Απουσία Wnt, η φωσφορύλιωση της β-κατενίνης από τις CK1 και GSK-3β που συμβαίνει στο βασικό σωματίο οδηγεί στη μείωση της β-κατενίνης. Παρουσία Wnt, το σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης αγκυροβολάται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της DSH, μιας κυτταροπλασματικής φωσφοπρωτεΐνης το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του συμπλόκου. Στη συνέχεια, η β-κατενίνη μεταφέρεται στον πυρήνα όπου συνδέεται στον παράγοντα δέσμευσης λεμφικού ενισχυτή (LEF) και στον ειδικό για T-κύτταρα μεταγραφικό παράγοντα (TCF). Αυτή η δέσμευση ωθεί στην απελευθέρωση του LEF/TCF από τον μεταγραφικό καταστολέα Groucho. (10)

Το μη κανονικό μονοπάτι, χρησιμοποιείται για να ελέγξει τη λειτουργία και την αρχιτεκτονική των ιστών. Είναι ανεξάρτητο από την β-κατενίνη, αλλά εξαρτάται από τη DSH και ρυθμίζει τη σηματοδότηση Ca^{2+} από την οποία και ενεργοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της β-κατενίνης, η DSH στρατολογείται στην κυτταρική μεμβράνη για να μην αποικοδομηθεί από το πρωτεόσωμα.

Ταυτόχρονα, έχει βρεθεί ότι πολλές πρωτεΐνες που πρωτεύοντος κροσσού και του βασικού σωματίου παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης Wnt. Ειδικά, η πρωτεΐνη *inversin* η οποία λειτουργεί ως ένας μοριακός διακόπτης απαραίτητος για τη ρύθμιση της ισορροπία ανάμεσα στην κανονική και τη μη κανονική σηματοδότηση Wnt, και για την καταστολή της δραστηριότητας της β-κατενίνης. (10,11)



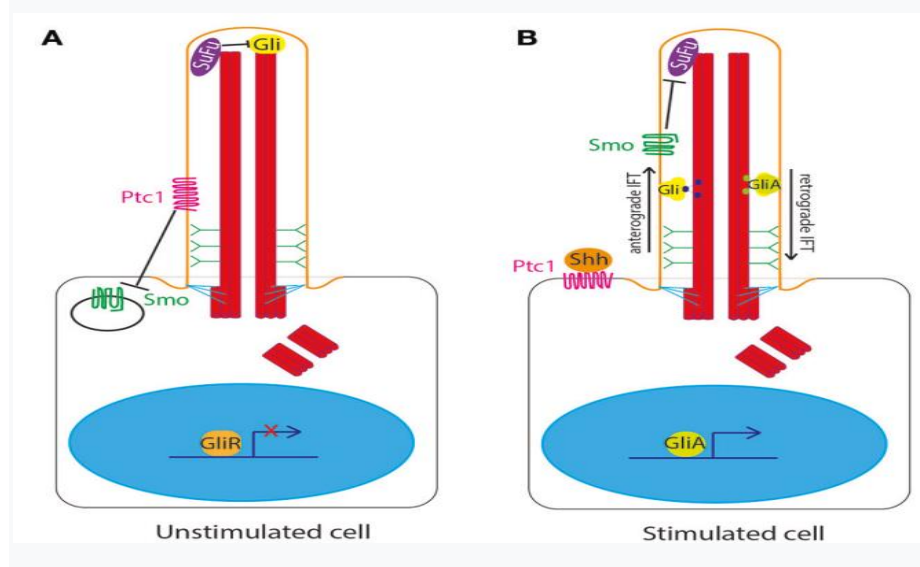
Εικόνα 5. Κανονική και μη σηματοδότηση Wnt (10)

Η σηματοδότηση Hedgehog (Hh) έχει σημαντικό ρόλο από την εμβρυϊκή ανάπτυξη των σπονδυλωτών μέχρι και τη διατήρηση της ομοιόστασης στους ενήλικες. Επιπλέον, φαίνεται πως σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου η σηματοδότηση αυτή είναι διαταραγμένη. Ο πρωτεύοντας κροσσός λειτουργεί ως κέντρο μεταγωγής σήματος για τη συγκεκριμένη σηματοδότηση.

Πιο συγκεκριμένα, απουσία του Hh προσδέτη, ο διαμεμβρανικός υποδοχέας Patched1 (PTCH1) είναι προσδεσμένος στη βάση του πρωτεύοντα κροσσού και αναστέλλει τη

λειτουργία εφτά διαμεμβρανικών πρωτεϊνών smoothened (SMO). Παράλληλα, οι 3 μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια δακτυλίου ψευδαργύρου GLI (GLI1, GLI2, GLI3) και ο καταστολέας του fused (SUFU) αλληλεπιδρούν με τον πρωτεύοντα κροσσό. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού του μεταγραφικού καταστολέα (GLI3) και τη διέγερση των μεταγραφικών ενεργοποιητών (GLI1, GLI2). (4)

Από την άλλη, η παρουσία του Hh προσδέτη ενεργοποιεί τον PTCH1. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στην απομάκρυνση του από τον πρωτεύοντα κροσσό, διακόπτοντας έτσι την αναστολή των SMO, οι οποίοι μετακινούνται μέσα στον κροσσό. Με την σειρά τους οι SMO καταστέλλουν την αναστολή του SUFU και ενεργοποιούν τους GLI ενεργοποιητές, οι οποίοι μετακινούνται στον πυρήνα και επάγουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων. Στη συνέχεια οι GLI φωσφορυλιώνονται από την κινάση A (PKA), το γλυκογόνο 3 (Gsk3b) και την κινάση της καζεΐνης 1 (Ck1). Αυτές οι φωσφορυλιώσεις δημιουργούν ένα φωσφοπεπτιδικό μοτίβο πάνω στις GLI1 και GLI2 το οποίο αναγνωρίζεται από το συμπλοκό Skip/Cullin1/F-box E3 λιγάση ουβικιτίνης β-TrCP το οποίο μεταφέρει τις πρωτεΐνες GLI στο πρωτεόσωμα για την αποικοδόμηση τους. Συνεπώς, η καταστολή του GLI3 και η ενεργοποίηση του GLI2 εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη λειτουργία του πρωτεύοντα κροσσού. (10)



Εικόνα 6. Σηματοδότηση Hedgehog (5)

1.2.3 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό:

Στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ο ρόλος των κεντροσωμάτων αλλάζει ανάμεσα σε παραπυρηνικά κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων (MTOCs) και κέντρα οργάνωσης του πρωτεύοντα κροσσού. Αυτή η αλλαγή στην θέση και τη λειτουργία των κεντροσωμάτων αποσκοπεί σε δυο πράγματα όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πρώτον, ο πρωτεύοντας κροσσός μπορεί να καθορίσει την μοίρα των κυττάρων και τη μορφογένεση των ιστών ελέγχοντας τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου και κατανέμοντας ανάμεσα στα δυο θυγατρικά κύτταρα τους παράγοντες που καθορίζουν τη μοίρα του κυττάρου. Ταυτόχρονα, ο σχηματισμός του πρωτεύοντα κροσσού επιτρέπει την ανάμιξη των εξωκυτταρικών σημάτων με ενδοκυτταρικές αποκρίσεις που μεσολαβούνται από τον κυτταροσκελετό, την κυτταρική διαίρεση και τη μεταγραφή. Όπως το κεντρόσωμα είναι το βασικό κέντρο της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, έτσι ο πρωτεύοντας κροσσός έχει τον ίδιο ρόλο για την εξωκυττάρια σηματοδότηση. Για αυτό διαθέτει μια πληθώρα σηματοδοτικών και ρυθμιστικών στοιχείων όπως κανάλια ιόντων και μεμβρανικούς υποδοχείς. Συνεπώς, η εναλλαγή ανάμεσα στους δυο ρόλους του κεντροσώματος βοηθάει στη μετάβαση από τα εξωκυττάρια στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. (12)

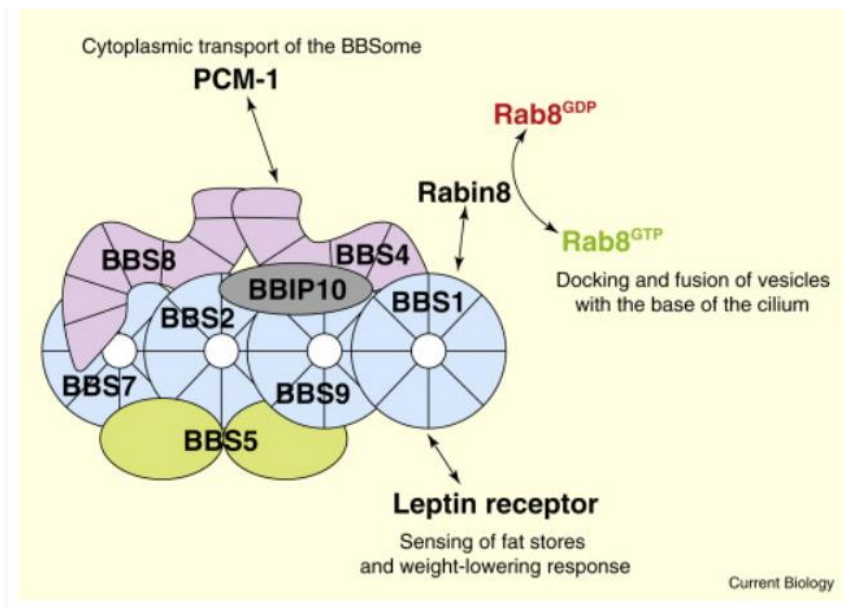
1.2.4 Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στην κυτταρική μετανάστευση

Η κυτταρική μετανάστευση φυσιολογικά συμβαίνει όταν χρειάζεται η επούλωση μιας πληγής ή η αντικατάσταση ενός τμήματος τραυματισμένου ιστού όπου νεοσχηματιζόμενα κύτταρα μεταναστεύουν για να καλύψουν το κενό ή να αντικαταστήσουν τα κατεστραμμένα κύτταρα. Επιπλέον, κυτταρική μετανάστευση

εμφανίζεται όταν έχουμε μετάσταση του καρκίνου καθώς καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν σε γειτονικούς ιστούς. Ο πρωτεύοντας κροσσός διαθέτει αγκυροβολημένους υποδοχείς για τον αυξητικό παράγοντα PDGF. Ο παράγοντας PDGF διαδραματίζει βασικό ρόλο στην επούλωση των τραυμάτων καθώς διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την αγγειογένεση. Η σημαντικότερη λειτουργία του είναι να προάγει την στρατολόγηση των περιαγγειακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, όταν ο παράγοντας PDGF προσδεθεί στους υποδοχείς του, τους ενεργοποιεί (PDGFRa) και επάγει τη φωσφορυλίωση του PI3K/AKT και MEK1/2-EPK1/2-RSK. Αυτές οι φωσφορυλιώσεις ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού, το οποίο ελέγχει την κατεύθυνση της κυτταρικής μετανάστευσης. (13) (14)

