



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**« ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ »**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**« Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΡDΚ-1 ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ »**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΠΟΛΥΧΡΟΝΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2023**



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**PHARMACOLOGY LAB**

**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM**

**“HUMAN GENETICS - GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS**

**« STUDY OF THE ROLE OF PDK-1 IN PANCREATIC CANCER »**

**ATHANASIOS POLYCHRONIS**

**POSTGRADUATE STUDENT**

**BIOCHEMIST-BIOTECHNOLOGIST**

**LARISA, 2023**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1) **ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**, Καθηγητής Φαρμακολογίας,  
Παν/μίου Θεσσαλίας -Επιβλέπων καθηγητής
- 2) **ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής  
Βιολογίας, Παν/μίου Θεσσαλίας
- 3) **ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ**, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής  
Βιολογίας Παν/μίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά για την διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Δήμα Κωνσταντίνο, Καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη δυνατότητα που μου προσέφερε να αποτελέσω μέρος του εργαστηρίου και της εξαιρετικής ερευνητικής του ομάδας.

Επιπροσθέτως, οφείλω να ευχαριστήσω την κυρία Παπαθανασίου Ιωάννα, Επίκουρο Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και την κυρία Τραχανά Βαρβάρα, Επίκουρο Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που είχα την τιμή να αποτελεί το τρίτο μέλος της επιτροπής.

Ακολουθώς, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου της φαρμακολογίας που με στήριζαν και με καθοδηγούσαν καθημερινά κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Αναφέρομαι πρωτίστως στην υποψήφια διδάκτορα, Αλεξοπούλου Δήμητρα η οποία από τη πρώτη στιγμή που αδιάκοπα και γεμάτη χαρά με καθοδηγούσε και επέβλεπε όλα τις πειραματικές διαδικασίες που εκτελούσα. Στη συνέχεια, αναπόσπαστο κομμάτι της ερευνητικής μου εργασίας αποτέλεσε η υποψήφια διδάκτορας, Κουτσογιάννη Φανή η οποία με τις γνώσεις και το ενδιαφέρον της με βοήθησε να εκπληρώσω τους πειραματικούς μου στόχους. Επιπλέον, πολύ χρήσιμη ήταν η βοήθεια του υποψήφιου διδάκτορα, Λαφαζάνη Κωνσταντίνου κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Τελευταίο μέλος αποτέλεσε η προπτυχιακή φοιτήτρια, Μασούρα Χαρίκλεια, με την οποία εκτελούσαμε ταυτόχρονα τις διπλωματικές μας εργασίες και θεωρώ την συνεργασία μας άψογη και την ευχαριστώ πολύ.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους, για την συνεισφορά και την στήριξη τους σε κάθε μου προσπάθεια και απόφαση. Χωρίς αυτούς πολλοί στόχοι μου δεν θα ήταν εύκολο να επιτευχθούν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της Φωσφοϊνισιτιδιο-εξαρτώμενης κινάσης-1 ή αλλιώς PDK-1 στο παγκρεατικό καρκίνο. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που έχει συσχετιστεί με δύο πολύ σημαντικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση: το PI3K/AKT/mTOR και το RAS/MAPK

Οι έως τώρα μελέτες, για την PDK-1 στο εργαστήριο μας, είχαν επικεντρωθεί στην χρήση ειδικών για την PDK-1 φαρμακολογικών αναστολέων (GSK2334470) και τη μελέτη του μηχανισμού δράσης τους στον παγκρεατικό καρκίνο. Αυτή τη φορά, οι έρευνες βασίστηκαν σε μία ενδογενή κυτταρική διεργασία που ονομάζεται παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi) όπου μέσω επιμόλυνσης με ένα ειδικό siRNA για την PDK-1, επιτεύχθηκε η αποσιώπηση της πρωτεΐνης της στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1. Με τον τρόπο αυτό, δύναται να αξιολογηθεί η εμπλοκή αυτής της κινάσης σε κυτταρικές διεργασίες όπως η ικανότητα πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και δημιουργίας αποικιών.

Αρχικά, η επιτυχία της αποσιώπησης της PDK-1 ελέγχθηκε μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot. Έπειτα τα κύτταρα PANC-1 που είχαν επιμολυνθεί με το ειδικό siRNA υποβλήθηκαν σε μία διαδικασία που ονομάζεται κυτταρομετρία ροής για να παρατηρηθούν ενδεχόμενες αλλαγές στον κυτταρικό τους κύκλο. Στη συνέχεια τα επιμολυσμένα κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την δυνατότητα τους να δημιουργούν αποικίες (clonogenic assay) και να μεταναστεύουν (wound healing assay).

Τελικώς, αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας και χαρακτηρίστηκαν ως διαφορούμενα καθώς η αποσιώπηση της PDK-1 φάνηκε να μην επηρεάζει την αναπτυξιακή συμπεριφορά των κυττάρων PANC-1. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με την έως τώρα διεθνή βιβλιογραφία, που έχει συσχετίσει την αναστολή της δράσης της PDK-1, είτε μέσω αποσιώπησης είτε μέσω φαρμακολογικών αναστολέων, με μείωση της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή περαιτέρω και πιο λεπτομερών μελετών στο μέλλον, με σκοπό τη πλήρη κατανόηση του ρόλου της PDK-1 εντός των σηματοδοτικών μονοπατιών της καρκινογένεσης και τη διερεύνηση των εν γένη αλληλοεπιδράσεων που μπορεί να συμβαίνουν μεταξύ αυτών.

*Λέξεις-κλειδιά: PDK-1, PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK, PANC-1, αναστολή PDK-1, αποσιώπηση PDK-1, RNAi, siRNA, Western blot, κυτταρομετρία ροής, clonogenic assay, wound healing assay*

## ***ABSTRACT***

The purpose of this thesis is to study the role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 or PDK-1 in pancreatic cancer. It is a protein that has been associated with two very important pathways of carcinogenesis: PI3K/AKT/mTOR and RAS/MAPK

Until now, studies on PDK-1 in our laboratory have focused on the use of, PDK-1 specific pharmacological inhibitors (for example: GSK2334470), and studying further their mechanism of action in pancreatic cancer. This time, the research was based on an endogenous cellular process called RNA interference (RNAi) and through transfection with a specific siRNA for PDK-1, the silencing of the protein was achieved in PANC-1 pancreatic cancer cells. By this way, it can be assessed the involvement of this kinase in cellular processes such as their ability to proliferate, migrate and form colonies.

First, the success of PDK-1 silencing was checked by Western blotting. PANC-1 cells previously transfected with the specific siRNA were then subjected to a procedure called flow cytometry to observe any changes in their cell cycle. Afterwards the transfected cells were studied for their ability to form colonies (clonogenic assay) and to migrate (wound healing assay).

Finally, the results of each experimental procedure were evaluated and characterized as equivocal because PDK-1 silencing does not appear to affect the growth behavior of PANC-1 cells. This fact is in contrast to the international literature so far, which has associated the inhibition of PDK-1 activity, either through silencing or through pharmacological inhibitors, with a reduction in the ability of cancer cells to proliferate and migrate. Therefore, it is necessary to carry out further and more detailed studies in the future, in order to fully understand the role of PDK-1 within the signaling pathways of carcinogenesis and to elucidate the possible interactions that may occur between them.

*Key words: PDK-1, PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK, PANC-1, inhibition of PDK-1, silencing of PDK-1, RNAi, siRNA, Western blot, flow cytometry, clonogenic assay, wound healing assay*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
<b>1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b> .....	9
<b>1.2 ΟΡΟΣΗΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</b> .....	10
<b>1.3 ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b> .....	11
<i>1.3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΚΡΕΑΤΟΣ</i> .....	11
<i>1.3.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</i> .....	12
<i>1.3.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</i> .....	13
<i>1.3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ</i> .....	16
<i>1.3.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ</i> .....	18
<i>1.3.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ</i> .....	19
<b>1.4 Η PDK-1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ</b> .....	21
<i>1.4.1 ΤΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ PDK-1</i> .....	21
<i>1.4.2 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΡΙ3Κ/PDK-1/AKT/mTOR ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ</i> .....	23
<i>1.4.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙ RAS/MAPK ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ</i> .....	26
<i>1.4.4 ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ PDK-1</i> .....	28
<b>2.ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	32
<b>3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	33
<b>3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b> .....	33
<i>3.1.1 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ PANC-1</i> .....	33
<i>3.1.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ</i> .....	33
<i>3.1.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ</i> .....	34
<i>3.1.4 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ</i> .....	34
<i>3.1.5 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ</i> .....	35
<i>3.1.6 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER &amp; ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</i> .....	35
<i>3.1.7 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</i> .....	37
<i>3.1.8 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</i> .....	37

<b>3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ PDK-1.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN- WESTERN BLOT.....</b>	<b>41</b>
3.3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΛΥΜΑΤΩΝ.....	41
3.3.2 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD : ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ.....	42
3.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	42
3.3.4 ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	44
3.3.5 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF (TRANSFER).....	45
3.3.6 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN- WESTERN BLOT.....	45
<b>3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....</b>	<b>47</b>
3.6.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	47
3.6.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	48
<b>3.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY).....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (Wound Healing assay).....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>53</b>
<b><u>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ PDK-1 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN- WESTERN BLOT.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....</b>	<b>55</b>
4.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ siRNA ΓΙΑ ΤΗΝ PDK-1 ΣΕ 48 & 72 ΩΡΕΣ.....	55
4.4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ siRNA ΓΙΑ ΤΗΝ PDK-1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΙΑΣΤΗΜΑΤΑ.....	57
<b>4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY).....</b>	<b>58</b>
<b>4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (Wound Healing assay).....</b>	<b>60</b>
<b><u>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>.....</b>	<b>62</b>
<b><u>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>.....</b>	<b>67</b>

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

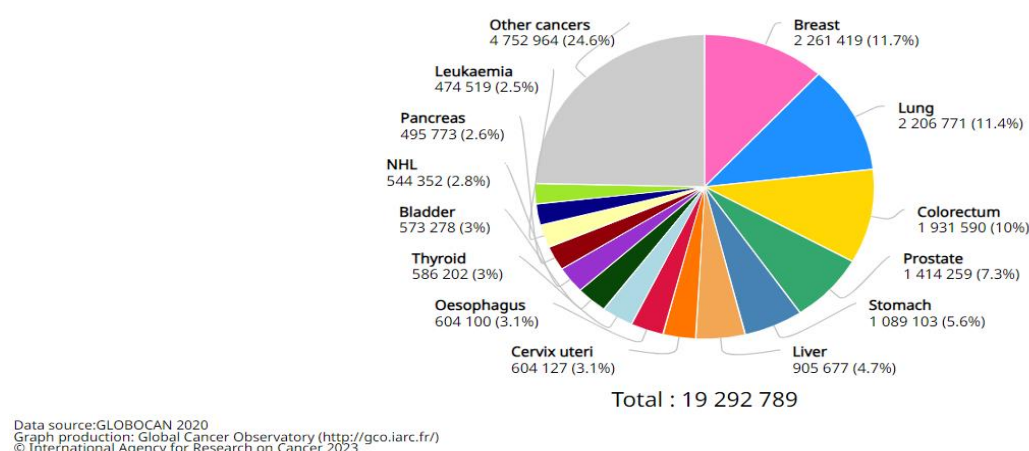
## 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος αποτελεί μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων του σώματος καθώς και από εξάπλωση τους σε άλλα μέρη του σώματος (What Is Cancer? - NCI, n.d.).

Ο καρκίνος μπορεί να πρωτοεμφανιστεί σχεδόν οπουδήποτε στο ανθρώπινο σώμα. Φυσιολογικά, τα ανθρώπινα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, μέσω μιας αυστηρά ελεγχόμενης διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρική διαίρεση, για να σχηματίσουν νέα κύτταρα σύμφωνα με τις εκάστοτε απαιτήσεις του οργανισμού. Όταν λοιπόν τα κύτταρα γερνούν ή καταστρέφονται, οδηγούνται σε θάνατο μέσω διάφορων μοριακών μηχανισμών του σώματος και νέα κύτταρα παίρνουν τη θέση τους. Μερικές φορές αυτή η τακτική διαδικασία καταρρέει και τα μη φυσιολογικά ή κατεστραμμένα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται εκτός του θεμιτού πλαισίου. Αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν τους λεγόμενους όγκους. Οι όγκοι μπορεί να είναι καρκινικοί (κακοήθεις) ή μη καρκινικοί (καλοήθεις) (What Is Cancer? - NCI, n.d.).