1.2.5 BBSome

Το BBSome είναι ένα οκταμερές σύμπλοκο πρωτεϊνών που αποτελείται από τις πρωτεΐνες BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9, BBS18 και αποτελεί σημαντικό στοιχείο του πρωτεύοντος κροσσού. (15) Το BBSome λειτουργεί ως ένας αμφίδρομος μεταφορέας. Πιο συγκεκριμένα, ρυθμίζει την απομάκρυνση των GPCRs και της πολυκυστίνης 2 από τον πρωτεύοντα κροσσό. Επιπλέον, η κίνηση του συμπλόκου συσχετίζεται με τη μεταφορά φορτίων από την IFT μέσω του κροσσού. Η Rabin8 ενεργοποιεί μια μικρή GTPase, την Rab8a, η οποία αλληλεπιδρά με το BBSome και δρα θετικά στην επιμήκυνση του πρωτεύοντος κροσσού. Μεταλλάξεις στο BBSome οδηγούν στο σύνδρομο BBS το οποίο χαρακτηρίζεται από νεφρική νόσο, παχυσαρκία, υπογοναδισμό, πολυδακτυλία, νοητική υστέρηση και σταδιακή μείωση της όρασης λόγω μελαγχρωστικής αμφιβληστροειδίτιδας. (3,16)



Εικόνα 7. Το σύμπλοκο BBSome (17)

1.2.6 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός επιβίωσης για τα κύτταρα που τα βοηθάει να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους. Η λειτουργία αυτή καταλύεται από τις σχετικές με την αυτοφαγία πρωτεΐνες (ATGs) οι οποίες οδηγούν σταδιακά στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων τα οποία συντήκονται με λυσοσώματα προκειμένου να διασπάσουν συστατικά του κυτταροπλάσματος με σκοπό να παρέχουν στο κύτταρο αμινοξέα, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και υδατάνθρακες. Η δορυφορική πρωτεΐνη των κεντριολίων (OFD1) εντοπίζεται στα κεντριόλια και παίζει ρόλο στο σχηματισμό των βλεφαρίδων. Κατά την απλή αυτοφαγία, η OFD1 εντοπίζεται στο βασικό σωματίο μαζί με τον δείκτη αυτοφαγίας LC3 και εμποδίζει τον σχηματισμό του πρωτεύοντα κροσσού. Ωστόσο, όταν προκαλείται αυτοφαγία λόγω ασιτίας τα επίπεδα OFD1 μειώνονται μέσω της πρωτεΐνης ATG5 και της λειτουργίας των λυσοσωμάτων. Αυτή η μείωση ενισχύει τον σχηματισμό του πρωτεύοντος κροσσού. Παράλληλα, ο πρωτεύοντας κροσσός επάγει τον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα

όσο αυξάνεται η σηματοδότηση Hedgehog επάγεται η αυτοφαγία, ενώ όσο μειώνεται αποτρέπεται η διαδικασία της αυτοφαγίας. (10,16,18)

2. Καρκινογένεση.

Στα κύτταρα των όγκων που πολλαπλασιάζονται, ο πρωτεύοντας κροσσός απουσιάζει υποδεικνύοντας έτσι ότι δεν είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ωστόσο είναι γνωστό ότι παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της μίτωσης. (19)

Παρόλο που η αιτία της απουσίας του πρωτεύοντος κροσσού στα καρκινικά κύτταρα δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, δεν προκαλεί έκπληξη εφόσον η παρουσία του πρωτεύοντα κροσσού γενικά είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Αν και ο πρωτεύοντας κροσσός θα έπρεπε να απουσιάζει στα έντονα διαιρούμενα κύτταρα, έχει παρατηρηθεί σε μερικούς τύπους καρκίνους όπως στο μυελοβλάστωμα για αυτό απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.(20)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο πρωτεύοντας κροσσός παίζει σημαντικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια Hedgehog και Wnt των οποίων η διαταραχή έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην ανάπτυξη όγκων. Πιο συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση του πρωτεύοντος κροσσού ενισχύει τη σηματοδότηση Wnt η οποία ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση οδηγώντας στο σχηματισμό όγκων. Ταυτόχρονα, η αναστολή της σύνθεσης του πρωτεύοντος κροσσού οδηγεί σε μη κανονική ενεργοποίηση της σηματοδότησης Hh, το οποίο ενισχύει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. (21)

3. Μεσοθηλιακά κύτταρα

Το μεσοθήλιο είναι μια μονοστιβάδα εξειδικευμένων κυττάρων που καλύπτουν τις ορογόνες κοιλότητες και τα εσωτερικά όργανα και ονομάζονται μεσοθηλιακά.

3.1 Δομή και εντοπισμός.

Το μεσοθήλιο στους ανθρώπους ξεκινάει να αναπτύσσεται την 14^η ημέρα της κύησης από τον μεσοδερμικό ιστό, όπου τα κύτταρα σταδιακά διαφοροποιούνται σε επιμήκη ίσια κύτταρα.

Η μονοστοιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων επεκτείνεται στην επιφάνεια των τριών ορογόνων κοιλοτήτων, οι οποίες είναι η υπεζωκοτική, η περιτοναϊκή και η περικαρδιακή. Ταυτόχρονα, στα αρσενικά άτομα έχει ακόμα μια λειτουργία, να καλύψει τον ασκό των όρχεων. Το μεσοθήλιο διακρίνεται σε 2 κατηγορίες: το περισπλάχνιο μεσοθήλιο που καλύπτει τα εσωτερικά όργανα και το τοιχωματικό μεσοθήλιο που αγκαλιάζει το τοίχωμα του σώματος.

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα δημιουργούν μια λεπτή μεμβρανική βάση, η οποία συγκρατείται με τη βοήθεια ενός συνδετικού στρώματος ιστού, το οποίο ποικίλει σε ποιότητα και ποσότητα ανάλογα με το είδος και τον ιστό στον οποίο βρίσκονται. Η μεμβρανική βάση αποτελείται από μεσοθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι κυρίως επιμήκη, πεπλατυσμένα, φολιδωτά κύτταρα, με διάμετρο περίπου 25μm στα οποία το κυτταρόπλασμα εκτείνεται γύρω από έναν στρογγυλό ή οβοειδή πυρήνα.

Εκτός από τα φολιδωτά, πολλές φορές εντοπίζονται και κυβοειδή κύτταρα σε πολλές περιοχές, όπως για παράδειγμα στις διαφραγματικές περιοχές του μεσοθωρακικού υπεζοκότα, στα “milky spots” που εντοπίζονται σε μια μεγάλη περιοχή του σπλαχνικού περιτόναιου η οποία ονομάζεται μείζον επίπλους, στο συκώτι, στον σπλήνα και στην περιτοναϊκή πλευρά του διαφράγματος που εντοπίζεται στην υπερκείμενη πλευρά των λεμφικών κενών. Επιπρόσθετα, κυβοειδή κύτταρα είναι δυνατόν να εντοπιστούν έπειτα από διέγερση των ορογόνων επιφανειών ή τραυματισμό.

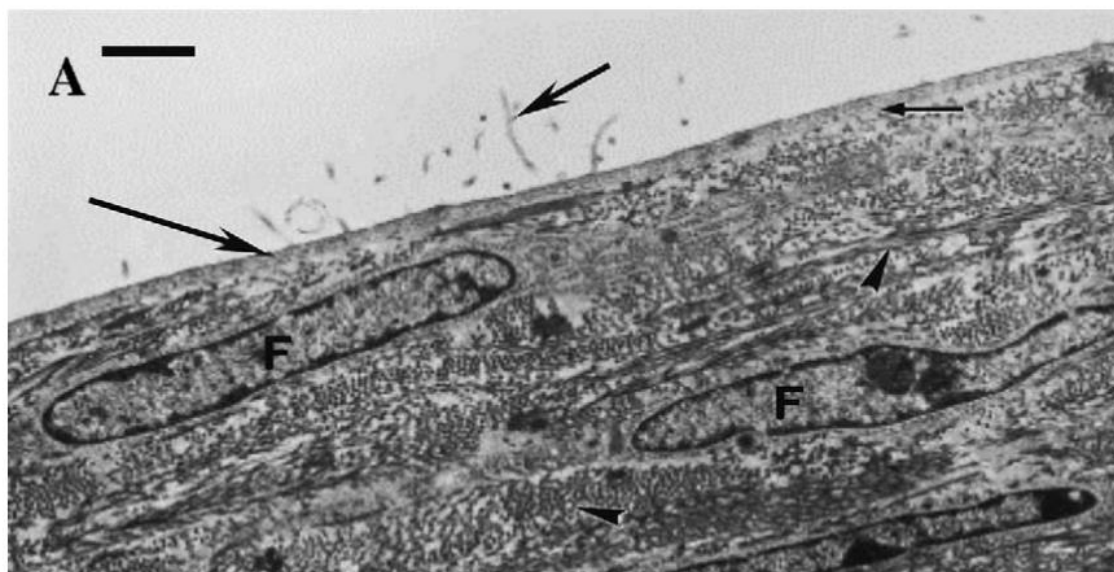
Τα δυο είδη μεσοθηλιακών κυττάρων εμφανίζουν δομικές διαφορές όσον αφορά τον πυρήνα τους και τα κυτταρικά οργανίδια. Τα φολιδωτά μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούνται από στρογγυλό ή οβοειδή πυρήνα και τα κυτταρικά τους οργανίδια είναι τοποθετημένα κεντρικά, κοντά στον πυρήνα. Επιπλέον, διαθέτουν μικροσωληνίσκους, μικρονημάτια τα οποία βρίσκονται παράλληλα στην κυτταρική επιφάνεια και βαθιά μέσα στο κυτταρόπλασμα, γλυκογόνο, λίγα μιτοχόνδρια, ένα όχι αρκετά αναπτυγμένο σύστημα Golgi και ένα μικρό τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (RER). Από την άλλη, τα κυβοειδή κύτταρα διαθέτουν μεγαλύτερο πυρήνα και εξέχων πυρηνίσκο. Παράλληλα, έχουν πληθώρα μιτοχονδρίων και RER, ένα καλά αναπτυγμένο σύστημα Golgi, μικροσωληνίσκους και σε σχέση με τα φολιδωτά κύτταρα, μεγαλύτερο αριθμό μικρονηματίων, το οποίο υποδεικνύει ότι ίσως είναι μεταβολικά πιο ενεργά.

Στα μεσοθηλιακά κύτταρα, η επιφάνεια του αυλού διαθέτει ένα καλά αναπτυγμένο σύνορο από μικρολάχνες, οι οποίες ποικίλλουν σε σχήμα, μήκος και πυκνότητα. Οι μικρολάχνες βρίσκονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στα διαφορετικά όργανα, στα παρακείμενα κύτταρα και στην επιφάνεια ανεξάρτητων κυττάρων, ενώ ο συνολικός αριθμός των μικρολάχνων δεν είναι σταθερός, καθώς διαφοροποιείται σε κάθε κύτταρο κάτω από διαφορετικές συνθήκες το οποίο υποδεικνύει ότι η συγκέντρωσή τους αντανακλά μια λειτουργική προσαρμοστικότητα.

Συγχρόνως, τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν ένα καλά αναπτυγμένο σύστημα κυστιδίων και κενοτόπιων. Όπως και στις μικρολάχνες, η συγκέντρωσή και η δομή τους ποικίλλει ανάμεσα στα κύτταρα και τις δομές. Γενικά, περισσότερα κυστίδια εντοπίζονται στο σπλαχνικό μεσοθηλίωμα και τα κυστίδια είναι περισσότερα σε αριθμό στην περιοχή του αυλού. Οι λειτουργίες που συμμετέχουν είναι η μεταφορά υγρών και σωματιδίων μέσα από το μεσοθήλιο.

Όπως είναι λογικό, τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν ένα καλά αναπτυγμένο σύστημα δεσμών κυττάρου-κυττάρου, το οποίο περιλαμβάνει χασμοσυνδέσμους, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη της πολικότητας της κυτταρικής επιφάνειας καθώς και για την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση ενός ημιδιαπερατού φραγμού. Παράλληλα διαθέτει adherens junction που σχηματίζουν τη δομική και προσαρμοστική ενίσχυση του κυτταρικού στρώματος και gap junctions τα οποία είναι υδάτινα ενδοκυτταρικά κανάλια.

Τέλος, τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαθέτουν στόματα τα οποία είναι κοιλότητες που εντοπίζονται στην ένωση δυο ή περισσότερων μεσοθηλιακών κυττάρων. Το άνοιγμα τους έχει διάμετρο 3-12μm και εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές των κυβοειδών κυττάρων. Ο ρόλος τους είναι να παρέχουν άμεση πρόσβαση στο υποκείμενο μεσοθηλίωμα του λεμφικού συστήματος, το οποίο επιτρέπει γρήγορη απομάκρυνση υγρών, βακτηρίων και μορίων από τις ορογόνες κοιλότητες. Αυτή η διαδικασία μπορεί να εξηγήσει πως είναι δυνατόν εισπνεόμενα αντικείμενα, όπως ο αμίαντος, να εισέρχονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα και να προκαλούν ίνωση και καρκίνο στο μεσοθήλιο. (22,23)



Εικόνα 8. Ηλεκτρονική μικρογραφία που δείχνει ένα μεσοθηλιακό κύτταρο με ένα λεπτό εξασθενημένο κυτταρόπλασμα (μεγάλο βέλος) και επιφανειακές μικρολάχνες (μεσαίο βέλος) που στηρίζονται σε μια βασική μεμβράνη (μικρό βέλος). Επιμήκη κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες (F) κάτω από το μεσοθήλιο περιβάλλονται από κολλαγόνο (κεφαλές βελών) και άλλο συνδετικό ιστό. (22)

3.2 Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων.

Αρχικά, η επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων συμβάλλει στη μεταφορά και τη κίνηση υγρών διαμέσου των επιφανειών των κοιλοτήτων. Για να πετύχουν αυτή τη μεταφορά τα κύτταρα εκκρίνουν στην επιφάνεια τους γλυκοζαμινογλυκάνες και υαλουρονικό, η σύνθεση του οποίου αυξάνεται έπειτα από τραυματισμούς. Επιπλέον, τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά και συμμετέχουν στην φλεγμονή των ορογόνων κοιλοτήτων εκκρίνοντας διάφορους ανοσοτροποποιητικούς μεσολαβητές. Μέσα σε αυτούς περιλαμβάνονται προσταγλαδίνες και προστακυκλίνη, μονοξείδιο του αζώτου (NO), χημειοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και μόρια της εξωκυττάριας μήτρας (ECM).

Ταυτόχρονα, η ύπαρξη φλεγμονής στην υπεζωκοτική, την περιτοναϊκή και την περικαρδιακή κοιλότητα χαρακτηρίζεται από μαζική ροή λευκοκυττάρων εντός της κοιλότητας από τα αγγειακά διαμερίσματα. Για να μπορέσει να επαχθεί η ροή των λευκοκυττάρων όταν υπάρχει φλεγμονή, υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης των χημειοκινών από τα μεσοθηλιακά κύτταρα, οι οποίες δημιουργούν μια χημειοτακτική βαθμίδωση συγκέντρωσης από την κεντρική-πλάγια προς την κορυφαία πλευρά του μεσοθηλιακού κυττάρου.

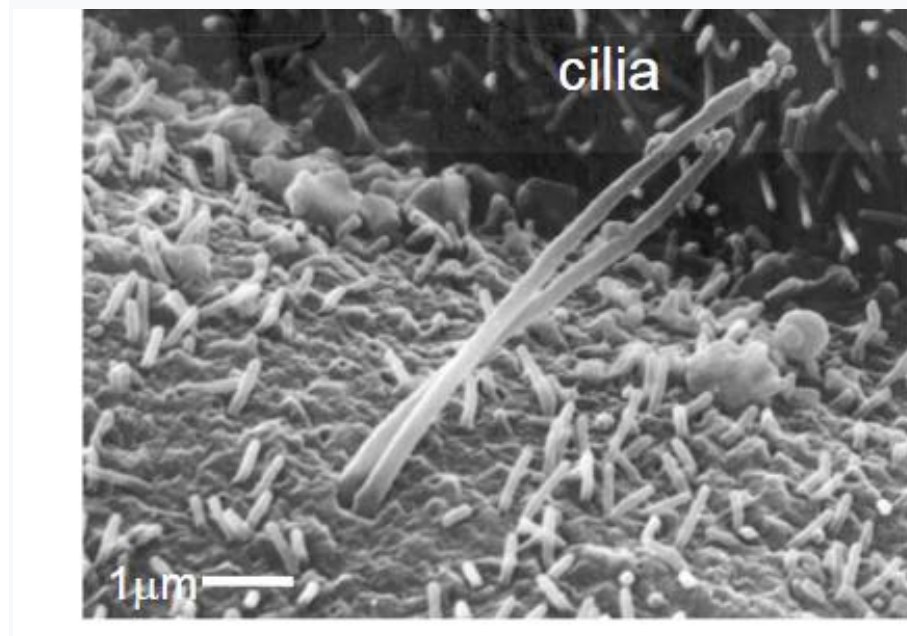
Επιπρόσθετα, υπάρχει έκκριση αυξητικών παραγόντων και ECM από τα μεσοθηλιακά κύτταρα που αναφέρθηκε παραπάνω που συμμετέχουν στην φλεγμονή και την επιδιόρθωση των ιστών. Συγκεκριμένα, οι αυξητικοί παράγοντες επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση στο ακριανό σημείο της κάκωσης και τα επιδιορθωμένα κύτταρα μεταναστεύουν πάνω από τα μόρια ECM που βρίσκονται στο σημείο της πληγής για να καλύψουν το τραύμα. Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται είναι μεταξύ άλλων ο TGF- β , ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και ο αγγειακός EGF (VEGF).

Τέλος, τα μεσοθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν στην τοπική εγκαθίδρυση και τον καθαρισμό του ινώδους από τις ορογόνες κοιλότητες. Αυτή η λειτουργία είναι πολύ σημαντική για την πρόληψη των μηχανικών τραυματισμών, του αιμοθώρακα και της φλεγμονής τα οποία εμφανίζονται σε περίπτωση που δε γίνει σωστή διαχείριση του ινώδους από τον οργανισμό. (23)

3.3 Μεσοθηλιακά κύτταρα και πρωτεΐοντας κροσσός.

Ο πρωτεΐοντας κροσσός εντοπίζεται σε πολλά κύτταρα του οργανισμού όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μεταξύ των οποίων είναι και τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Ακόμη, εντοπίζεται πέρα από τον άνθρωπο και σε μεσοθηλιακές επιφάνειες άλλων

ειδών όπως ο αρουραίος και το κουνέλι. Γενικά, ο πρωτεύοντας κροσσός εντοπίζεται σε μια θέση κεντρική και κορυφαία σε σχέση με τον πυρήνα αλλά παρατηρήθηκε και σε θέσεις που δε βρίσκονται κεντρικά. Σε ορισμένα πειράματα, που διεξήχθησαν τόσο στον άνθρωπο όσο και στο κουνέλι ο πρωτεύοντας κροσσός φάνηκε να υιοθετεί ένα τυχαίο προσανατολισμό, ενώ σε ορισμένα μεσοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν πολλαπλοί κροσσοί, στα οποία προεξείχαν δυο ή και περισσότεροι κροσσοί από το ίδιο σημείο. (24)



Εικόνα 9. Ηλεκτρονική μικρογραφία στην οποία απεικονίζεται η προεξοχή δυο βλεφαρίδων από το ίδιο σημείο. (24)

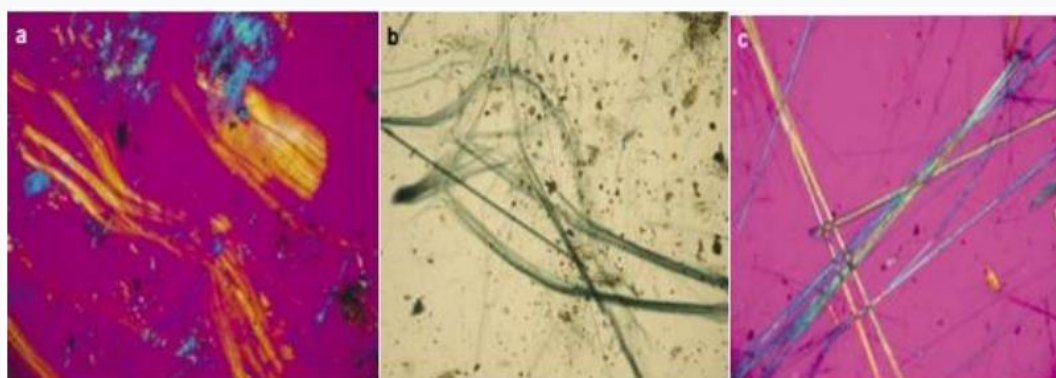
4. Μεσοθηλίωμα.