Οι επιδημιολογικές μελέτες τοποθετούν τον καρκίνο ως τη δεύτερη, σε συχνότητα, αιτία θανάτου παγκοσμίως εδραιώνοντας την ανάγκη για την αντιμετώπιση του από το διεθνές σύστημα υγείας. Παρόλες τις προσπάθειες που καταβάλλονται τις τελευταίες δεκαετίες από την επιστημονική κοινότητα για την επαγρύπνηση του πληθυσμού όσον αφορά τις μεθόδους πρόληψης ενάντια στον καρκίνο, τα αποτελέσματα δεν είναι και τόσο ενθαρρυντικά με τις νέες περιπτώσεις καρκίνου να πλησιάζουν το 2020, τα 20 εκατομμύρια σύμφωνα με τη GLOBOCAN (*GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC*, n.d.)(Εικόνα 1). Ο κακός τρόπος ζωής και η λανθασμένη διατροφή, σε συνάρτηση με την αύξηση του μέσου όρου ηλικίας, προσθέτουν εμπόδια στην αντιμετώπιση της "ανίατης ασθένειας". (Zhang et al., 2020)

Estimated number of new cases in 2020, World, both sexes, all ages



ΕΙΚΟΝΑ 1: Σχηματική απεικόνιση των νέων περιπτώσεων καρκίνου, παγκοσμίως και ανεξαρτήτου ηλικίας και φύλου, για το 2020 (GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC, n.d.).

## 1.2 ΟΡΟΣΗΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Στις αρχές του 21<sup>ου</sup> πρώτου αιώνα έγινε μια αρχική προσπάθεια από τους Douglas Hanahan και Robert A Weinberg για την αποτύπωση των βασικών αρχών που εμπλέκονται στη καρκινογένεση με σκοπό να διαλευκανθεί ή και να απλοποιηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η πολυπλοκότητα αυτής της νόσου. Πρωτίστως, κατέληξαν σε έξι "ορόσημα" που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου. Πρόκειται για τη διατήρηση της σηματοδότησης του πολλαπλασιασμού, την αποφυγή καταστολών ανάπτυξης, την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, την πολλαπλασιαστική αθανασία, την πρόκληση αγγειογένεσης και την ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης (Hanahan & Weinberg, 2000).

Λίγα χρόνια αργότερα, και συγκεκριμένα το 2011, οι δύο άνδρες ήρθαν να προσθέσουν, μέσα από μία νέα επιστημονική δημοσίευση, μερικά ακόμα ορόσημα που φαίνεται να παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη παθογένεση του καρκίνου. Αναφέρθηκαν στη συμβολή της απορρύθμισης του κυτταρικού μεταβολισμού κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και για την διαφανόμενη ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μπορούν να αποφεύγουν τους μηχανισμούς ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέλος, επισήμαναν την φλεγμονή καθώς και την γενομική αστάθεια και τη μεταλλακτικότητα που συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου (Hanahan & Weinberg, 2011).

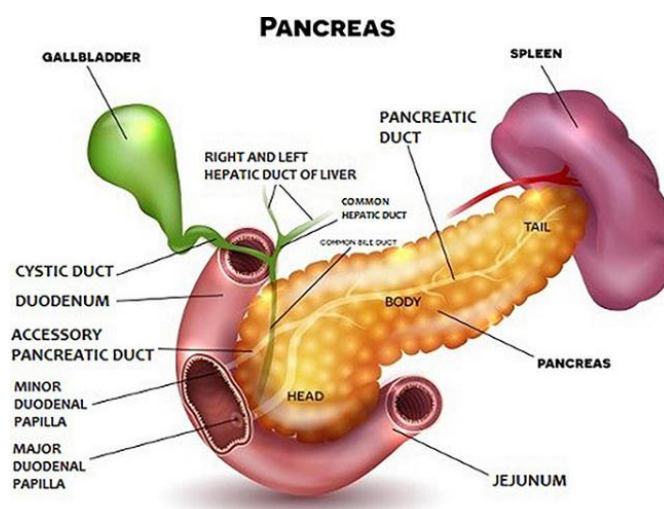


EIKONA 2: Τα δέκα ορόσημα της καρκινογένεσης (Hanahan & Weinberg, 2011).

## 1.3 ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Το πάγκρεας είναι ένα αδενικό όργανο μήκους περίπου 15 εκατοστών, σπογγώδες, σε σχήμα σωλήνα που βρίσκεται στο άνω μέρος της κοιλιάς μεταξύ του στομάχου και της σπονδυλικής στήλης (Hu et al., 2021). Ανατομικά χωρίζεται σε τρία μέρη: το κεφάλι, το σώμα και την ουρά (Εικόνα 3). Στην ιστολογική δομή του παγκρέατος διακρίνονται δύο βασικά στοιχεία: οι παγκρεατικές νησίδες (ή νησιά Langerhans – ο αριθμός των οποίων μπορεί να φτάσει ακόμη και τα 2 εκατομμύρια και έχοντας ως λειτουργία την παραγωγή ορμονών και τα εκκριτικά κύτταρα, που αποτελούν το υπόλοιπο όργανο και είναι υπεύθυνα για έκκριση παγκρεατικών ενζύμων (Karpińska & Czuderna, 2022).



ΕΙΚΟΝΑ 3: Η δομή του παγκρέατος (Karpińska & Czuderna, 2022).

Το πάγκρεας έχει δύο βασικές λειτουργίες για το σώμα: την ενδοκρινή που αφορά την παραγωγή ορμονών που ρυθμίζουν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα και την αδενική έκκριση και την εξωκρινή που σχετίζεται με τη λειτουργία του πεπτικού αδένου (Pandol & Raybould, 2011). Η ενδοκρινής δραστηριότητα εκτελείται από τις νησίδες Langerhans και περιλαμβάνει την παραγωγή ορμονών όπως η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη. Η ινσουλίνη βοηθά στη μείωση του σακχάρου στο αίμα και η γλυκαγόνη προκαλεί αύξηση του σακχάρου στο αίμα. Από την άλλη πλευρά, η εξωκρινής δραστηριότητα συνίσταται στην παραγωγή ενζύμων που αποτελούν μέρος του ισοοσμωτικού, αλκαλικού παγκρεατικού χυμού και υποστηρίζουν την πέψη της τροφής στα έντερα (Karpińska & Czuderna, 2022).

### 1.3.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο παγκρεατικός καρκίνος αφορά μεταλλάξεις του DNA στα παγκρεατικά κύτταρα που οδηγούν στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διαίρεσή τους με αποτέλεσμα τον σχηματισμό όγκων. Χαρακτηρίζεται ως μια θανατηφόρα νόσος καθώς αποτελεί μια από τις πιο επιθετικές και θανάσιμες κακοήθειες. Επίσης, εμφανίζει ανθεκτικότητα σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα γεγονός που οφείλεται κυρίως στην καθυστερημένη διάγνωση και την εξάπλωση του όγκου σε άλλα όργανα του σώματος (Hu et al., 2021). Συγκεκριμένα αποτελεί τη πιο σοβαρή ασθένεια του παγκρέατος και περιλαμβάνει δύο είδη νεοπλασμάτων, τα ενδοκρινή και τα εξωκρινή (Karpińska & Czauderna, 2022).

Οι ενδοκρινείς ή αλλιώς νευροενδοκρινείς νεοπλασίες θεωρούνται ετερογενείς ασθένειες τόσο από άποψη κλινικών όσο και παθολογικών χαρακτηριστικών, με σχετικά άτονη κλινική πορεία σε σύγκριση με τις μη ενδοκρινικές κακοήθειες (Rinzivillo et al., 2020). Σύμφωνα με δεδομένα που αντλούνται από το πανεπιστήμιο του John Hopkins, οι νευροενδοκρινείς νεοπλασίες είναι σχετικά σπάνιες σε σχέση με τις εξωκρινείς και δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο λόγος για τον οποίο οι ασθενείς αναπτύσσουν αυτούς τους όγκους. Η εμφάνισή τους έχει συσχετιστεί ως δευτερογενές αίτιο άλλων γενετικών ασθενειών όπως το σύνδρομο von Hippel Lindau (VHL), η νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (NF1) και το σπάνιο σύνδρομο της πολλαπλής νεοπλασίας τύπου 1 (MEN1 syndrome). Οι ενδοκρινείς όγκοι του παγκρέατος έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διάφορους τύπους όπως το ινσουλίνωμα, το γαστρίνωμα και το γλυκαγόνομα (Pancreatic Cancer Types | Johns Hopkins Medicine, n.d.).

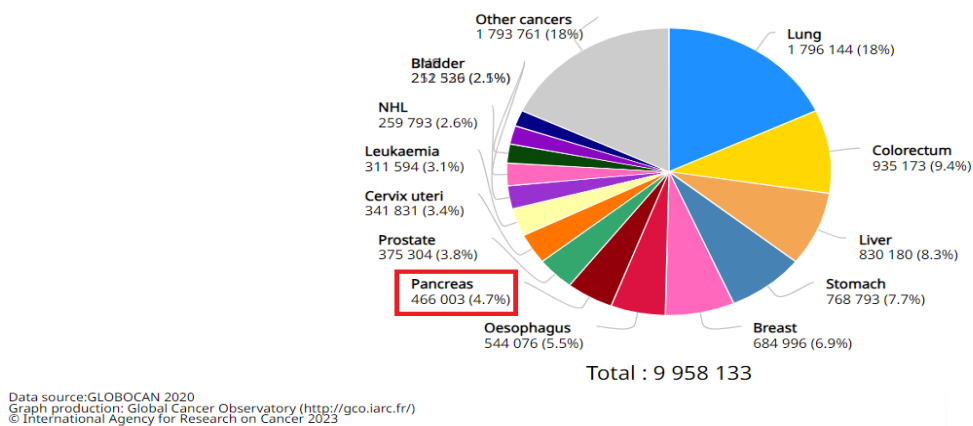
Από την άλλη πλευρά, οι εξωκρινείς νεοπλασίες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των παγκρεατικών καρκίνων (Luchini et al., 2020). Ο πιο συχνός τύπος κακοήθους εξωκρινούς όγκου είναι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC). Πρόκειται για ένα εξαιρετικά επιθετικό καρκίνο με μικρά ποσοστά επιβίωσης που αντιπροσωπεύει περί το 90% του συνόλου όλων των μορφών παγκρεατικού καρκίνου (Zhang et al., 2020).

Τα ακριβή αίτια για την εμφάνιση του αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου (PDAC) στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αποτελούν μέχρι και σήμερα ένα μυστήριο που χρήζει επίλυσης. Ωστόσο ένα μικρό ποσοστό κοντά στο 5% των ασθενών αποδίδεται σε γενετική προδιάθεση (Kearney et al., n.d.). Ο PDAC προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα που περικλείουν τον παγκρεατικό πόρο και φαίνονται σαν αδένες λόγω της προέλευσής τους. Πρόκειται για ένα είδος καρκίνου με εξαιρετική μεταναστευτική ικανότητα σε απομακρυσμένους από το πρωταρχικό σημείο του όγκου ιστούς, με πιο συχνή αυτή στο ήπαρ ή στους λεμφαδένες (Grant et al., 2016). Άξιοι αναφοράς είναι και κάποιοι άλλοι εξωκρινείς τύποι καρκίνου του παγκρέατος, αλλά λιγότερο συνηθέστεροι, όπως το αδενοκυτταρικό καρκίνωμα, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα, το καρκίνωμα των κυψελίδων και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα.

### 1.3.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Παρόλο που ο παγκρεατικός καρκίνος βρίσκεται στη 12<sup>η</sup> θέση μεταξύ όλων των ειδών καρκίνου για το 2020 (Εικόνα 1), κατατάσσεται στην 7<sup>η</sup> θέση, την ίδια χρονιά, όσον αφορά τη θνησιμότητα (Εικόνα 4). Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκαν 446.003 (4,7%) θάνατοι από τους συνολικούς 9.958.133. Αυτή η διαφορά στη κατάταξη συχνότητας σε αντίθεση με την κατάταξη θνησιμότητας υποδηλώνει την μεγάλη επιθετικότητα του παγκρεατικού καρκίνου και την ταχύτητα με την οποία εξελίσσεται η ανάπτυξη των κυττάρων.

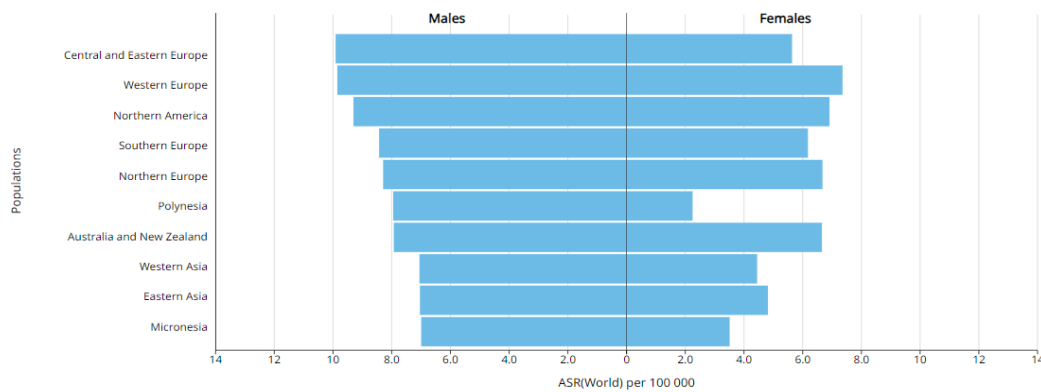
Estimated number of deaths in 2020, World, both sexes, all ages



ΕΙΚΟΝΑ 4: Σχηματική απεικόνιση της θνησιμότητας των διαφόρων μορφών καρκίνου, παγκοσμίως και ανεξαρτήτου ηλικίας και φύλου, για το 2020 (GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC, n.d.)