4.1 Παράγοντες που προκαλούν μεσοθηλίωμα

Το μεσοθηλίωμα είναι ένας επιθετικός κακοήθης όγκος που εντοπίζεται στις κοιλότητες του υπεζωκότα, την περιτοναϊκή και την περικαρδιακή. Παλαιότερα, η

συγκεκριμένη μορφή καρκίνου θεωρούνταν σπάνια αλλά τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς η εμφάνιση του σε όλο τον κόσμο, λόγω της εκτεταμένης έκθεσης σε αμίαντο, ο οποίος είναι βασικός παράγοντας που σχετίζεται με την εμφάνιση μεσοθηλιώματος. Παρά το πρόβλημα που δημιουργεί, η χρήση του αμιάντου δεν είναι ακόμα απαγορευμένη παγκοσμίως και χρησιμοποιείται σε αρκετές χώρες όπως η Κίνα και η Ρωσία. Αυτή η χρήση πιθανώς να οδηγήσει μελλοντικά σε επιδημία ασθενειών που σχετίζονται με τον αμίαντο. (25)

Ο αμίαντος που είναι και ο βασικότερος παράγοντας πρόκλησης μεσοθηλιώματος υπάρχει σε τρεις μορφές οι οποίες είναι: ο χρυσότιλος (λευκός αμίαντος), ο κροκιδολίτης (μπλε αμίαντος) και ο αμοσίτης (καφέ αμίαντος) και φαίνονται με τη σειρά που αναφέρονται στην παρακάτω εικόνα. (26)



Εικόνα 10. Οι τρεις μορφές αμιάντου (26)

Ο δεύτερος πιθανός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση μεσοθηλιώματος είναι ένας ιός DNA, ο ιός Simian Virus 40 (SV40). Αυτός ο ιός μπλοκάρει ογκοκατασταλτικά γονίδια, οπότε είναι ένας ιός που πιθανόν επάγει την ανάπτυξη όγκων σε ανθρώπους και τρωκτικά. Υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις ότι ο ιός αυτός μεταδόθηκε κατά λάθος στους ανθρώπους μέσω του εμβολίου της πολιομυελίτιδας 35-50 χρόνια πριν. Ο ακριβής ρόλος του ιού ωστόσο στην ανάπτυξη του καρκίνου δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Επίσης, υπάρχει ένας μικρός αριθμός

άλλων παραγόντων που μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη μεσοθηλιώματος, όπως είναι η ακτινοβολία. (27)

4.2 Βιολογική επίδραση του αμιάντου

Η φυσιολογική λειτουργία των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι να υποβοηθούν την ελεύθερη κίνηση των επιφανειών του υπεζωκότα στην αναπνοή μέσω λιπαντικών γλυκοπρωτεϊνών. Στην περίπτωση που υπάρξει εισπνοή αμιάντου αυτός επάγει μεταλλάξεις σε μια πληθώρα μεσοθηλιακών κυττάρων ενός ενήλικου ατόμου.

Οι τρόποι με τους οποίους ο αμιάντος επηρεάζει τον υπεζωκότα είναι οι εξής: Αρχικά, μετά την εισροή από ίνες αμιάντου στον υπεζωκότα το μήκος και το πλάτος τους θα καθορίσει πόσο βαθιά θα διεισδύσουν στον πνεύμονα και πόσο πιθανό είναι να προκαλέσουν καρκίνο. Οι ίνες που καταφέρνουν να διεισδύσουν επιτυχώς στον πνεύμονα μπορεί να ερεθίσουν ή να τραυματίσουν τον υπεζωκότα προκαλώντας ασθένειες ή και κακόηθες μεσοθηλιώμα. Δεύτερον, οι ίνες του αμιάντου μπορεί να προκαλέσουν διαταραχή στην μίτωση το οποίο προκαλεί ανευπλοειδία και άλλες χρωμοσωμικές βλάβες. Τρίτον, ο αμιάντος μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου που σχετίζονται με τον καρκίνο οι οποίες είναι υπεύθυνες για την καταστροφή του DNA. Τέλος, ο αμιάντος επάγει την φωσφορυλίωση των κινασών MAP και ERK1,2 οι οποίες αυξάνουν την έκφραση πρώιμα-επαγόμενων πρωτο-ογκογονιδίων. (28–30)

4.3 Μεσοθηλιώμα και πρωτεύοντας κροσσός

Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, παρατηρήθηκε ότι όταν το BBS1, ένα από τα βασικά συστατικά του πρωτεύοντος κροσσού, έχει υψηλή γονιδιακή έκφραση είναι ένας θετικός προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης για άτομα τα οποία πάσχουν από

κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα. Επιπλέον, σε κάποιες άλλες μελέτες βρέθηκε πως δυο άλλα μοριακά συστατικά του πρωτεύοντος κροσσού το BBS2 και το BBS12 συμβάλουν στην επιβίωση ασθενών με μεσοθηλίωμα. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν τη σημασία του πρωτεύοντος κροσσού στο μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα. (31,32)

4.4 Θεραπεία

Σήμερα, χρησιμοποιούνται δυο κύριες θεραπευτικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση του κακόηθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα. Η πρώτη είναι η χειρουργική επέμβαση και η δεύτερη είναι η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία δεν προτιμάται καθώς τα κύτταρα συνήθως αντιστέκονται ενώ η διάγνωση συνήθως γίνεται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου οπότε η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται κυρίως για την ανακούφιση του πόνου.

Όσον αφορά τη χειρουργική επέμβαση τα κριτήρια για την επιλογή των ασθενών είναι το στάδιο και ο τύπος του καρκίνου, το που εντοπίζεται καθώς και η κατάσταση του ασθενούς. Επίσης, η χειρουργική επέμβαση δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται μεμονωμένα αλλά σε ένα πλαίσιο θεραπευτικού σχήματος το οποίο περιλαμβάνει συνδυασμό με ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία.

Επιπλέον, γίνονται δοκιμές με νέα φάρμακα τα οποία έχουν ως στόχο συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια. Παράδειγμα αποτελούν η χρήση αντι-αγγειογεννητικών παραγόντων, όπως το Bevacizumab καθώς και ανοσοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα όπως cytotoxic T lymphocyte-associated protein (CTLA-4) (33)

Ειδικό μέρος

5. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν να μελετηθεί η επίδραση της διατάραξης του πρωτεύοντος κροσσού σε πρωτογενή κύτταρα κακόηθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα είτε από την χορήγηση θειϊκό αμμώνιο (AS) ή ένυδρης χλωράλης (CH) που επάγουν αυτοτομή ή από τη χορήγηση χλωριούχου λιθίου (LC) που επιμηκύνει τον πρωτεύοντα κροσσό στην κυτταρική βιωσιμότητα, προσκόλληση, μετανάστευση, στον σχηματισμό σφαιροειδών σε 3D καλλιέργειες, στη διήθηση σφαιροειδών σε 3D καλλιέργειες και στη δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου.

6. Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Στα πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή κύτταρα κακόηθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα που απομονώθηκαν από υπεζωκοτικό υγρό ασθενούς με επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα που νοσηλεύτηκε στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS) – RPMI (F0804, Sigma, St Louis, MO, USA), 2 mM L-γλουταμίνης (G7513, Sigma), 1% αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (P4333, Sigma) και 0,5% w/v plasmocin (ANT-MPP, InvivoGen, Toulouse, France) σε επωαστήρα με 5% CO₂. Η αλλαγή του θρεπτικού μέσου γινόταν κάθε 2 μέρες, αφού προηγούταν μια πλύση με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline). Προκειμένου να γίνει συγχρονισμός των κυττάρων, αυτά υποβλήθηκαν σε στέρηση του ορού για ένα εικοσιτετράωρο με τη χρήση 0,5% FBS-RPMI.

6.2 Επώαση των κυττάρων με φάρμακα

Στα κύτταρα στα οποία έγινε συγχρονισμός με 0,5% FBS-RPMI προστέθηκαν 24 ώρες πριν την έναρξη των πειραμάτων τα φάρμακα τα οποία μελετήθηκαν. Τα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήτανθειικό αμμώνιο (AS) σε συγκέντρωση 30mM, (A4915-500G, Sigma), ένυδρη χλωράλη (CH) σε συγκέντρωση 4mM (15307-500G-R, Sigma) και χλωριούχο λίθιο (LC) σε συγκέντρωση 50mM.

6.3 Δοκιμή βιωσιμότητας κυττάρων

Για τις δοκιμασίες βιωσιμότητας, $5 \cdot 10^4$ κύτταρα/mL τοποθετήθηκαν σε μέσο 0,5% FBS-RPMI για 24 ώρες σε πλάκες με 96 βοθρία, στα οποία είχε προηγουμένως πραγματοποιηθεί επίστρωση με φιμπρονεκτίνη (FN). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν στα βοθρία για 48 ώρες μαζί με το θρεπτικό υλικό 10% FBS-RPMI και τα κατάλληλα φάρμακα που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Μετά το πέρας των 48 ωρών, στα κύτταρα έγινε πλύση με PBS και ακολούθησε μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΐδη PFA. Έπειτα, χρωματίστηκαν με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες και ακολούθησε πλύση σε τρεχούμενο νερό βρύσης. Τέλος, στις πλάκες προστέθηκε 10% οξικό οξύ για να γίνει αποχρωματισμός τους έπειτα από ολονύκτια αποξήρανση. Την επόμενη μέρα έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 570nm.

6.4 Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης

Πριν την έναρξη των πειραμάτων τα κύτταρα συγχρονίστηκαν σε τρυβλία 60mm για 24 ώρες. Η κυτταρική προσκόλληση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες με 96 βοθρία στα οποία είχε γίνει επίστρωση με FN. Στο κάθε πηγάδι τοποθετήθηκαν $2 \cdot 10^4$ κύτταρα σε 100μl είτε θρεπτικού 10% FBS-RPMI ή σε θρεπτικό μαζί με ένα από τα τρία φάρμακα

που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα κύτταρα παρέμειναν εντός του επωαστήρα για 90 λεπτά για να προσκολληθούν και τα υπόλοιπα απομακρύνθηκαν με τρεις πλύσεις με θερμό PBS. Τα προσκολλημένα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA και στη συνέχεια προστέθηκε κρυσταλλικό ιώδες συγκέντρωσης 0,5% για 10 λεπτά και αφού έγινε ξέπλυμα της χρωστικής με άφθονο τρεχούμενο νερό βρύσης, αφέθηκαν για να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Έπειτα, προστέθηκε οξικό οξύ προκειμένου να γίνει αποχρωματισμός και, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

6.5 Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης

Η δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης πραγματοποιήθηκε σε πλάκες με 48 ή 96 βοθρία στα οποία είχε προηγηθεί επίστρωση με FN. Στην αρχή έγινε καλλιέργεια των κυττάρων μέχρι πλήρη κάλυψη της επιφάνειας του βοθρίου από 10% FBS-RPMI και ακολούθησε ο συγχρονισμός των κυττάρων με 0,5% FBS-RPMI για 24 ώρες. Η μονοστιβάδα που είχε σχηματιστεί, χαράχθηκε με μια ευθεία γραμμή με ένα πλαστικό ρύγχος 500μm και στη συνέχεια ακολούθησε πλύση με θερμό PBS και την κατάλληλη αλλαγή θρεπτικού που περιλάμβανε είτε μόνο το θρεπτικό είτε το θρεπτικό μαζί με AS, CH ή LC σε συγκέντρωση 50mM. Τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση x 100. Ακολούθησε επώαση των πλακών για 6 ώρες εντός του επωαστήρα και έπειτα έγινε ξανά λήψη φωτογραφιών. Η περιοχή του τραύματος υπολογίστηκε με το ImageJ. Προκειμένου να γίνει σύγκριση του αρχικού και του τελικού μεγέθους της πληγής, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μετανάστευσης (MI), όπου MI ισούται με $(A_0 - A_6) / A_0$. Το A_0 μετρήθηκε μόλις έγινε η χάραξη της μονοστοιβάδας, ενώ το A_6 μετρήθηκε μετά το πέρας των 6 ωρών.

6.6 Δοκιμή σχηματισμού σφαιροειδών σε 3D καλλιέργειες:

Τα σφαιροειδή δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της «κρεμασμένης σταγόνας». 50 συγχρονισμένα κύτταρα σε 25μl θρεπτικού μέσου 10% FBS-RPMI, χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό σφαιροειδών, τα οποία αναδεύθηκαν με 250 ng/mL FN. Σε κάποια από τα εναιωρήματα προστέθηκαν AS, CH ή LC. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα καπάκι από αποστειρωμένο τρυβλίο σε όγκο 25 μl. Στον πάτο του τρυβλίου τοποθετήθηκαν 2 mL αποστειρωμένου PBS. Τα καπάκια στα οποία είχαν σχηματιστεί τα σφαιροειδή αναποδογυρίστηκαν προσεκτικά και το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε επωαστήρα CO₂ για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών το τρυβλίο ξαναοιχθηκε και παρέμεινε ακίνητο για 5-15 λεπτά. Έπειτα έγινε φωτογράφιση των σφαιροειδών και μέτρηση της περιμέτρου μέσω του λογισμικού ImageJ.

6.7 Δοκιμασία διήθησης σφαιροειδούς σε 3D καλλιέργειες

Τα σφαιροειδή σχηματίστηκαν από καλλιέργεια 2000 κυττάρων/ ml θρεπτικού 10% FBS-RPMI με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθησε επίστρωση μίγματος 400μg/ml κολλαγόνου μαζί με θρεπτικό ή ένα από τα φάρμακα που αναφέρθηκαν προηγουμένως πάνω από τα σφαιροειδή και έγινε καλλιέργεια για 48 ώρες. Στο τέλος τα σφαιροειδή μέσα στο κολλαγόνο απεικονίστηκαν και έγινε μέτρηση των περιμέτρων τους με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

6.8 Δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου

Για τα συγκεκριμένα πειράματα έγινε χρήση κυττάρων τα οποία συγχρονίστηκαν μέσω καλλιέργειας απουσία θρεπτικού για 24 ώρες και όλα τα αντιδραστήρια διατηρήθηκαν σε πάγο. Το κολλαγόνο, το οποίο είχε συγκέντρωση 1,2 mg/mL, μετατράπηκε σε ουδέτερο με προσθήκη 0,5M NaOH και 1×10^6 . Τα κύτταρα ενσωματώθηκαν σε όγκο 0,6mL σε πλάκες με 24 βοθρία. Σε ορισμένα μείγματα έγινε και προσθήκη φαρμάκων

σε διπλάσια συγκέντρωση. Στη συνέχεια δόθηκε ο χρόνος των 30 λεπτών στα πηκτώματα για να πολυμεριστούν και ακολούθησε προσθήκη 0.6mL θρεπτικού 10% FBS-RPMI. Κατόπιν, τα πηκτώματα αφέθηκαν για να συσταλούν για ένα εικοσιτετράωρο. Στο τελικό στάδιο, οι πλάκες σαρώθηκαν και η περιοχή που καταλάμβανε η κάθε γέλη μετρήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

6.9 Στατιστική ανάλυση

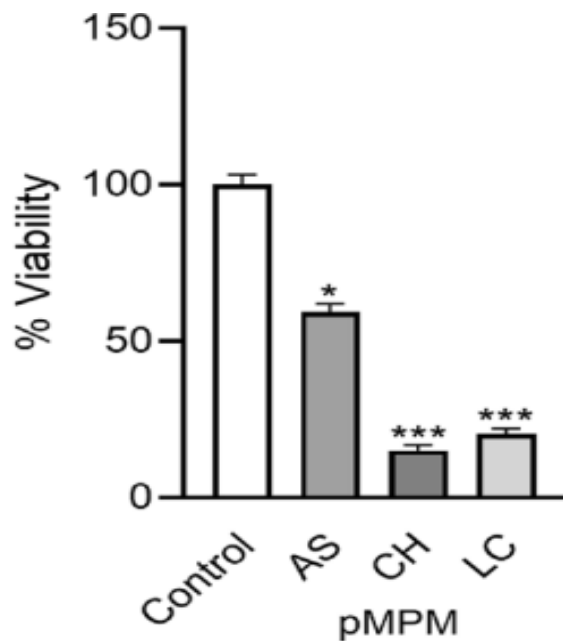
Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 φορές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Prism 9.0 για Mac (San Diego, CA, USA). Η κανονικότητα των δεδομένων αξιολογήθηκε με τη δοκιμή κανονικότητας D'Agostino & Pearson. Οι συγκρίσεις των δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με One-Way ANOVA για τα παραμετρικά δεδομένα και με Kruskal-Wallis test για τα μη-παραμετρικά δεδομένα. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. Τα αποτελέσματα που είχαν $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

7. Αποτελέσματα

7.1 Η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε σημαντικά μετά την χορήγηση όλων των φαρμάκων.

Με τη δοκιμασία της κυτταρικής βιωσιμότητας μελετήθηκε η ικανότητα των κυττάρων pMPM να επιβιώνουν όταν αναπτύσσονταν παρουσία των φαρμάκων AS, CH και LC. Για να γίνει η σύγκριση κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10% FBS-RPMI χρησιμοποιήθηκαν ως Control και η βιωσιμότητα τους τέθηκε στο 100%. Τα κύτταρα pMPM παρουσίασαν σημαντικό ποσοστό μείωσης της κυτταρικής τους βιωσιμότητας και με τα τρία φάρμακα. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα Control είχαν

ποσοστό επιβίωσης $100.0 \pm 3.18\%$, ενώ σε όσα χορηγήθηκε AS είχαν ποσοστά επιβίωσης $59.28 \pm 2.65\%$ ($p < 0.05\%$), όσα καλλιεργήθηκαν παρουσία είχαν CH $15.07 \pm 1.73\%$ ($p < 0.001$) και τέλος τα κύτταρα παρουσία LC είχαν ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης $20.3 \pm 1.71\%$ ($p < 0.001$) αντίστοιχα (Διάγραμμα 1).



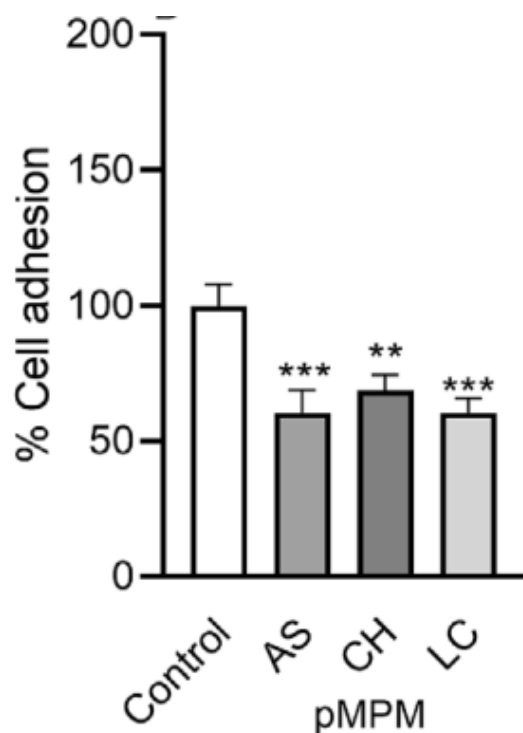
Διάγραμμα 1. Η επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του PC χρησιμοποιώντας θεικό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και επιμήκυνση της PC από χλωριούχο λίθιο (LC) στην κυτταρική βιωσιμότητα. Η μέση κυτταρική βιωσιμότητα $\pm$ SEM των pMPM χωρίς ή με τη χρήση φαρμάκων που εκφράζεται σε % ποσοστό σε σχέση με τα control κύτταρα n=18

* $p < 0.05\%$, και *** $p < 0.001\%$ σε σύγκριση με τα control.

7.2 Η κυτταρική προσκόλληση μειώθηκε σημαντικά στα pMPM κύτταρα

Με τη δοκιμασία της κυτταρικής προσκόλλησης μελετήθηκε η ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται σε μια επιφάνεια όταν αναπτύσσονται παρουσία των φαρμάκων AS, CH και LC. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10% FBS-RPMI ως control και η κυτταρική τους

προσκόλληση τέθηκε στο 100%. Για να προκύψουν τα αποτελέσματα έγινε σύγκριση ανάμεσα στα αποτελέσματα της κυτταρικής προσκόλλησης των κυττάρων που αναπτύχθηκαν μόνο σε θρεπτικό μέσο με αυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία φαρμάκων. Στα κύτταρα pMPM, η μέση κυτταρική προσκόλληση μειώθηκε παρουσία και των τριών φαρμάκων. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό κυτταρικής προσκόλλησης των κυττάρων control ήταν $100.0 \pm 7.9\%$, ενώ των κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία του AS ήταν 60.49 ± 8.4 ($p < 0.001$). Παράλληλα τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε CH είχαν τιμή κυτταρικής προσκόλλησης ίση με $68.78 \pm 5.8 \%$ ($p < 0.01$) και τέλος στα κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν παρουσία LC η κυτταρική προσκόλληση ήταν ίση με $60.36 \pm 5.52\%$ ($p < 0.001$) (**Διάγραμμα 2**).