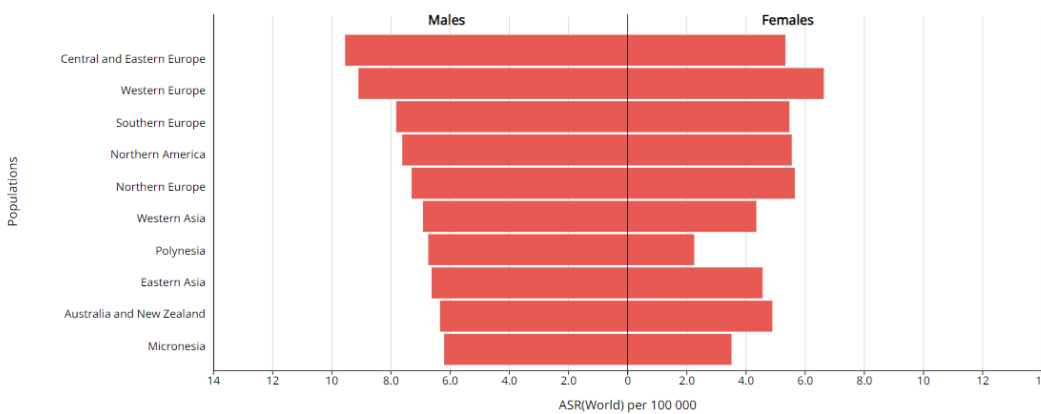
Εν συνεχεία, οι επιδημιολογικές μελέτες παρουσιάζουν διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης της νόσου, καθώς και θνησιμότητας, μεταξύ των δύο φύλων. Οι άντρες έχουν ελαφρώς αυξημένες πιθανότητες τόσο να νοσήσουν από παγκρεατικό καρκίνο (Εικόνα 5) όσο και να αποβιώσουν από αυτόν (Εικόνα 6) σε σχέση με αυτές των γυναικών.

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, pancreas, all ages (excl. NMSC)



ΕΙΚΟΝΑ 5: Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου μεταξύ αντρών και γυναικών, ανά πληθυσμό και ανεξαρτήτου ηλικίας, για το 2020 (GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC, n.d.).

Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, pancreas, all ages (excl. NMSC)

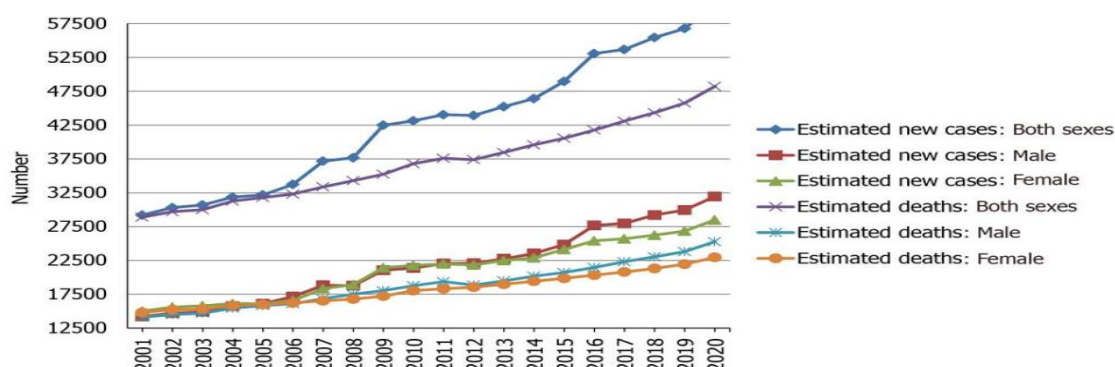


ΕΙΚΟΝΑ 6: Σχηματική απεικόνιση της θνησιμότητας παγκρεατικού καρκίνου μεταξύ αντρών και γυναικών, ανά πληθυσμό και ανεξαρτήτου ηλικίας, για το 2020 (GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC, n.d.).

Επιπροσθέτως, από τις εικόνες 5 και 6, προκύπτει ακόμα ένα σημαντικό στατιστικό στοιχείο που διαχωρίζει τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας του παγκρεατικού καρκίνου ανά πληθυσμό. Όπως γίνεται διακριτό οι χώρες της Ευρώπης παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά της νόσου και αντίθετα η ευρύτερη περιοχή της Μικρονησίας τα χαμηλότερα.

Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία ( American Cancer Society), εκμεταλλευόμενη τα δεδομένα των βάσεων της, παρουσίασε μία στατιστική μελέτη που απεικονίζει τα ποσοστά νέων περιπτώσεων καρκίνου του παγκρέατος και της θνησιμότητας του στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής σε βάθος 20ετίας και συγκεκριμένα από το έτος 2000 έως και το 2020. Τα αποτελέσματα ήταν άκρως ανησυχητικά καθώς κατέγραψε

αύξηση τόσο στα ποσοστά εμφάνισης όσο και στους θανάτους από τη νόσο και στα δύο φύλα( Εικόνα 7).



ΕΙΚΟΝΑ 7: Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου και της θνησιμότητας αυτού μεταξύ αντρών και γυναικών στις Η.Π.Α. μεταξύ των ετών 2000-2020 (Hu et al., 2021).

Εστιάζοντας λίγο περισσότερο στον ελληνικό πληθυσμό, σύμφωνα με τη GLOBOCAN, τα νέα κρούσματα παγκρεατικού καρκίνου για το 2020 ανέρχονται στα 2.302 ,γεγονός που τον καθιστά τον 6<sup>ο</sup> πιο συχνό καρκίνο στη χώρα. Αντίστοιχα οι θάνατοι την ίδια χρονιά άγγιξαν τους 2097 τοποθετώντας τον ως τον 4<sup>ο</sup> πιο θανατηφόρο καρκίνο στην Ελλάδα ( Πίνακας 1)

Cancer	New cases				Deaths			
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk
Lung	8 960	1	13.9	4.52	7 662	1	23.1	3.67
Breast	7 772	2	12.0	7.63	2 333	3	7.0	1.50
Colon	6 529	3	10.1	2.54	3 431	2	10.3	0.90
Prostate	6 217	4	9.6	6.31	1 835	5	5.5	0.55
Bladder	5 645	5	8.7	2.67	1 543	6	4.7	0.42
Pancreas	2 302	6	3.6	0.96	2 097	4	6.3	0.84
Corpus uteri	2 117	7	3.3	2.35	483	16	1.5	0.35
Leukaemia	1 847	8	2.9	0.80	1 314	9	4.0	0.41
Liver	1 833	9	2.8	0.78	1 522	7	4.6	0.57
Kidney	1 808	10	2.8	0.89	692	11	2.1	0.23
Stomach	1 780	11	2.8	0.70	1 347	8	4.1	0.45
Non-Hodgkin lymphoma	1 554	12	2.4	0.84	606	13	1.8	0.22
Brain, central nervous system	1 401	13	2.2	0.70	1 082	10	3.3	0.51
Melanoma of skin	1 313	14	2.0	0.75	295	18	0.89	0.12
Thyroid	1 251	15	1.9	0.83	86	24	0.26	0.03
Rectum	1 220	16	1.9	0.52	499	15	1.5	0.14
Ovary	1 020	17	1.6	0.99	677	12	2.0	0.54
Multiple myeloma	917	18	1.4	0.38	590	14	1.8	0.18
Larynx	811	19	1.3	0.44	379	17	1.1	0.15
Cervix uteri	697	20	1.1	0.77	282	19	0.85	0.23
Lip, oral cavity	603	21	0.93	0.28	217	20	0.65	0.08
Hodgkin lymphoma	361	22	0.56	0.22	108	22	0.33	0.04
Testis	321	23	0.50	0.48	22	32	0.07	0.03
Oesophagus	247	24	0.38	0.11	210	21	0.63	0.09
Nasopharynx	193	25	0.30	0.11	92	23	0.28	0.05
Vulva	170	26	0.26	0.09	84	25	0.25	0.03
Salivary glands	157	27	0.24	0.04	75	26	0.23	0.01
Anus	146	28	0.23	0.07	40	30	0.12	0.01
Kaposi sarcoma	116	29	0.18	0.05	22	33	0.07	0.01
Penis	97	30	0.15	0.09	35	31	0.11	0.02
Gallbladder	84	31	0.13	0.03	64	27	0.19	0.02
Oropharynx	78	32	0.12	0.04	46	29	0.14	0.02
Mesothelioma	57	33	0.09	0.03	48	28	0.14	0.03
Hypopharynx	20	34	0.03	0.01	11	34	0.03	0.00
Vagina	15	35	0.02	0.01	7	35	0.02	0.00
<b>All cancer sites</b>	<b>64 530</b>	-	-	<b>26.33</b>	<b>33 166</b>	-	-	<b>11.36</b>

Πίνακας 1: Απεικόνιση του αριθμού εμφάνισης νέων περιπτώσεων διαφόρων μορφών καρκίνου και των αντίστοιχων θανάτων στην Ελλάδα για το 2020 (GLOBOCAN 2020)

#### 1.3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η πλήρης και ολοκληρωμένη κατανόηση των παραγόντων κινδύνου για τον καρκίνο του παγκρέατος έχει μεγάλη πρακτική σημασία για την πρόληψη του. Τα ακριβή αιτία της νόσου, όπως προαναφέρθηκε, δεν είναι πλήρως ξεκάθαρα αλλά πολλοί περιβαλλοντικοί και μη περιβαλλοντικοί παράγοντες σχετίζονται με την ανάπτυξη παγκρεατικού καρκίνου.

Αρχικά, η έννοια περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου αναφέρεται σε παράγοντες που μπορούν να επηρεαστούν από τις συνήθειες και τις επιλογές ενός ατόμου. Για παράδειγμα, το κάπνισμα αποτελεί μία τέτοια συνήθεια και αποτελεί το πιο κοινό γνωστό παράγοντα κινδύνου καθώς είναι η αιτία για περίπου 20-25% όλων των όγκων του παγκρέατος (Raimondi et al., 2009). Εκ νέου μελέτες σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς έχουν δείξει ότι οι καπνιστές έχουν 72% αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, και επιβεβαίωσαν επίσης ότι περίπου το 16% όλων των διαγνώσεων της νόσου θα μπορούσαν να αποφευχθούν μέσω προληπτικών μέτρων για το κάπνισμα (Molina-Montes et al., 2020).

Ένας ακόμα τέτοιος παράγοντας κινδύνου είναι το αλκοόλ. Μια πληθώρα μελετών τα τελευταία χρόνια έχει συσχετίσει την υψηλή κατανάλωση αλκοόλ (που αντιστοιχεί σε πάνω από τρία ποτά ανά ημέρα) με την εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου. Εν αντιθέσει, οι χαμηλές ποσότητες αλκοόλ δεν επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου (Rawla et al., 2019). Μια επιπλέον πληθυσμιακή μελέτη έδειξε ότι η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ αύξησε τον εκτιμώμενο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος μεταξύ των ανδρών αλλά όχι μεταξύ των γυναικών γεγονός που μπορεί, εν μέρει, να εξηγήσει και τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας της νόσου στους άντρες (Gupta et al., 2010).

Συνεχίζοντας, υψηλή είναι η συσχέτιση των διατροφικών συνηθειών και της εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου. Γενικά, οι δίαιτες πλούσιες σε φρούτα, λαχανικά και άλλα τρόφιμα φυτικής προέλευσης μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος, ενώ διατροφικά πρότυπα πλούσια σε κρέας και ζωικά προϊόντα μπορούν να τον αυξήσουν (Tsai & Chang, 2019). Πιο ειδικά, η πρόσληψη κόκκινου μαγειρεμένου κρέατος σε υψηλή θερμοκρασία και ετεροκυκλικών αμινών που σχετίζονται με το κρέας μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη εξωκρινούς καρκίνου του παγκρέατος (Stolzenberg-Solomon et al., 2007).

Στηριζόμενοι στις διατροφικές συνήθειες έγινε μια περαιτέρω έρευνα για το ρόλο της παχυσαρκίας στην εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου. Με την πάροδο των ετών η παχυσαρκία αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως ένας ισχυρός αλλά τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του παγκρέατος. Επίσης, είναι άξιο αναφοράς ότι οι υπέρβαροι ασθενείς έχει παρουσιάσει χειρότερη έκβαση της νόσου σε αντίθεση με ασθενείς με φυσιολογικό βάρος σώματος (M. Xu et al., 2018). Σημαντικό γεγονός αποτελεί ακόμη ότι η παχυσαρκία κατά την πρώιμη ενήλικη ζωή μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στον κίνδυνο θνησιμότητας από καρκίνο του παγκρέατος αργότερα στη ζωή του ατόμου (Genkinger et al., 2015). Ο λόγος που η παχυσαρκία αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου είναι ότι αποτελεί μία προ-φλεγμονώδη κατάσταση που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ισορροπία μεταξύ των ρυθμιζόμενων προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών βιοδραστικών μορίων και

οδηγεί σε αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των ιστών, με αποτέλεσμα την περαιτέρω επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την κυτταρική εισβολή και την αγγειογένεση (Rawla et al., 2019).