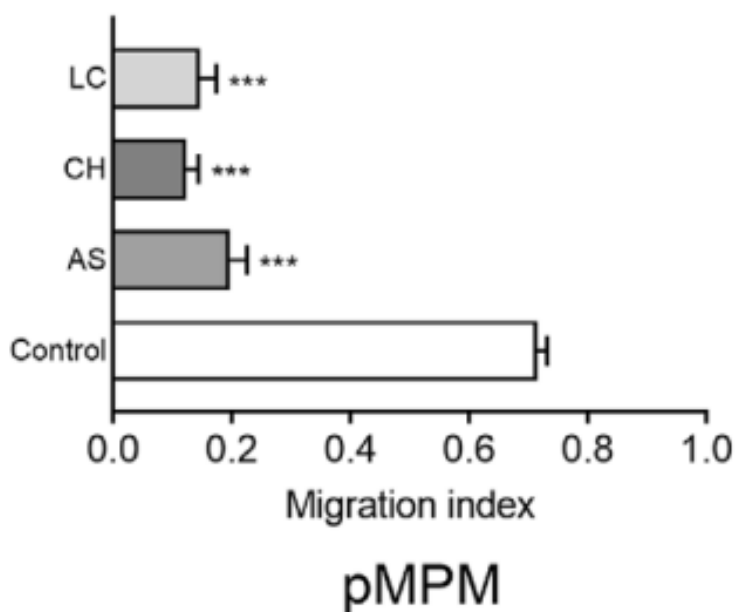
Διάγραμμα 2. Η επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του PC χρησιμοποιώντας θειικό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και επιμήκυνση του PC από χλωριούχο λίθιο (LC) στην κυτταρική προσκόλληση. Η μέση κυτταρική προσκόλληση $\pm$ SEM στα pMPM κύτταρα χωρίς

ή με τη χρήση φαρμάκων που εκφράζεται σε % ποσοστό σε σχέση με τα control. n= 11-12

p < 0.01 και *p < 0.001 σε σύγκριση με τα control.

7.3 Η κυτταρική μετανάστευση μειώθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση όλων των φαρμάκων

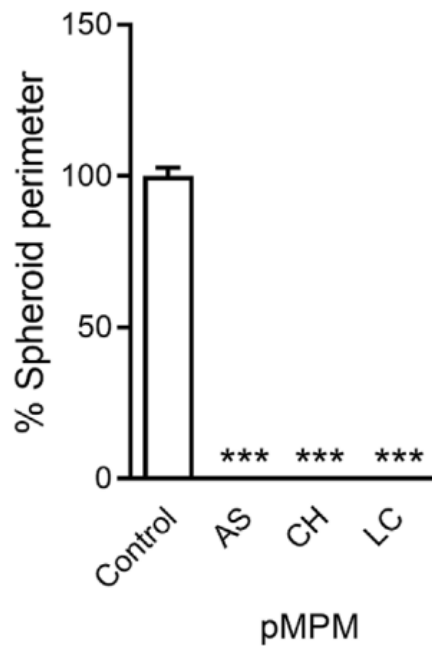
Η δοκιμασία της κυτταρικής μετανάστευσης γίνεται προκειμένου να ελεγχθεί πως επηρεάζεται η ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν προκειμένου να επουλώσουν μια πληγή έπειτα από τη χορήγηση των AS, AC και LC. Και σε αυτή τη δοκιμασία, κύτταρα που αναπτύχθηκαν μόνο παρουσία θρεπτικού μέσου 10% FBS-RPMI χρησιμοποιήθηκαν ως control και θεωρήθηκε αυτόματα ότι η κυτταρική μετανάστευση είναι 100% για να γίνει η σύγκριση. Στα κύτταρα pMPM όλα τα φάρμακα μείωσαν τον MI σε σχέση με τα κύτταρα control που ήταν 0.71 ± 0.01 . Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία AS εμφάνισαν MI 0.19 ± 0.02 ($p < 0.001$), όσα αναπτύχθηκαν με CH είχαν MI ίσο με 0.12 ± 0.02 ($p < 0.001$) και τέλος τα κύτταρα που στο θρεπτικό τους μέσο υπήρχε LC παρουσίασαν MI ίσο με 0.14 ± 0.02 ($p < 0.001$) (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Η επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του PC χρησιμοποιώντας θεικό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και επιμήκυνση του PC από χλωριούχο λίθιο (LC) στην κυτταρική μετανάστευση. Η μέση κυτταρική μετανάστευση $\pm$ SEM στα pMPM κύτταρα χωρίς ή με τη χρήση φαρμάκων που εκφράζεται σε % ποσοστό σε σχέση με τα control. n= 18 ***p < 0.001 σε σύγκριση με τα control.

7.4 Ο σχηματισμός σφαιροειδών μειώθηκε σημαντικά με χορήγηση φαρμάκων που παρεμποδίζουν τον πρωτεύοντα κροσσό

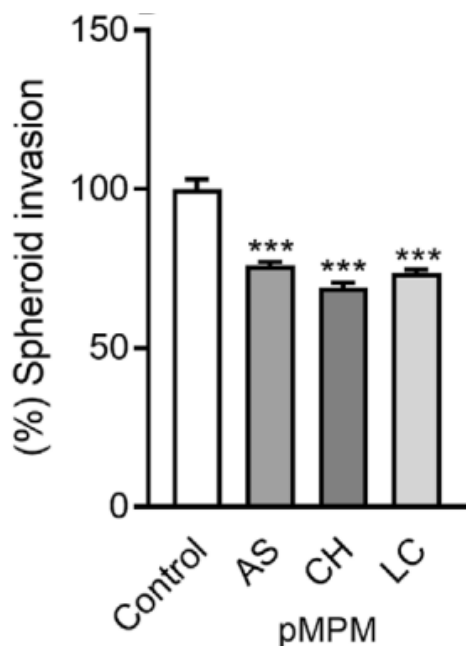
Ο σχηματισμός των σφαιροειδών έγινε με τη μέθοδο της «κρεμασμένης σταγόνας» σε καλλιέργεια με θρεπτικό που περιλάμβανε και τα τρία φάρμακα. Προκειμένου να γίνει σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα control που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο 10% FBS-RPMI, στα οποία θεωρήθηκε αυθόρμητα ότι η περίμετρο των σφαιροειδών είναι 100%. Στα κύτταρα pMPM η μέση περίμετρος των σφαιροειδών εξαλείφθηκε τελείως κατά τη χορήγηση των φαρμάκων AS, CH και LC. Δηλαδή, ενώ στα κύτταρα control η περίμετρος ήταν $100 \pm 2.83\%$ σε όλα τα υπόλοιπα κύτταρα ήταν 0% (p < 0.001) (**Διάγραμμα 4**).



Διάγραμμα 4. Η επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του PC χρησιμοποιώντας θεικό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και επιμήκυνση του PC από χλωριούχο λίθιο (LC) στο σχηματισμό σφαιροειδών. Η μέση περίμετρος των σφαιροειδών $\pm$ SEM στα pMPM κύτταρα χωρίς ή με τη χρήση φαρμάκων που εκφράζεται σε % ποσοστό σε σχέση με τα control. n= 36 ***p < 0.001 σε σύγκριση με τα control.

7.5 Η δοκιμασία διήθησης των κυτταρικών όγκων μειώθηκε σημαντικά στα κύτταρα pMPM από τα φάρμακα που τροποποιούν των πρωτεΐοντα κροσσό.

Τα pMPM σφαιροειδή ενσωματώθηκαν σε κολλαγόνο για να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των AS, CH και LC κατά τη διάρκεια της εισβολής μέσα σε μήτρες γέλης κολλαγόνου. Η μέση περίμετρος της εισβολής στο κολλαγόνο με 10% FBS-RPMI τέθηκε στο 100% και τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως control. Τα κύτταρα pMPM μείωσαν την διήθησή τους μειώνοντας την περίμετρο παρουσία AS στο $75.95 \pm 1.0\%$ παρουσία CH στο $68.92 \pm 1.57\%$ και παρουσία του LC στο $73.75 \pm 1.16\%$ σε σύγκριση με το control που ήταν στο $100.0 \pm 2.95\%$ (p < 0.001) (Διάγραμμα 5).

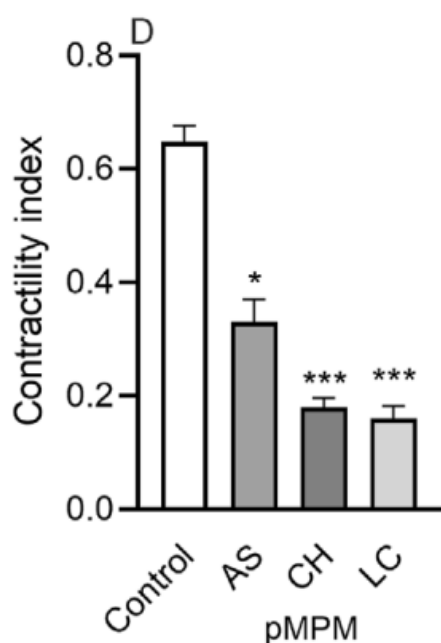


Διάγραμμα 5. Η επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του PC χρησιμοποιώντας θεικό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και επιμήκυνση του PC από χλωριούχο λίθιο (LC) στην εισβολή κυτταρικών όγκων. Η μέση περίμετρος της σφαιροειδούς εισβολής $\pm$ SEM στα pMPM χωρίς ή με τη χρήση φαρμάκων που εκφράζεται σε % ποσοστό σε σχέση με τα control. n= 29-41 ***p < 0.001 σε σύγκριση με τα control.

7.6 Η δημιουργία γέλης κολλαγόνου μειώθηκε σημαντικά στα κύτταρα pMPM με τη χρήση των φαρμάκων AS, CH και LC.

Αρχικά, τα μεσοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του μεσοθηλιώματος οργάνωσαν και δημιούργησαν τις γέλες κολλαγόνου σταδιακά. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν μελέτες μετάβασης μεσοθηλιακού σε μεσεγχυματικό κύτταρο (MMT) με και χωρίς φάρμακα και οι τελικές περιοχές του τζελ υπολογίστηκαν ως μια μέτρηση του 3D MMT. Στα κύτταρα pMPM ο δείκτης συσταλτικότητας των control ήταν 0.65 ± 0.02 . Ταυτόχρονα, ο δείκτης ήταν 0.33 ± 0.04 ($p < 0.05$) σε όσα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν παρουσία AS, 0.18 ± 0.01 σε όσα κύτταρα αναπτύχθηκαν παρουσία CH και τέλος ο

δείκτης συσταλτικότητας είχε τιμή 0.16 ± 0.02 ($p < 0.001$) σε όσα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε LC (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6. Η επίδραση της φαρμακολογικής εξασθένησης του PC χρησιμοποιώντας θειικό αμμώνιο (AS) ή ένυδρη χλωράλη (CH) και επιμήκυνση της PC από χλωριούχο λίθιο (LC) στον σχηματισμό γέλης κολλαγόνου. Η μέση τιμή της περιοχής της γέλης $\pm$ SEM στα pMPM κύτταρα χωρίς ή με τη χρήση φαρμάκων που εκφράζεται σε % ποσοστό σε σχέση με τα control. $n=15$ * $p < 0.05\%$, ** και $p < 0.001\%$ σε σύγκριση με τα control.