Φεύγοντας από το φάσμα του ιατρικού και βιολογικού πεδίου, ποικίλες μελέτες υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρόλο της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης στις υπηρεσίες υγειονομικής περίθαλψης, συμπεριλαμβανομένης της ασφαλιστικής κατάστασης, της οικογενειακής κατάστασης και του επιπέδου φτώχειας ως ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση και τη θνησιμότητα παγκρεατικού καρκίνου (Sun et al., 2020). Υπάρχουν περιπτώσεις ανθρώπων με χαμηλή ασφαλιστική ικανότητα που έχουν πρόσβαση σε ελλιπή ή και μηδαμινή ιατρική περίθαλψη. Το κόστος των εξετάσεων, των φαρμάκων και των χειρουργικών επεμβάσεων αποτελεί αγκάθι για μεγάλο μέρος του πληθυσμού με αποτέλεσμα την μη έγκαιρη διάγνωση της νόσου ή την μη δυνατότητα αντιμετώπισης της με τους βέλτιστους τρόπους θεραπείας (Noel & Fiscella, 2019). Μάλιστα την παραπάνω υπόθεση υποστηρίζουν μελέτες, βασιζόμενες στην Εθνική Βάση Δεδομένων του Καρκίνου (National Cancer Database), που ανέλυσαν περιπτώσεις παγκρεατικού καρκίνου στις Η.Π.Α. και συμπέραναν ότι σε ασθενείς με ιδιωτική ασφάλιση παρήχθη καλύτερη και αμεσότερη θεραπεία με καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε αντίθεση με την κοινότητα των Αφρο-Αμερικανών που παρουσίαζε χαμηλότερο οικονομικό και ασφαλιστικό επίπεδο (Zhu et al., 2020).

Η άλλη όψη του νομίσματος κρύβει παράγοντες κινδύνου που δεν επηρεάζονται από τις συνήθειες και τις επιλογές ενός ατόμου. Τέτοιες περιπτώσεις για παράδειγμα είναι η ηλικία, το φύλο και η εθνικότητα. Όσο μεγαλύτερος ηλικιακά είναι κάποιος τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες να εμφανίσει παγκρεατικό καρκίνο (Chen et al., 2016) ενώ όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι άντρες παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά της νόσου. Άλλοι τέτοιοι παράγοντες είναι επίσης το στοματικό, το εντερικό και το παγκρεατικό μικροβίωμα. Πολλές έρευνες έχουν συσχετίσει την βακτηριακό μικροπεριβάλλον του οργανισμού με την πρόκληση προ-φλεγμονωδών καταστάσεων και κατ' επέκταση την εμφάνιση καρκίνου (Miyabayashi et al., 2022).

Πολλές είναι, επίσης, οι μελέτες που κατατάσσουν τον σακχαρώδη διαβήτη ως ένα κρίσιμο παράγοντα κινδύνου για πρόκληση παγκρεατικού καρκίνου. Οι ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με διαβήτη παρουσιάζουν έως και αυξημένο ρίσκο για τη συγκεκριμένη νόσο (Huang et al., 2019). Μια πρόσφατη διεθνής μελέτη κοορτής έδειξε επίσης ότι ο διαβήτης που εμφανίζεται νωρίτερα από το αναμενόμενο είναι μια εκδήλωση καρκίνου του παγκρέατος και ότι μακροχρόνιος διαβήτης είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη αυτού του καρκίνου (Setiawan et al., 2019).

Ένα ακόμη μεγάλο ερώτημα στη μελέτη του παγκρεατικού καρκίνου αποτελεί η κληρονομικότητα και το γενετικό υπόβαθρο. Αρχικά, έντονη φαίνεται να είναι η συσχέτιση μεταξύ της κληρονομικής παγκρεατίτιδας με αυξημένα ποσοστά (περίπου 40%) για πρόκληση καρκίνου του παγκρέατος (Whitcomb, 2004). Γενικότερα, ο παγκρεατικός καρκίνος που σχετίζεται με κληρονομικά σύνδρομα ή ο οικογενής καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί περίπου το 10% του συνόλου των περιπτώσεων (Ohmoto et al., 2019). Μέλη οικογενειών που διαγνώστηκαν με οικογενή καρκίνο του παγκρέατος και είχαν τουλάχιστον έναν συγγενή πρώτου βαθμού που είχε προσβληθεί από τη ασθένεια είχαν 9 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ενώ τα μέλη

οικογενειών με σποραδικό καρκίνο του παγκρέατος που είχαν συγγενή πρώτου βαθμού με την ασθένεια δεν είχαν αυξημένο κίνδυνο. Επιπλέον, ο κίνδυνος είναι ακόμα υψηλότερος όταν στην οικογένεια υπάρχει ασθενής νεαρής ηλικίας (<50 ετών) (Brune et al., 2010). Στη διάρκεια των χρόνιων ερευνών για το παγκρεατικό καρκίνο έχει γίνει μια σημαντική πρόοδος στην αναγνώριση των υπεύθυνων γονιδίων που υπόκεινται συχνότερα σε μεταλλάξεις και σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισής του. Μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα BRCA1/2, PALB2, ATM, TP53, MLH1, STK11/LKB1, APC, CDKN2A και SPINK1/PRSS1 έχουν συσχετιστεί με τον κληρονομικό καρκίνο του παγκρέατος (Abe et al., 2021).

Ένα γονίδιο που έχει ταυτιστεί πλήρως με την πρόκληση καρκίνου του παγκρέατος είναι το KRAS. Οι μεταλλάξεις στο KRAS συμβαίνουν στο 95% των αδενοκαρκινωμάτων του παγκρεατικού πόρου και στο 80% των ενδοκρινών παγκρεατικών καρκίνων. Το πρωτο-ογκογονίδιο KRAS κωδικοποιεί ένα μικρό μόριο GTPασης που δρα ως μετατροπέας για τους υποδοχείς αυξητικού παράγοντα που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια. Μεταλλάξεις στο KRAS απορυθμίζουν την εγγενή δραστηριότητα της GTPασης με αποτέλεσμα η KRAS να παραμένει συνεχώς ενεργή και να διεγείρει επίμονα άλλα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα PI3K/AKT/mTOR και RAF/MAP. Η συνεχής ενεργοποίηση αυτών των οδών οδηγεί στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την καταστολή της απόπτωσης και την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης (Morani et al., 2020).

### 1.3.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ο παγκρεατικός καρκίνος χαρακτηρίζεται κατά τη βάση του, από καθυστερημένη διάγνωση και κακή πρόγνωση. Συνήθως γίνεται αντιληπτός σε προχωρημένο στάδιο καθώς τότε παρουσιάζει έντονα κλινικά συμπτώματα και το 80-90% των ασθενών να έχουν πλέον μη εγχειρήσιμους όγκους. Το γεγονός αυτό εξηγεί κατά ένα μεγάλο κομμάτι τα μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας αυτού του καρκίνου (Gheorghe et al., 2020).

Ανάλογα με τον τύπο του παγκρεατικού καρκίνου μπορεί να υπάρχουν διάφορα συμπτώματα και κλινικές ενδείξεις που υποδηλώνουν την εκδήλωση του όπως αδυναμία, ίκτερος, απώλεια βάρους, ηπατομεγαλία, ανορεξία, κοιλιακός πόνος, καχεξία, επιγαστρικός πόνος, σκούρα ούρα, επιγαστρική κήλη, ναυτία, πόνος στην πλάτη, διάρροια, εμετός, στεατόρροια και θρομβοφλεβίτιδα (Gheorghe et al., 2020).

Σήμερα, υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο αρκετών διαθέσιμων διαγνωστικών εργαλείων, όπως το υπερηχογράφημα κοιλίας, η τριφασική αξονική τομογραφία παγκρέατος, η μαγνητική τομογραφία (MRI) και ενδοσκοπική αναρρόφηση με λεπτή βελόνα καθοδηγούμενη από υπερήχους για κυτταρολογική διάγνωση (η ευαισθησία της οποίας υπολογίζεται ότι είναι περίπου 80%). Επιπλέον, σε συμπτωματικούς ασθενείς, η μέτρηση των επιπέδων του καρκινικού αντιγόνου CA 19-9 στο αίμα μπορεί να βοηθήσει στην επιβεβαίωση της διάγνωσης και στην πρόβλεψη της πρόγνωσης και της υποτροπής μετά την εκτομή. Ωστόσο, δεν μπορεί να σταθεί ως μεμονωμένο εργαλείο προ-συμπτωματικού ελέγχου για ασυμπτωματικούς ασθενείς επειδή δεν είναι ειδικό για τον παγκρεατικό όγκο (Rawla et al., 2019).

Μια διαφορετική προσέγγιση αποτελεί ο έλεγχος διαφόρων γενομικών βιοδεικτών. Για παράδειγμα η ανίχνευση επιγενετικών βιοδεικτών που αναλύουν το πρότυπο μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται στη καρκινογένεση μπορεί να αποτελέσει μια ικανή μέθοδο διάγνωσης (Yi et al., 2013). Επιπροσθέτως, ένας χρήσιμος βιοδείκτης μπορεί να είναι τα MicroRNAs (miRNAs) των οποίων ο ρόλος στη ανάπτυξη του καρκίνου έχει αποδειχθεί πολύ σημαντικός. Μελέτες όπου έγινε ανάλυση δειγμάτων παγκρεατικού ιστού έδειξαν διαφορετικά προφίλ miRNA σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παγκρεατικού πόρου (PDAC) και ενδοκρινές θηλώδες βλεννώδες νεόπλασμα (IPMN), σε σύγκριση με υγιή άτομα. Συγκεκριμένα 607 απορρυθμισμένα miRNA βρέθηκαν στο PDAC και 396 miRNA βρέθηκαν στο IPMN, χρησιμοποιώντας αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) (Vila-Navarro et al., 2017) .

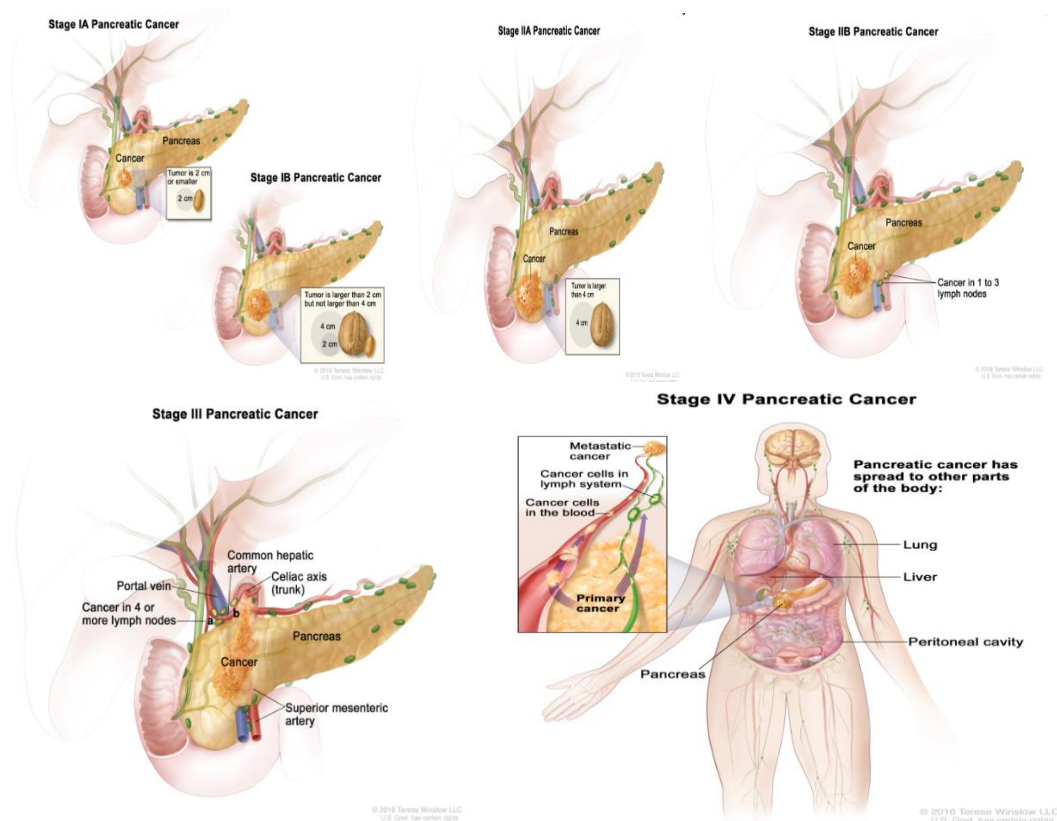
Ένας ακόμη πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης είναι το ctDNA (Circulating Tumor Deoxyribonucleic Acid). Το ctDNA είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA που απελευθερώνεται από τα καρκινικά κύτταρα στο αίμα και έτσι φιλοξενεί τις μεταλλάξεις του αρχικού όγκου. Τα τελευταία χρόνια, η υγρή βιοψία που βασίζεται σε ανάλυση ctDNA έχει ρίξει νέο φως στη μοριακή διάγνωση και παρακολούθηση του καρκίνου (Cheng et al., 2016). Έρευνες έχουν αναγνωρίσει ctDNA στο αίμα 48% ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο. Ωστόσο σημαντικό εμπόδιο στη χρήση αυτού του διαγνωστικού εργαλείου αποτελεί το γεγονός ότι το ctDNA εντοπίστηκε επίσης σε ασθενείς χωρίς κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Bettegowda et al., 2014).

Τέλος, πολλοί χρήσιμοι στην διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου μπορεί να αποτελέσουν οι πρωτεομικοί βιοδείκτες. Πρόκεινται για πρωτεΐνες που προέρχονται από τον όγκο και μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα, τον παγκρεατικό χυμό, τον ιστό του όγκου ή τις κυτταρικές σειρές. Γενικότερα η πρωτεομική είναι ένας επιταχυνόμενα εξελισσόμενος τομέας με τη δύναμη να φέρει επανάσταση στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου του παγκρέατος και να θέσει τις βάσεις για τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικών στρατηγικών. Μέσω τεχνικών αιχμής όπως η φασματομετρία μάζας και η βιοπληροφορική, οι επιστήμονες μπορούν να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου του παγκρέατος, την απόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση (amalhete et al., 2023).

### 1.3.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Πριν από την έναρξη της θεραπείας για κάθε ασθενή με καρκίνο, υπάρχουν 3 απαραίτητοι παράγοντες που πρέπει να είναι γνωστοί: η ακριβής τοποθεσία προέλευσης του όγκου, ο ιστολογικός υπότυπος του όγκου (συμπεριλαμβανομένου του βαθμού εξέλιξης του ) και η έκταση ή το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος. Η σταδιοποίηση του καρκίνου είναι ένα σημαντικό βήμα, όχι μόνο όσον αφορά την φροντίδα του ασθενούς, αλλά και της γενικότερης έρευνας για τον καρκίνο. Έτσι λοιπόν έχει εδραιωθεί μια παγκοσμίως αποδεκτή μέθοδος για την περιγραφή της έκτασης του καρκίνου η οποία ονομάζεται TNM ((tumour, node, metastases). Δηλαδή ελέγχονται 3 παράμετροι που είναι είναι το μέγεθος του όγκου T (Tumour), η διασπορά καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες N (Node) και η διασπορά του όγκου σε κάποιο άλλο όργανο M (Metastasis) (Brierley, 2006).

Όσον αφορά τον παγκρεατικό καρκίνο, αυτός, κατηγοριοποιείται σε 4 στάδια εξέλιξης (Εικόνα 8) με το 4<sup>ο</sup> να θεωρείται το πιο προχωρημένο και θανατηφόρο καθώς έχει ήδη εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος. Όπως προαναφέρθηκε, πρόκειται για μία νόσο που σπάνια γίνεται αντιληπτή στα αρχικά στάδια λόγω απουσίας συμπτωμάτων και για το λόγο αυτό τα ποσοστά θνησιμότητας είναι πολύ υψηλά. Επομένως πολύ σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της εκάστοτε θεραπευτικής προσέγγισης είναι το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο παγκρεατικός καρκίνος.



Εικόνα 8: Τα 4 στάδια εξέλιξης του παγκρεατικού καρκίνου (*Comprehensive Cancer Information - NCI, n.d.*).

Διαφορετικοί τύποι θεραπείας είναι διαθέσιμοι για ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος. Ορισμένες θεραπείες είναι τυπικές (η θεραπεία που χρησιμοποιείται επί του παρόντος), και ορισμένες δοκιμάζονται σε κλινικές δοκιμές. Μια κλινική δοκιμή θεραπείας είναι μια ερευνητική μελέτη που αποσκοπεί στη βελτίωση των τρεχουσών θεραπειών ή στη λήψη πληροφοριών για νέες θεραπείες για ασθενείς με καρκίνο. Όταν οι κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι μια νέα θεραπεία είναι καλύτερη από την τυπική θεραπεία, η νέα θεραπεία μπορεί να γίνει η τυπική θεραπεία. Οι ασθενείς μπορεί να θέλουν να σκεφτούν να λάβουν μέρος σε μια κλινική δοκιμή. Ορισμένες κλινικές δοκιμές είναι ανοιχτές μόνο σε ασθενείς που δεν έχουν ξεκινήσει θεραπεία (*Comprehensive Cancer Information - NCI, n.d.*).

Ο βασικότερος τρόπος θεραπευτικής αντιμετώπισης του παγκρεατικού καρκίνου είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, όποτε αυτό καθίσταται δυνατό, η οποία στη

συνέχεια ακολουθείται από την χορήγηση μιας συντηρητικής φαρμακευτικής αγωγής, που συνιστά τη λεγομένη επικουρική θεραπεία, προκειμένου να αντιμετωπιστούν τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα του καρκίνου. Ο τρόπος αυτός συμβάλλει στην ελάττωση των πιθανοτήτων ανάπτυξης νέων όγκων καθώς και πιθανών μεταστάσεων (Mar Kolbeinsson et al., 2023).

Μια ακόμη γνωστή θεραπευτική προσέγγιση είναι η χημειοθεραπεία που χρησιμοποιεί φάρμακα για να σταματήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, είτε σκοτώνοντας τα κύτταρα είτε εμποδίζοντας τη διαίρεση τους. Όταν η χημειοθεραπεία λαμβάνεται από το στόμα ή εγχέεται σε φλέβα ή μυ, τα φάρμακα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να φτάσουν στα καρκινικά κύτταρα σε όλο το σώμα (συστηματική χημειοθεραπεία). Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο εγκεκριμένο φάρμακο κατά του παγκρεατικού καρκίνου είναι η γεμισιταβίνη (Gemcitabine). Πολλές φορές εφαρμόζεται η συνδυασμένη χημειοθεραπεία που χρησιμοποιεί περισσότερα από ένα αντικαρκινικά φάρμακα και αποτελεί μια πολύ πιο επιθετική προσέγγιση. Ένα τέτοιο θεραπευτικό σχήμα αποτελεί το λεγόμενο FOLFIRINOX που αποτελεί συνδυασμό των ουσιών Leucovorin Calcium (Folinic Acid)- Fluorouracil- Irinotecan Hydrochloride- Oxaliplatin (Chin et al., 2018) .

Αρκετά συχνό κομμάτι των θεραπευτικών σχημάτων έναντι του παγκρεατικού καρκίνου είναι η ακτινοθεραπεία που χρησιμοποιεί ακτίνες X υψηλής ενέργειας ή άλλους τύπους ακτινοβολίας για να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα ή να τα εμποδίσει να αναπτυχθούν. Η εξωτερική ακτινοθεραπεία χρησιμοποιεί ένα μηχάνημα έξω από το σώμα για να στείλει ακτινοβολία προς την περιοχή του σώματος με καρκίνο. Πολλές είναι οι περιπτώσεις που γίνεται ένας συνδυασμός ακτινοθεραπειών και χημειοθεραπείας (Chemoradiation therapy) προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα θεραπευτικά αποτελέσματα και των δύο (Huguet et al., 2022).

Σήμερα βρίσκονται σε εξέλιξη μια πληθώρα ερευνών και κλινικών δοκιμών που έχουν ως στόχο την στοχεύουσα αντικαρκινική θεραπεία. Αποσκοπούν δηλαδή στην δημιουργία ουσιών που αλληλοεπιδρούν άμεσα με ειδικά μόρια (KRAS, PI3K/PDK-1/AKT, mTOR και πολλών άλλων) που εμπλέκονται στη κυτταρική αύξηση και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Amanam & Chung, 2018; Leroux & Konstantinidou, 2021) .

## 1.4 Η PDK-1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

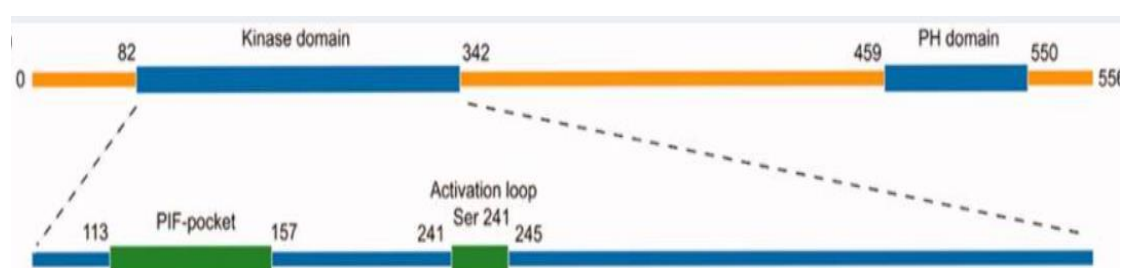
### 1.4.1 ΤΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ PDK-1

Η οικογένεια κινασών AGC περιέχει τουλάχιστον 60 μέλη μεταξύ 21 υπο-οικογενειών (AKT, CRIK, DMPK, GRK, LATS, MAST, MRCK, MSK, NDR, PDK-1, PKA, PKC, PKG, PKN, PRK, ROCK, RSK, S6K, SGK, SGK494 και YANK), τα οποία έχουν όλες ανάλογες δομές και παρόμοιους τρόπους ενεργοποίησης μέσω δύο άκρων συντηρημένων μοτίβων: την περιοχή ενεργοποίησης (T βρόχος ή βρόχος ενεργοποίησης), που βρίσκεται στην καταλυτική περιοχή της κινάσης και ένα υδρόφοβο μοτίβο (HM- hydrophobic motif), που βρίσκεται σε μια μη καταλυτική

περιοχή (Pearce et al., 2010). Επιπλέον, σε ορισμένες κινάσες AGC υπάρχει , μια τρίτη θέση φωσφορυλίωσης, η οποία συμβάλλει στην ενεργοποίησή τους τόσο με τη σταθεροποίηση του υδρόφοβου μοτίβου στη θέση δέσμευσης που ενεργοποιεί την κινάση όσο και με την προστασία του από γεγονότα αποφωσφορυλίωσης(X. Xu et al., 2019).

Η Φωσφοϊνσιτιδιο-εξαρτώμενη κινάση-1 ή αλλιώς PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), ανήκει σε αυτήν την οικογένεια των κινασών AGC και ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1997 σε σκελετικούς μυς κουνελιών (Alessi, James, et al., 1997) ενώ στη συνέχεια αναγνωρίστηκε σε 293 είδη ανθρώπινων κυττάρων (Alessi, Deak, et al., 1997). Η PDK-1 κωδικοποιείται από το γονίδιο PDK1 και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 στη περιοχή p13.3. Έχει πλέον αποδειχθεί ότι παίζει κύριο ρόλο σε δύο πολύ σημαντικά μονοπάτια που οδηγούν στην καρκινογένεση, το PI3K/AKT μονοπάτι και το RAS/MARK μονοπάτι. Αυτή η ιδιότητα οφείλεται στο γεγονός ότι η PDK-1 είναι ένας κύριος ρυθμιστής της οικογένειας κινασών AGC, φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας τουλάχιστον 23 σχετικές πρωτεϊνικές κινάσες AGC, όπως η κινάση p70 S6 (S6K), η ριβωσωμική κινάση S6 (RSK) p90, η πρωτεϊνική κινάση SGK (Serum/glucocorticoid-regulated kinase) , οι ισομορφές της κινάσης PKC, η κινάση PRK2 (protein kinase C-associated kinase 2) και τις PKB/AKT. Οι παραπάνω κινάσες μπορούν να προάγουν την ογκογένεση μέσω της υπερενεργοποίησης τους από ογκογόνες μεταλλάξεις, δηλαδή μεταλλάξεις που διεγείρουν κυτταρικές διεργασίες που οδηγούν στο σχηματισμό όγκων (X. Xu et al., 2019).

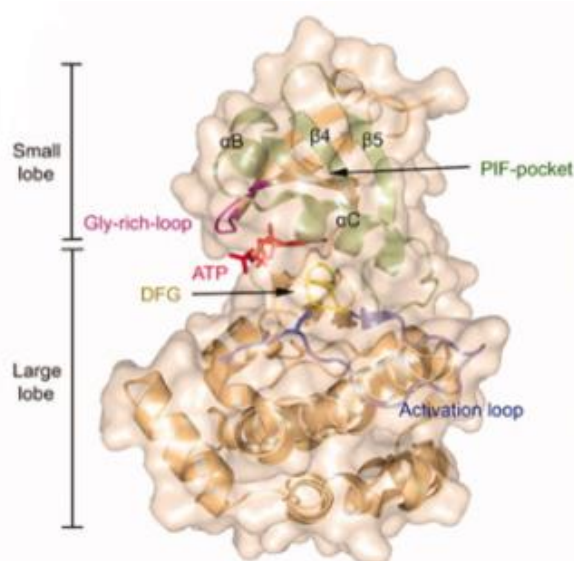
Όσον αφορά τη δομή της PDK-1, πρόκειται για μια μεσαίου μεγέθους και διαλυτή σφαιρική κινάση και πιο συγκεκριμένα μια κυτοσολική πρωτεΐνη 556 αμινοξέων. Διαθέτει δύο λειτουργικές περιοχές: μια αμινο-τελική (N-τελική) καταλυτική περιοχή κινάσης και μια καρβοξυ-τελική (C-τελική) περιοχή ομολογίας πλεξτρίνης (PH) (Wang et al., 2022).