8. Συζήτηση

Ο πρωτεύοντας κροσσός συμμετέχει σε διαδικασίες που θεωρούνται ορόσημα του καρκίνου όπως η μεταβολικός επαναπρογραμματισμός, η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, η κυτταρική διήθηση και η μετάσταση ανάλογα βέβαια και με τον καρκινικό τύπο. (19) Το κακόηθες μεσοθηλιώμα του υπεζωκότα είναι ένας τύπος καρκίνου που έχει ερευνηθεί ελάχιστα υπό το πρίσμα της λειτουργίας του πρωτεύοντα κροσσού. Μόνο μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε βιοψίες ασθενών με κακόηθες μεσοθηλιώμα

του υπεζωκότα υπήρχε ετερογένεια στην έκφραση του πρωτεύοντος κροσσού. Επιπλέον, τα καλοήγη κύτταρα συγκρατούν τον πρωτεύοντα κροσσό ενώ στα κακοήγη η παρουσία/έκφρασή του ποικίλει. (34)

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι η φαρμακολογική εξασθένηση ή επιμήκυνση του πρωτεύοντος κροσσού επηρεάζει λειτουργικά κυτταρικούς φαινοτύπους σε 2D και 3D όπως την κυτταρική βιωσιμότητα, μετανάστευση, τον σχηματισμό σφαιροειδών και τη συστολή γέλης κολλαγόνου σε πρωτογενή MPM κύτταρα. Επιπρόσθετα, η χορήγηση AS, CH και LC μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα, την κυτταρική μετανάστευση, την κυτταρική προσκόλληση, το σχηματισμό και την διήθηση σφαιροειδών και το σχηματισμό γέλης κολλαγόνου σε σύγκριση με τα control που καλλιεργήθηκαν απουσία φαρμάκου. (15)

Η διαταραχή που προκαλείται στον πρωτεύοντα κροσσό είτε με αυτοτομή είτε με επιμήκυνση στα πλαίσια της κυτταρικής επιβίωσης και θανάτου είναι ένα ζήτημα έντονης έρευνας καθώς φαίνεται ότι είναι πολύπλοκο και εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. (35) Ο πρωτεύοντας κροσσός είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τον κυτταρικό κύκλο. Ωστόσο επηρεάζει και άλλες διαδικασίες όπως τον ρυθμό της κυτταρικής απόπτωσης, προστατεύει από τη φλεγμονή που επάγεται από τη νεκρόπτωση, καθιστά το κύτταρο πιο επιρρεπές στην αυτοφαγία, αλλά χρειάζεται περαιτέρω μελέτη προκειμένου να γίνει πλήρως αντιληπτός ο ρόλος του στην κυτταρική επιβίωση. (35–37) Σχετικά με την φαρμακολογική αναστολή του σχηματισμού του πρωτεύοντος κροσσού, μειώθηκε η κυτταρική βιωσιμότητα στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα της ωχράς κηλίδας του αμφιβλίστροειδούς. (38) Στα πειράματά μας βρήκαμε ότι η αυτοτομή του PC από τα φάρμακα AS και CH και η επιμήκυνση του από το LC μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων. Αυτό υποδεικνύει ότι στα μεσοθηλιακά κύτταρα ο άθικτος πρωτεύοντας κροσσός είναι απαραίτητος για την επιβίωση.

Σχετικά με την κυτταρική προσκόλληση, η οποία είναι η ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται σε υπόστρωμα εξωκυττάριας μήτρας, η διαταραχή του πρωτεύοντος κροσσού προκάλεσε μείωση στα πρωτογενή MPM. Μπορεί να θεωρηθεί ότι η ποικιλία στην κυτταρική προσκόλληση στα MPM κύτταρα είναι αναμενόμενη στο πλαίσιο του πρωτεύοντος κροσσού δεδομένου ότι υπάρχει μια παρεκκλίνουσα σηματοδότηση ανάμεσα στον πρωτεύοντα κροσσό και την εξωκυττάρια μήτρα.(39,40) Η κινάση εστιασκής προσκόλλησης (FAK) είναι ένα κεντρικό μόριο που ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση μέσω μηχανοευαισθησίας και την ίδια στιγμή ο πρωτεύοντας κροσσός επίσης συμμετέχει στην μηχανοευαισθησία. (39,41,42) Εξωκυτταρικά σήματα είναι επίσης σημαντικό να συμπεριληφθούν καθώς το υπεζωκοτικό υγρό που είναι το φυσικό περιβάλλον του μεσοθελιώματος και των MPM κυττάρων μπορεί σημαντικά να τροποποιήσει την κυτταρική συμπεριφορά όσον αφορά την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. (43,44) Ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στην κυτταρική προσκόλληση στα MPM χρειάζεται περεταίρω έρευνα.

Η επίδραση των φαρμάκων που τροποποιούν τον πρωτεύοντα κροσσό στη κυτταρική μετανάστευση με τη δοκιμασία επούλωσης πληγών ήταν σταθερή σε όλα τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν και οδήγησε στη μείωση της μεταναστευτικής τους ικανότητας. Ο πρωτεύοντας κροσσός αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια μήτρα, συντονίζει τη σηματοδότηση Wnt και διαμορφώνει τις κυτταροσκελετικές αλλαγές που επηρεάζουν τόσο τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου όσο και την κυτταρική μετανάστευση.(45–47) Η διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης μπορεί να ανασταλεί μέσω τροποποιήσεων των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας και εξασθένησης λόγω αλληλεπιδράσεων με τροποποιημένες μέσω οξειδωτικού στρες πρωτεϊνών. (48) Σε άλλες μελέτες έχει τονιστεί ο ρόλος της σύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας στην κυτταρική μετανάστευση και πώς αυτό μπορεί επίσης να αλλάξει την

απόκριση στα φάρμακα. (40,49,50) Η διαταραχή του πρωτεύοντα κροσσού είτε σε δομικό είτε σε λειτουργικό επίπεδο έχει ήδη αποδειχθεί ότι καταστέλλει τη μετανάστευση των κυττάρων και την επούλωση των πληγών. (51)

Η ανασύνθεση ενός όγκου όπως στα σφαιροειδή ως εργαλείο στην έρευνα MPM είχε διερευνηθεί προηγουμένως με βάση στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης σε 2D έναντι 3D ουσιαστικά διαφέρουν. (52,53) Επιπλέον, στους κακοήθεις ιστούς η αρχιτεκτονική είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική συμπεριφορά και την ανταπόκριση των κυττάρων στη θεραπεία. (54,55) Μέσω της *in vitro* δοκιμασίας σχηματισμού σφαιροειδών 3D, οι φαινότυποι της κυτταρικής προσκόλλησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αξιολογούνται ταυτόχρονα σε μια διάταξη που μοιάζει με τα σφαιροειδή που βρίσκονται στα υπεζωκοτικά υγρά ασθενών με MPM. (56) Η προσθήκη φαρμάκων τροποποίησης του πρωτεύοντος κροσσού στην κυτταρική καλλιέργεια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τρισδιάστατων σφαιροειδών είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές μειώσεις στην ανάπτυξη τους. Στην περίπτωση των κυττάρων pMPM δεν σχηματίστηκαν σφαιροειδή σε καμία από τις θεραπείες. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι ρυθμιστές του πρωτεύοντα κροσσού θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψη για την αναστολή εμφάνισης νέων εστιών όγκου λόγω εμφύτευσης κακόηθους σφαιροειδούς εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Επί του παρόντος δεν υπάρχουν μελέτες για το ρόλο του πρωτεύοντος κροσσού σε τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες MPM ή κακοήθων κυττάρων γενικά. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα που λάβαμε στην τρισδιάστατη δοκιμασία εισβολής σφαιροειδών σε γέλη κολλαγόνου επιβεβαιώνουν ότι οι ρυθμιστές του πρωτεύοντος κροσσού μείωσαν σημαντικά το δυναμικό εισβολής των πρωτογενή κύτταρα MPM. Αυτό δικαιολογεί ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για φάρμακα που

ρυθμίζουν τα MPM και τον πρωτεύοντα κροσσό μόνα τους ή σε συνδυασμό με τυπική χημειοθεραπεία που έχει επικυρωθεί *in vitro*. (53,57)

Ένας άλλος τρισδιάστατος φαινότυπος που αξιολογήθηκε κατά τη μελέτη του ρόλου του πρωτεύοντος κροσσού στα MPM ήταν η δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου που εκτιμά το μεσεγχυματικό δυναμικό των κακοήθων κυττάρων σε σύγκριση με τα καλοήγη ομόλογα τους, δεδομένου ότι η μετάβαση από μεσοθηλιακό σε μεσεγχυματικό (MMT) είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό των MPM. (57–59) Αυτή η ανάλυση έχει καθιερωθεί σε μοντέλα MPM και έχει δείξει ότι τα τυπικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Cisplatin και Pemetrexed) αναστέλλουν το μεσεγχυματικό δυναμικό. (53) Στα πειράματα φάνηκε ότι και με τις τρεις διαφορετικές ουσίες η διαταραχή του πρωτεύοντα κροσσού οδηγεί σε σημαντική μείωση της διαδικασίας MMT.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην συγκεκριμένη εργασία δείχνουν ότι ο πρωτεύοντας κροσσός διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση πολλών φαινοτύπων που είναι κρίσιμοι για την ανάπτυξη και την εξάπλωση του MPM. Επιπρόσθετα, υποδηλώνουν ότι η φαρμακολογική χειραγώγηση του πρωτεύοντος κροσσού θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσθήκη στο οπλοστάσιό κατά του MPM. Μέχρι στιγμής υπάρχει συμφωνία στο ότι η χρήση τρισδιάστατων καλλιιεργειών και οργανοειδών παρέχει μια ερευνητική ευκαιρία που θα προωθήσει τη μεταφραστική ογκολογική των θωρακικών κακοηθειών, και έτσι θα παρέχονται περισσότερες βιολογικές και κλινικές πληροφορίες από τέτοιες μελέτες. (60,61)

Βιβλιογραφία

1. G. Cooper R. ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ Μια Μοριακή Προσέγγιση 7η Έκδοση. ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Ι. ΜΠΑΣΔΡΑ και ΣΙΑ ΟΕ.; 2017.
2. Wang ZM, Gao XF, Zhang JJ, Chen SL. Primary Cilia and Atherosclerosis. Vol. 12, Frontiers in Physiology. Frontiers Media S.A.; 2021.
3. Bernabé-Rubio M, Alonso MA. Routes and machinery of primary cilium biogenesis. Vol. 74, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2017. p. 4077–95.
4. Youn YH, Han YG. Primary Cilia in Brain Development and Diseases. Vol. 188, American Journal of Pathology. Elsevier Inc.; 2018. p. 11–22.
5. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the primary cilium. Vol. 6, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media S.A.; 2018.
6. Daviest F, Coles GA, Harperf PS, Williams AJ, Evansj C, Cochlinj D. Polycystic Kidney Disease Re-evaluated: A Population-based Study. Vol. 79, Quarterly Journal of Medicine. 1991.
7. Mansini AP, Peixoto E, Thelen KM, Gaspari C, Jin S, Gradilone SA. The cholangiocyte primary cilium in health and disease. Vol. 1864, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. Elsevier B.V.; 2018. p. 1245–53.
8. Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Vol. 4, Cilia. BioMed Central Ltd.; 2015.
9. Kasahara K, Inagaki M. Primary ciliary signaling: links with the cell cycle. Vol. 31, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2021. p. 954–64.
10. Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary cilium-dependent signaling mechanisms. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2017.
11. Lee KH. Involvement of Wnt signaling in primary cilia assembly and disassembly. Vol. 287, FEBS Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 5027–38.
12. Joukov V, De Nicolo A. The centrosome and the primary cilium: The Yin and Yang of a hybrid organelle. Vol. 8, Cells. MDPI; 2019.
13. Raica M, Cimpean AM. Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. Vol. 3, Pharmaceuticals. MDPI AG; 2010. p. 572–99.
14. Stoufflet J, Caillé I. The Primary Cilium and Neuronal Migration. Vol. 11, Cells. MDPI; 2022.
15. Jagirdar RM, Pitaraki E, Kotsiou OS, Rouka E, Sinis SI, Varsamas C, et al. Effects of pharmacological primary cilium disturbance in the context of in vitro 2D

and 3D malignant pleura mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 Apr 30;654:128–35.