Εικόνα 9: Η δομή της πρωτεΐνης PDK-1 η οποία αποτελείται από:(α) τον τομέα κινάσης (71-359aa) και την περιοχή PH (459-550aa) (X. Xu et al., 2019).

Εντός της περιοχής με ενεργότητα κινάσης η πολυπεπτιδική αλυσίδα υποδιαιρείται περαιτέρω σε δύο λοβούς με τον καρβοξυ-τελικό λοβό (C-λοβός) να είναι πολύ μεγαλύτερος σε μέγεθος από τον αμινο-τελικό λοβό (N-λοβός) (Εικόνα 10). Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει τρεις θέσεις δέσμευσης, τη θέση δέσμευσης υποστρώματος, τη θέση δέσμευσης ATP και τη θέση πρόσδεσης που είναι επίσης γνωστή ως θύλακας PIF (PDK-1 Interacting Fragment). Ο θύλακας PIF βρίσκεται στο N-λοβό της κινάσης με

ικανότητα να αλληλεπιδρά και να δεσμεύει ορισμένα υποστρώματα PDK-1 όπως η κινάση p70 S6 (S6K) και διάφορες ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Από την άλλη πλευρά η περιοχή PH κατέχει ξεχωριστό ρόλο στην ενεργοποίηση της PKD1. Η PDK-1 ως συστατικά ενεργή κινάση, ενεργοποιείται έπειτα από αυτοφωσφορυλίωσή της σε ένα ορισμένο κατάλοιπο σερίνης (Ser241) στο βρόχο ενεργοποίησής της. Ωστόσο, για τον εντοπισμό και την ενεργοποίηση ορισμένων υποστρωμάτων της όπως η AKT, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδρασή της με την τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP3) που αποτελεί προϊόν της κινάσης PI3K. Η αλληλεπίδραση αυτή διαμεσολαβείται από την περιοχή PH. (X. Xu et al., 2019).



Εικόνα 10: Τα δομικά χαρακτηριστικά της αμινο-τελικής ή αλλιώς καταλυτικής περιοχής της PDK-1 (X. Xu et al., 2019).

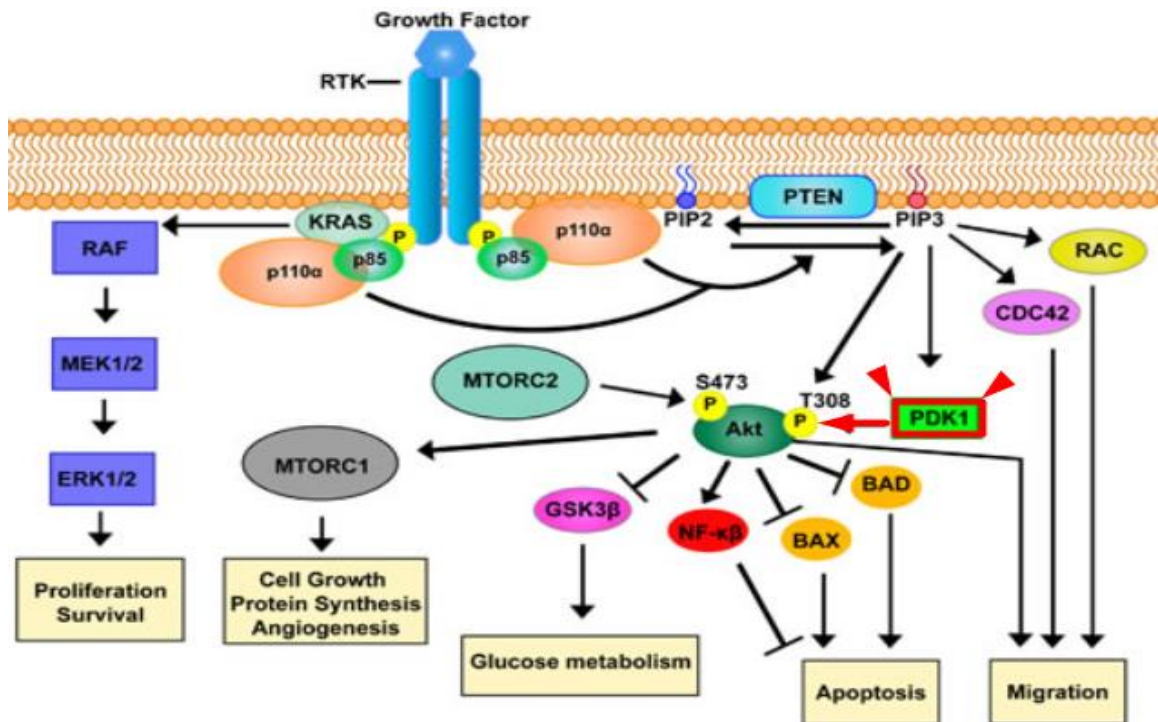
#### 1.4.2 ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K/PDK-1/AKT/mTOR ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Το μονοπάτι PI3K/PDK-1/AKT είναι ένα περίπλοκο δίκτυο σηματοδότησης, που ρυθμίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό, την ανάπτυξη, τη μετανάστευση, την επιβίωση και την αγγειογένεση και ως εκ τούτου, όταν ενεργοποιείται έκρυθμα, οδηγεί σε ογκογένεση (Hanahan & Weinberg, 2011). Η οικογένεια PI3K είναι μια ομάδα λιπιδικών κινασών που φωσφορυλιώνει την ομάδα 3'OH των φωσφατιδυλινοσιτολών. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες (Class I-III), καθεμία από τις οποίες διακρίνεται από δομικές και λειτουργικές διαφορές. Οι PI3Ks της 1<sup>ης</sup> κατηγορίας παράγουν κυρίως φωσφατιδυλινοσιτόλη-3,4,5-τριφωσφορική (PIP3) από 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI-4,5-P2), ενώ οι PI3K της 3<sup>ης</sup> κατηγορίας παράγουν φωσφατιδυλινοσιτόλη-3-φωσφορική (PI-3-P) από φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI). Οι PI3K της 2<sup>ης</sup> κατηγορίας παράγουν κατά προτίμηση PI-3-P και φωσφατιδυλινοσιτόλη-3,4-διφωσφορική (PI-3,4-P2) in vitro και μπορεί να δημιουργήσουν PI-3-P, PI-3,4-P2 και πιθανώς PIP3 in vivo. Οι PI3K της 1<sup>ης</sup> κατηγορίας είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες κινάσες στον καρκίνο και είναι κυρίως υπεύθυνες για την παραγωγή D-3

φωσφοϊνοσιτιδίων ως απόκριση σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες, ενώ σε αυτήν την κατηγορία έχουν επικεντρωθεί οι προσπάθειες ανάπτυξης φαρμάκων για τη στόχευση αυτής της οδού(Engelman et al., 2006) .

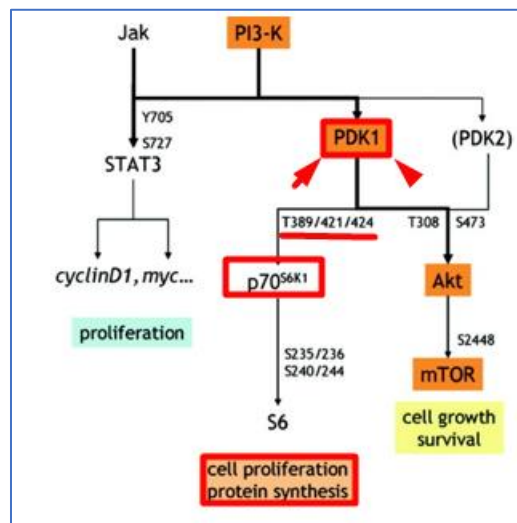
Μόλις ενεργοποιηθεί, η PI3K μετατρέπει τη διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (3,4) (PIP2) σε τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (3,4,5) (PIP3). Οι πρωτεΐνες με καρβοξυ-τελική (C-τελική) περιοχή ομολογίας πλεξτρίνης (PH) στρατολογούνται στις θέσεις ενεργοποίησης της PI3K και συνδέονται με τη PIP3 στη πλασματική μεμβράνη. Μεταξύ αυτών των κινασών σερίνης/θρεονίνης βρίσκονται οι PDK-1 και AKT, οι οποίες μάλιστα στη συνέχεια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της PIP3 (Thillai et al., 2017). Παρόλο που η PI3K δεσμεύεται σταθερά με τη περιοχή ομολογίας πλεξτρίνης (PH) της AKT δεν την ενεργοποιεί πλήρως. Η πλήρης ενεργοποίηση της AKT φαίνεται να συμβαίνει μέσω φωσφορυλίωσης από την PDK-1 στη θέση θρεονίνης (Thr)-308 στον βρόχο ενεργοποίησης της AKT γεγονός που ενισχύει τελικώς τη δραστηριότητα της AKT πάνω από 100 φορές. Μάλιστα όταν ακολουθείται φωσφορυλίωση της σερίνης (Ser)-473 στο καρβοξυ-τελικό άκρο (το υδρόφοβο μοτίβο της AKT), από άλλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα (όπως το mTORC2), η AKT επάγεται κατά επιπλέον 7-10 φορές, και σταθεροποιείται στην ενεργή της διαμόρφωση (Bamodu et al., 2020).

Η πλήρης πλέον ενεργοποιημένη AKT από την PDK-1, ενεργοποιεί κατ' επέκταση το σύμπλεγμα mTORC1 μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης του PRAS40 (πλούσιο σε προλίνη υπόστρωμα 40kDa) και της TSC2 (πρωτεΐνη 2 της κονδυλώδους σκλήρυνσης). Το mTORC1 πρόκειται για ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που παίζει σημαντικό ρόλο στη κυτταρική ανάπτυξη, στη πρωτεϊνική σύνθεση και στην αγγειογένεση (Hemmings & Restuccia, 2012). Επίσης η ενεργή διαμόρφωση της AKT προάγει την ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων και με άλλους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής των προ-αποπτοτικών παραγόντων BAD και BAX (Thillai et al., 2017). Επομένως, οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτές τις άρτια συντηρημένες κυτταρικές διεργασίες μπορεί να έχει ως επίπτωση την επαγωγή καρκινογένεσης.



Εικόνα 11: Αναπαράσταση μονοπατιού ενεργοποίησης της Akt μέσω της PDK-1 και την επακόλουθη ενεργοποίηση του mTORC1 και την αναστολή των προ-αποπτοτικών παραγόντων BAX και BAD (Thillai et al., 2017).

Άμεσος στόχος της PDK-1, πέραν της κινάσης AKT, είναι και η κινάση S6K p70. Σε αυτή την περίπτωση η PDK-1 φωσφορυλιώνει τη κινάση S6K p70 στις θέσεις θρεονίνης 389/421/424 προκειμένου να την ενεργοποιήσει (Εικόνα 12). Η ενεργοποίηση της p70 από την PDK-1 έχει σαν αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την πρωτεϊνοσύνθεση. Οποιαδήποτε απορρύθμιση, λοιπόν, και της εν λόγω διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση (Haga et al., 2009).

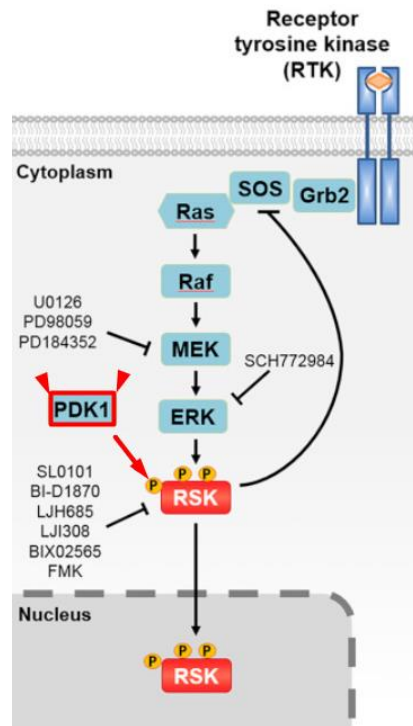


Εικόνα 12: Αναπαράσταση μονοπατιού ενεργοποίησης της Akt και p70 μέσω του PDK-1 (Haga et al., 2009)

### 1.4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ PDK-1 ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ RAS/MAPK ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής επιβίωσης, πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης, βασίζεται στο εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι RAS/MAPK. Ως εκ τούτου, η απορρύθμιση αυτής της οδού έχει συνδεθεί με μια πληθώρα ανθρώπινων παθολογιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των φλεγμονωδών διαταραχών, των καρδιαγγειακών παθήσεων, του διαβήτη, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και των αναπτυξιακών συνδρόμων (Cargnello & Roux, 2011). Όπως προαναφέρθηκε μάλιστα, η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων του παγκρέατος περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS, με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του (Morani et al., 2020).

Ένα ευρύ φάσμα εξωκυτταρικών ερεθισμάτων, όπως αυξητικοί παράγοντες επάγουν το μονοπάτι Ras/MAPK, το οποίο αρχικά πυροδοτείται από τον ολιγομερισμό ή/και την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας με δράση κινάσης-τυροσίνης (RTK-receptor tyrosine kinase), οδηγώντας στην ενεργοποίηση μικρών GTPασών της οικογένειας Ras. Συγκεκριμένα, έπειτα από την πυροδότηση των RTKs ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων SOS (SOS of Sevenless) συνδέεται με την πρωτεΐνη σύνδεσης (GRB2- Growth factor receptor-bound protein 2) η οποία βρίσκεται προηγουμένως συνδεδεμένη με τους RTKs, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό επάγει την ενεργοποίηση του SOS ο οποίος διαμεσολαβεί την μετατροπή του GDP σε GTP, ενεργοποιώντας τελικά την κινάση RAS. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση στη μεμβράνη και την ενεργοποίηση μιας ανοδικά MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) κινάσης της οικογένειας RAF μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού που περιλαμβάνει γεγονότα φωσφορυλίωσης και αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι ισομορφές RAF (Raf-1, B-Raf και A-Raf) στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAPKK (MAP kinase kinase) ισομορφές MEK1 και MEK2, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις MAP κινάσες ERK1 και ERK2 με διπλή φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr). Μόλις ενεργοποιηθεί, το ERK1/2 φωσφορυλιώνει μια τεράστια σειρά υποστρωμάτων που υπάρχουν σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων των ριβοσωμικών κινασών RSK (Εικόνα 13) (Santarpia et al., 2012)(Houles & Roux, 2018).



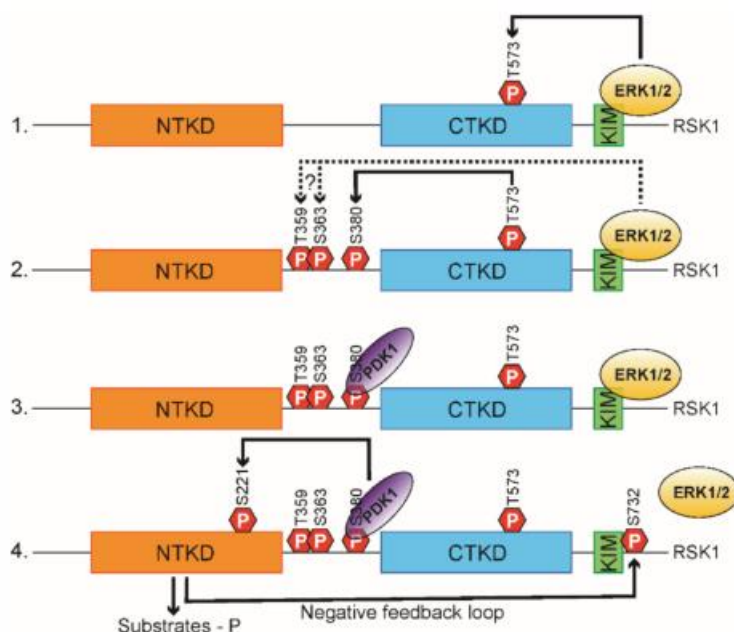
Εικόνα 13: Απεικόνιση μονοπατιού RAS/MAPK (Thibault Houles and Philippe P. Roux, 2017).

Οι RSK είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, με μοριακό βάρος 90 kDa, και αποτελούνται από 4 ισομορφές, τις RSK1-4. Όλες οι ισομορφές, διαθέτουν στη δομή τους δυο καλά συντηρημένες δομικές περιοχές, την καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal kinase domain-CTKD) και την αμινοτελική περιοχή (N-terminal kinase domain- NTKD), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μια ρυθμιστική αμινοξική περιοχή-συνδέτη (linker domain). Η CTKD η οποία ανήκει στην οικογένεια κινάσων εξαρτώμενων από ασβέστιο και καλμοδουλίνη CAMK (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase), δρα ρυθμιστικά ως προς την ενεργοποίηση της NTKD που ανήκει στην οικογένεια AGC κινάσων, μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων που προϋποθέτουν την δράση της κινάσης PDK-1. Ωστόσο, εκ των ισομορφών, μόνο η RSK-4 είναι αυτή που δεν προϋποθέτει την PDK-1 για την ενεργοποίηση της (Houles & Roux, 2018).

Συγκεκριμένα, ως προς την ενεργοποίηση των ισομορφών RSK1-3, η ενεργοποιημένη από το μονοπάτι RAS/MAPK, ERK1/2, προσδένεται σε ένα σημείο σύνδεσης στην καρβοξυτελική περιοχή της RSK (περιοχή KIM ή D domain), φωσφορυλιώνοντας έπειτα την Thr 573 που βρίσκεται στο CTKD αλλά και την Thr359 στην περιοχή συνδέτη (η αρίθμηση αναφέρεται στην RSK1). Η φωσφορυλίωση της Thr573, οδηγεί στην ενεργοποίηση του CTKD, το οποίο αυτοφωσφορυλιώνει τη Ser380 που βρίσκεται μέσα σε ένα υδρόφοβο μοτίβο στην περιοχή συνδέτη. Η φωσφορυλίωση αυτή, είναι κομβική καθώς στρατολογεί την PDK-1, η οποία συνδέεται στο σημείο πρόσδεσης που δημιουργείται, μέσω της θηλίας PIF που διαθέτει. Έτσι, η πρόσδεση αυτή επιτρέπει στην PDK-1 να φωσφορυλιώσει τη Ser221 στο βρόχο ενεργοποίησης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του NTKD και τελικά στην πλήρη ενεργοποίηση της RSK. Αυτή η περίπτωση αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα, όπου η PDK-1 είναι ανεξάρτητη από

την ενεργοποίηση της PI3K για να φωσφορυλιώσει κάποιο υπόστρωμα. Συμπερασματικά η PDK-1 καθίσταται απαραίτητη για την ενεργοποίηση της RSK, διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο σε αυτή (Houles & Roux, 2018).

Με τη σειρά τους οι RSK προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (BAD και DAPK ) και γενικότερα ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής ανάπτυξης και της μετανάστευσης (Santarpia et al., 2012).



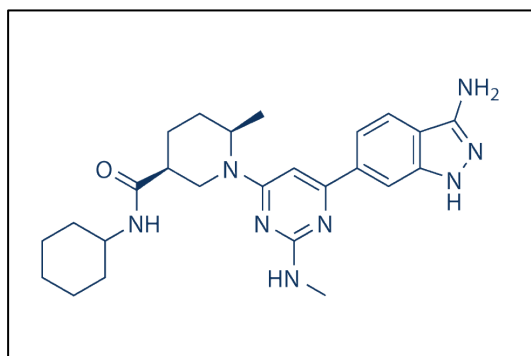
Εικόνα 14: Γεγονότα ενεργοποίησης των RSK (Youn et al., 2021) .

#### 1.4.4 ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ PDK-1

##### ι. Φαρμακολογικοί αναστολείς

Από την ανακάλυψή του το 1997, το PDK-1 έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας. Είναι αλήθεια ότι η ερευνητική κοινότητα εστιάζει σε διαφορετικά στοιχεία του μονοπατιού PI3K/PDK-1/AKT όπως είναι το mTOR και η AKT. Ωστόσο η αναστολή του PDK-1 έχει ένα πλεονέκτημα σε σχέση με αυτά, λόγω του γεγονότος ότι ως βασικός ρυθμιστής ελέγχει έναν εντυπωσιακό αριθμό άλλων κινασών. Επιπλέον, είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η PDK-1 ενεργοποιεί ένα μοναδικό μονοπάτι σηματοδότησης διαφορετικό από τα κανονικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την AKT και το PI3K, όπως το RAS/MAPK. Το γεγονός επίσης ότι η πρωτεΐνη υπάρχει σε μία μόνο ισομορφή την καθιστά ακόμη πιο ελκυστικό στόχο για αναστολή σε κακοήθειες καταστάσεις. Μέχρι σήμερα έχουν δημιουργηθεί αρκετοί χημικοί αναστολείς της PDK-1 ( PHT-427, BX912, BX-795, BX-320, OSU-03012 και άλλοι) με παρόμοιους ή/και διαφορετικούς στόχους δράσης όσον αφορά τη δομή της. Εκείνος όμως που παρουσιάζει μέχρι στιγμής εξαιρετικά ερευνητικό ενδιαφέρον είναι ο

GSK2334470 μια ουσία που σαν χημική ένωση ανήκει στο φάσμα των ινδαζολών, οι οποίες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις. Η πλήρης ονομασία του GSK2334470 κατά το UIPAC είναι (3S,6R)-1-(6-(3-αμινο-1H-ινδαζολ-6-υλ)-2-(μεθυλαμινο)πυριμιδιν-4-υλ)-N-κυκλοεξυλ-6 μεθυλπιπεριδινό-3-καρβοξαμίδιο, ο μοριακός της τύπος (C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O) και η στερεοχημική του δομή απεικονίζεται παρακάτω.



Εικόνα 15: Στερεοχημική απεικόνιση της GSK2334470 (Catalog No.S7087, selleckchem)

Ο GSK2334470 δημιουργήθηκε από την GlaxoSmithKline και έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία σαν ένας αναστολέας της PDK-1 κινάσης, ο οποίος μπορεί να την αναστείλει αποτελεσματικά ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (IC<sub>50</sub> ≈ 10 nM), χωρίς να αναστέλλει τη δραστηριότητα 93 άλλων πρωτεϊνικών κινασών, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας 13 πρωτεϊνικών κινασών της οικογένειας AGC (Najafon et al., 2011a). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι πρόκειται για έναν εξαιρετικά ειδικό και ισχυρό αναστολέα της PDK-1 (Yang et al., 2017).

Μελέτες για την ανασταλτική δράση του GSK2334470 εξελίσσονται τα τελευταία χρόνια στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου λαμβάνει χώρα και η παρούσα διπλωματική εργασία. Οι έρευνες έχουν εστιαστεί στον παγκρεατικό καρκίνο και πιο συγκεκριμένα στη καρκινική κυτταρική σειρά PANC-1 όπου εξελίσσονται κυτταροτοξικές μελέτες ώστε να διερευνηθεί η φαρμακολογική του δράση, η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία δρα ο εν λόγω αναστολέας, αλλά και ο υπολογισμός της ικανότητάς του να αναστέλλει τόσο την δημιουργία αποικιών όσο και τη μεταναστευτική ικανότητα των υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων.

Η επώαση με αυτόν τον ειδικό αναστολέα για την PDK-1 (GSK2334470) είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή δημιουργίας αποικιών και την κυτταροστατική δράση του αναστολέα καταστέλλοντας την μεταναστευτική ικανότητα των PANC-1 κυττάρων in vitro. Επιπροσθέτως, η δράση του αναστολέα στις διάφορες συγκεντρώσεις που εξετάστηκε είχε σαν αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου στην G0/1 φάση (G1 arrest) και στα ασύγχρονα PANC-1 κύτταρα (δηλαδή κύτταρα που βρίσκονται σε φυσιολογικό κύκλο) αλλά και σε συγχρονισμένα κύτταρα στην G0/1 φάση. Για τον λόγο αυτό, έγινε προσπάθεια περαιτέρω επιβεβαίωσης των παραπάνω αποτελεσμάτων χωρίς τη χρήση αναστολέα αλλά ύστερα από αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1.