16. Ávalos Y, Peña-Oyarzun D, Budini M, Morselli E, Criollo A. New Roles of the Primary Cilium in Autophagy. Vol. 2017, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2017.
17. Figure [Internet]. [cited 2023 Oct 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9482113/>
18. Fabbri L, Bost F, Mazure NM. Primary cilium in cancer hallmarks. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
19. Fabbri L, Bost F, Mazure NM. Primary cilium in cancer hallmarks. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
20. Pala R, Jamal M, Alshammari Q, Nauli SM. The roles of primary cilia in cardiovascular diseases. Vol. 7, *Cells*. MDPI; 2018.
21. Cao HT, Liu MM, Shao QN, Jiao ZY. The role of the primary cilium in cancer. Vol. 68, *Neoplasma*. NLM (Medline); 2021. p. 899–906.
22. Mutsaers SE. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. Vol. 7, *Respirology*. 2002. p. 171–91.
23. Mutsaers SE. The mesothelial cell. Vol. 36, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2004. p. 9–16.
24. Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A. Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney Int*. 2000;57(2):476–86.
25. Robinson BWS, Lake RA. Advances in Malignant Mesothelioma [Internet]. Vol. 15, *n engl j med*. 2005. Available from: www.nejm.org
26. 3. Asbestos and its lethal legacy.
27. F Pacini, A Vivaldi, M Santoro, M Fedele, A Fusco, C Romei, et al. Simian virus 40-like DNA sequences in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 1998 Feb;16:665–9.
28. Jeffrey G. AUIt 2 Richard W. Cole, Cynthia G. Jensen, Lawrence C. W. Jensen, Lori A. Bachert, and Cozily L Rieder. Behavior of Crocidolite Asbestos during Mitosis in Living Vertebrate Lung Epithelial Cells1. *CANCERRESEARCH*55. 1995 Feb 15;792–8.
29. Okayasu R TSYSHTUR. Asbestos and DNA Double Strand Breaks 1. 1999;
30. Zanella CL PJTTMB. . Asbestos Causes Stimulation of the Extracellular Signal-regulated Kinase 1 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade after Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Recepto. *Physiology & Biophysics*. 1996;

31. European Respiratory Society. Effect of primary cilium-associated genes expression on the survival of mesothelioma patients_ In silico investigation of TCGA data _ .
32. Vavougiou GD SEHCBGKLMP et al. Computational genomic analysis of PARK7 interactome reveals high BBS1 gene expression as a prognostic factor favoring survival in malignant pleural mesothelioma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;L677-86.
33. Scherpereel A, Wallyn F, Albelda SM, Munck C. Novel therapies for malignant pleural mesothelioma. Vol. 19, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2018. p. e161–72.
34. Barbarino M, Bottaro M, Spagnoletti L, de Santi MM, Guazzo R, Defraia C, et al. Analysis of Primary Cilium Expression and Hedgehog Pathway Activation in Mesothelioma Throws Back Its Complex Biology. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 1;14(21).
35. Pfirrmann T, Gerhardt C. Life-Saver or Undertaker: The Relationship between Primary Cilia and Cell Death in Vertebrate Embryonic Development. Vol. 10, *Journal of Developmental Biology*. MDPI; 2022.
36. Wang WL, Zheng XL, Li QS, Liu WY, Hu LS, Sha HC, et al. The effect of aging on VEGF/VEGFR2 signal pathway genes expression in rat liver sinusoidal endothelial cell. *Mol Cell Biochem*. 2021 Jan 1;476(1):269–77.
37. Kieckhöfer E, Slaats GG, Ebert LK, Albert MC, Dafinger C, Kashkar H, et al. Primary cilia suppress Ripk3-mediated necroptosis. *Cell Death Discov*. 2022 Dec 1;8(1).
38. Chen TY, Lien WC, Cheng HL, Kuan TS, Sheu SY, Wang CY. Chloroquine inhibits human retina pigmented epithelial cell growth and microtubule nucleation by downregulating p150 glued. *J Cell Physiol*. 2019 Jul 1;234(7):10445–57.
39. Seeger-Nukpezah T, Golemis EA. The extracellular matrix and ciliary signaling. Vol. 24, *Current Opinion in Cell Biology*. 2012. p. 652–61.
40. Jagirdar RM, Apostolidou E, Molyvdas PA, Gourgoulisanis KI, Hatzoglou C, Zarogiannis SG. Influence of AQP1 on cell adhesion, migration, and tumor sphere formation in malignant pleural mesothelioma is substratum-and histological-type dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2016;310:489–95. Available from: www.ajplung.org
41. Fry AM, Leaper MJ, Bayliss R. The primary cilium: Guardian of organ development and homeostasis. Vol. 10, *Organogenesis*. Landes Bioscience; 2014. p. 62–8.
42. Zhou J, Aponte-Santamaría C, Sturm S, Bullerjahn JT, Bronowska A, Gräter F. Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing. *PLoS Comput Biol*. 2015 Nov 1;11(11).

43. Kotsiou OS, Jagirdar RM, Papazoglou ED, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. HMGB1/sRAGE levels differ significantly between transudates and exudates. *Cytokine*. 2021 May 1;141.
44. Christensen ST, Pedersen SF, Satir P, Veland IR, Schneider L. Chapter 10 The Primary Cilium Coordinates Signaling Pathways in Cell Cycle Control and Migration During Development and Tissue Repair. Vol. 85, *Current Topics in Developmental Biology*. 2008. p. 261–301.
45. Lee MN, Song JH, Oh SH, Tham NT, Kim JW, Yang JW, et al. The primary cilium directs osteopontin-induced migration of mesenchymal stem cells by regulating CD44 signaling and Cdc42 activation. *Stem Cell Res*. 2020 May 1;45.
46. Ezan J, Lasvaux L, Gezer A, Novakovic A, May-Simera H, Belotti E, et al. Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 2013 Sep;15(9):1107–15.
47. Rodríguez-Ribera L, Slattery C, Mc Morrow T, Marcos R, Pastor S. Reactive carbonyl compounds impair wound healing by vimentin collapse and loss of the primary cilium. *Food and Chemical Toxicology*. 2017 Oct 1;108:128–38.
48. Rouka E, Beltsios E, Goundaroulis D, Vavougiou GD, Solenov EI, Hatzoglou C, et al. In silico transcriptomic analysis of wound-healing-associated genes in malignant pleural mesothelioma. *Medicina (Lithuania)*. 2019 Jun 1;55(6).
49. Jagirdar RM, Papazoglou ED, Pitaraki E, Kouliou OA, Rouka E, Giannakou L, et al. Cell and extracellular matrix interaction models in benign mesothelial and malignant pleural mesothelioma cells in 2D and 3D in-vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021 Apr 1;48(4):543–52.
50. Jones TJ, Adapala RK, Geldenhuys WJ, Bursley C, Aboualaiwi WA, Nauli SM, et al. Primary cilia regulates the directional migration and barrier integrity of endothelial cells through the modulation of Hsp27 dependent actin cytoskeletal organization. *J Cell Physiol*. 2012 Jan;227(1):70–6.
51. Kim H, Phung Y, Ho M. Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: An ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. *PLoS One*. 2012 Jun 21;7(6).
52. Papazoglou ED, Jagirdar RM, Kouliou OA, Pitaraki E, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, et al. In vitro characterization of cisplatin and pemetrexed effects in malignant pleural mesothelioma 3d culture phenotypes. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 1;11(10).
53. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: The ultimate regulator of breast epithelial function. Vol. 15, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2003. p. 753–62.
54. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: Tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. Vol. 22, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2006. p. 287–309.

55. Michael CW, King JAC, Hester RB. Confocal Laser Scanning Microscopy and Three-Dimensional Reconstruction of Cell Clusters in Serous Fluids. Vol. 17, Diagn. Cytopathol. Wiley-Liss, Inc; 1997.
56. Gerogianni I, Pitaraki E, Jagirdar RM, Kouliou O, Giannakou L, Giannopoulos S, et al. 2-Deoxy-glucose Enhances the Effect of Cisplatin and Pemetrexed in Reducing Malignant Pleural Mesothelioma Cell Proliferation but Not Spheroid Growth. *Anticancer Res.* 2019;39(7):3809–14.
57. Qi F, Okimoto G, Jube S, Napolitano A, Pass HI, Laczko R, et al. Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF- α signaling. *American Journal of Pathology.* 2013 Nov;183(5):1654–66.
58. Shamseddin M, Obacz J, Garnett MJ, Rintoul RC, Francies HE, Marciniak SJ. Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma. Vol. 76, *Thorax.* BMJ Publishing Group; 2021. p. 1154–62.
59. Turini S, Bergandi L, Gazzano E, Prato M, Aldieri E. Epithelial to mesenchymal transition in human mesothelial cells exposed to asbestos fibers: Role of TGF- β as mediator of malignant mesothelioma development or metastasis via EMT event. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 1;20(1).
60. Memeo L, Canzonieri V, Rizzolio F. Cancer organoids in basic science and translational medicine. Vol. 13, *Cancers.* MDPI AG; 2021.
61. Gao Y, Kruithof-de Julio M, Peng RW, Dorn P. Organoids as a Model for Precision Medicine in Malignant Pleural Mesothelioma: Where Are We Today? Vol. 14, *Cancers.* MDPI; 2022.