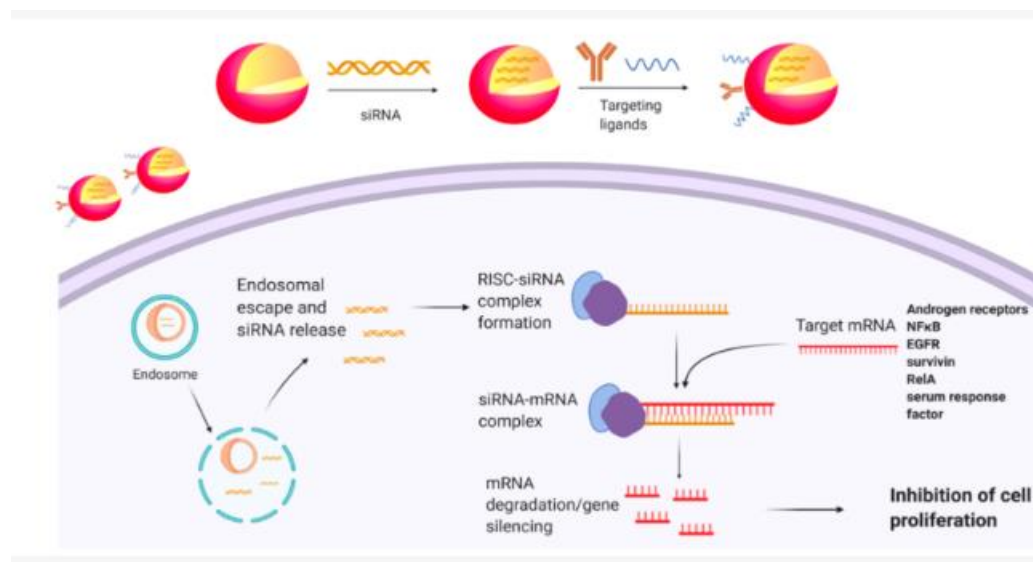
## ii. Γονιδιακή αποσιώπηση

Ένας τρόπος να επιτευχθεί η γονιδιακή αποσιώπηση σε μετα-μεταγραφικό στάδιο είναι μέσω μιας ενδογενούς κυτταρικής διεργασίας που ονομάζεται παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi) (W. Xu et al., 2019). Ο μηχανισμός RNAi πυροδοτείται από την παρουσία μικρών δίκλωνων μορίων RNA στο κύτταρο (μήκους περίπου 21-25 νουκλεοτιδικών ζευγών), τα οποία ονομάζονται μικρά παρεμβατικά RNA (small interfering RNA, siRNA). Τα siRNA μετά την εισαγωγή τους στο κύτταρο αγκυρώνονται πάνω σε ένα ειδικό σύμπλοκο πρωτεϊνών που είναι γνωστό ως RISC (RNA-induced silencing complex). Το RISC απορρίπτει τη μια έλικα του δίκλωνου siRNA χάρη στη μεσολάβηση ενός συστατικού του, του Argonaut 2 (AGO2), και στη συνέχεια περιπολεί στο κυτταρόπλασμα αναζητώντας μόρια mRNA τα οποία έχουν συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων με το siRNA που μεταφέρει. Όταν λοιπόν εντοπιστεί το συμπληρωματικό μόριο mRNA προσδένεται στο RISC και καταστρέφεται, καθώς διασπάται σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δεν μπορούν πλέον να μεταφραστούν σε λειτουργικό πολυπεπτίδιο δηλαδή σε μία πρωτεΐνη. Έπειτα, το RISC καθίσταται ξανά διαθέσιμο να επαναλάβει εκ νέου τη διαδικασία. Ένα μόνο μόριο siRNA, ως τμήμα του RISC, μπορεί να καταστρέφει το ένα μόριο mRNA μετά το άλλο, εμποδίζοντας έτσι αποτελεσματικά την παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης (Saurabh et al., 2014).

Η παρεμβολή του RNA χρησιμοποιείται από μεγάλη ποικιλία οργανισμών και αποτελεί έναν φυσικό, αρχέγονο αμυντικό μηχανισμό. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε αρχικά τη δεκαετία του '90 στο νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* και το 1998 το πρώτο άρθρο που αφορούσε αυτό το φαινόμενο, δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό *Nature* με τίτλο "Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in *C.elegans*" (Fire et al., 1998). Το 2006 οι επιστήμονες Andrew Z. Fire και Craig C. Mello που ανακάλυψαν το φαινόμενο βραβεύτηκαν με το βραβείο Nobel. Η ανακάλυψη αυτής της ενδογενούς διεργασίας έδωσε μετέπειτα σε ερευνητές τη δυνατότητα να εκμεταλλευτούν το φυσικό μηχανισμό RNAi προκειμένου να αδρανοποιήσουν την έκφραση ενός γονιδίου, χρησιμοποιώντας συνθετικά siRNA με αλληλουχία συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία ενός mRNA-στόχου. Στη συνέχεια το mRNA-στόχος κατακερματίζεται και αποτρέπεται αποτελεσματικά η μετάφρασή του σε λειτουργική πρωτεΐνη. Αυτή η μέθοδος προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους γονιδιακής θεραπείας (W. Xu et al., 2019).

Ένα από αυτά είναι πως τα siRNA δεν αλληλοεπιδρούν με το χρωμοσωμικό DNA καθώς η παρεμβολή του RNA γίνεται σε μετα-μεταγραφικό στάδιο εκτός του κυτταρικού πυρήνα, γεγονός που μειώνει σημαντικά ανησυχίες σχετικά με πιθανές αλλοιώσεις του γονιδιώματος. Ακόμα, εάν χρησιμοποιηθούν κατάλληλα σχεδιασμένα siRNA, θεωρητικά μπορεί ο μηχανισμός RNAi να αξιοποιηθεί για τη αποσιώπηση σχεδόν οποιουδήποτε γονιδίου, προσφέροντας έτσι ένα πολύ ευρύ φάσμα θεραπευτικών δυνατοτήτων σε σχέση με τα κλασικά φάρμακα (de Fougères et al., 2007).

Έτσι ο μηχανισμός RNAi μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την αποσιώπηση γονιδίων που εμπλέκονται στη καρκινογένεση (Εικόνα 16) (Bahreyni & Luo, 2020). Καταληκτικά, αξιοποιώντας τους παραπάνω μηχανισμούς, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, έγινε χρήση ιδανικά σχεδιασμένων siRNAs σκοπό τη αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, την PDK-1. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι να διερευνηθεί εάν αυτή η μετα-μεταγραφική τροποποίηση μπορεί να επιφέρει μεταβολές στις πολλαπλασιαστικές ικανότητες των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1, ελέγχοντας τη δυνατότητα τους να σχηματίζουν αποικίες και να μεταναστεύουν.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της παρεμβολής του RNA (Bahreyni & Luo, 2020)/

## 2.ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση προκαταρκτικά πειράματα δυο διπλωματικών εργασιών (Γ. Κωτσόπουλος, Χ. Μασούρα) του εργαστηρίου μας, ο ειδικός αναστολέας για την PDK-1, GSK2334470 έδειξε σημαντική αντικαρκινική δράση *in vitro*, έναντι των ανθρώπινων παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων της σειράς PANC-1. Συγκεκριμένα, ο GSK2334470 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων καθώς και την ικανότητα τους να μεταναστεύουν και να δημιουργούν αποικίες, προκαλώντας G1-arrest μέσω αναστολής κομβικών κινασών (όπως GSK3a και Cyclin D1) που εμπλέκονται στα μονοπάτια PI3K και Ras/MAPK. Επομένως, η στόχευση και αναστολή της κινάσης PDK-1 αποτέλεσε πολλά υποσχόμενο εργαλείο που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί έναντι του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου αυτής της κινάσης.

Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της Φωσφοϊνσιτιδίο-εξαρτώμενης κινάσης-1 ή αλλιώς PDK-1 στο παγκρεατικό καρκίνο. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια αποσιώπησης του γονιδίου PDPK-1 σε μεταμεταγραφικό επίπεδο μέσω μιας ενδογενούς κυτταρικής διεργασίας που ονομάζεται παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi) προκειμένου να αναλυθεί η πολλαπλασιαστική ικανότητα και η συμπεριφορά των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1 απουσία της κινάσης PDK-1. Το γεγονός αυτό μπορεί να δώσει ενδιαφέρον πληροφορίες για τη κρισιμότητα του ρόλου της PDK-1 σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ανάπτυξη, η δημιουργία αποικιών και η ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων στον παγκρεατικό καρκίνο.

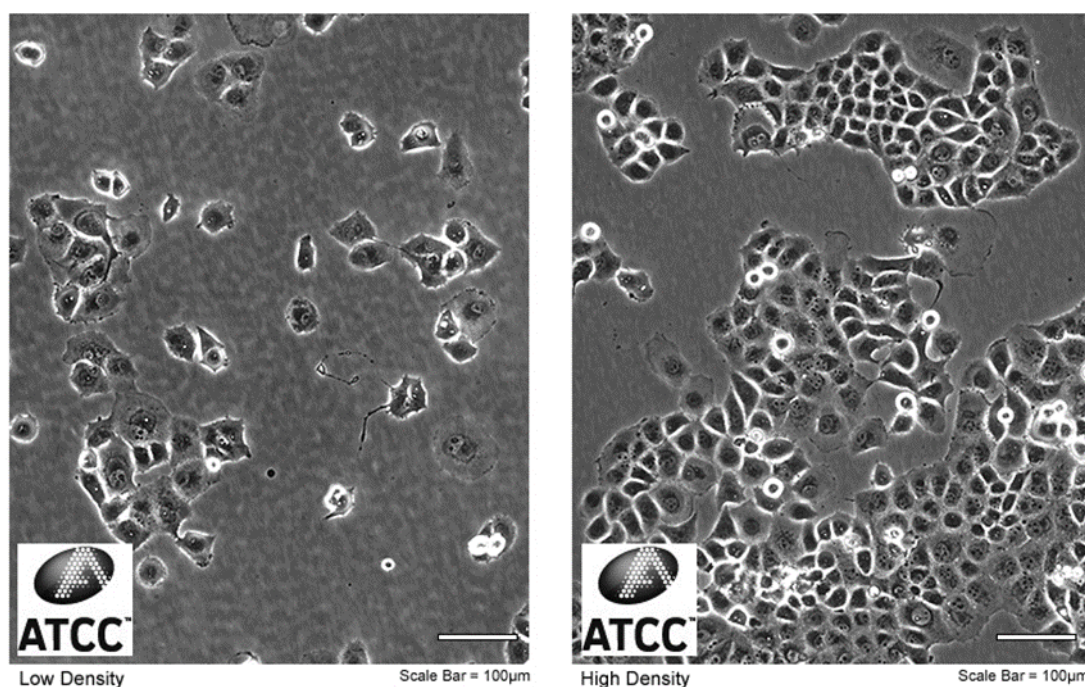
## 3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

#### 3.1.1 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ PANC-1

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων την παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά PANC-1 (Εικόνα 17) η οποία είναι μια εγκαθιδρυμένη παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος και συγκεκριμένα από κύτταρα του παγκρεατικού πόρου. Αντιπροσωπεύει συγκεκριμένα τον τύπο του καρκίνου που εντοπίζεται στον εξωκρινή αδένα του παγκρέατος, που αποτελεί και την πιο συνήθη μορφή παγκρεατικού καρκίνου όπως προαναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος.

ATCC Number: **CRL-1469**™  
Designation: **PANC-1**



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της κυτταρικής σειράς PANC-1 ( PANC-1 | ATCC)

#### 3.1.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Κατά την διεξαγωγή της κυτταροκαλλιέργειας των PANC-1 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αναλώσιμα υλικά:

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640- [Gibco, κωδικός: 2194780]
- Εμβρυϊκός ορός μοσχαριού σε περιεκτικότητα 5% (FBS: Fetal Bovine Serum)- [PanBiotec, κωδικός: P30-3306]
- 1% L-γλουταμίνη -[Gibco, κωδικός: 2165253]
- 1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη- [Gibco, κωδικός: 2145465]
- Θρυψίνη- [Gibco, κωδικός: 15090-046]
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide) -[ThermoFisher Scientific, κωδικός: 0N013586]

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Φλάσκες T25 (25 cm<sup>2</sup> επιφάνεια)- [Thermo Scientific, κωδικός: 169389]
- Πιπέτες των 5 ml- [Corning Costar Incorporated, κωδικός: 4051]
- Πιάτο 6 θέσεων (six wells)
- Φιαλίδια (Falcon) -[Corning, κωδικός: 430921]
- Φιαλίδια του 1,5 ml (Eppendorfs) -[Thermo Scientific, κωδικός: 3456]
- Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials)-[ Corning, κωδικός: 430487]

Η Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη είναι δύο ουσίες που προστίθενται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ώστε να αποτραπούν τυχόν μολύνσεις των κυτταροκαλλιεργειών από μύκητες ή βακτήρια, ενώ η L-γλουταμίνη είναι ένα αμινοξύ που λειτουργεί ως εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα, εξασφαλίζοντας ένα φυσιολογικό περιβάλλον, ώστε να διατηρήσουν τις βασικές μεταβολικές τους λειτουργίες. Το FBS, περιέχει αυξητικούς παράγοντες και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα ανάπτυξης στις *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες, προάγοντας την σωστή και υγιή τους ανάπτυξη και την ταυτόχρονη ενίσχυση και προσκόλληση των κυττάρων. Η θρυψίνη χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης που θα περιγραφεί παρακάτω και είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, που οδηγεί στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε κύτταρα που είναι προσκολλημένα στη φλάσκα-δοχείο καλλιέργειας, ώστε να αποκολληθούν από αυτή. Συγκεκριμένα καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών σε κατάλοιπα λυσίνης (Lys) και αργινίνης (Arg).

### 3.1.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται, παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% επίπεδα υγρασίας, οι οποίες αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες για την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα πειράματα γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα καλλιεργητικά μέσα αποθηκεύονται στο ψυγείο στους 4 °C και πριν τα πειράματα θερμαίνονται στους 37 °C και χρησιμοποιούνται πάντα με αποστειρωμένο εργαστηριακό εξοπλισμό.

### 3.1.4 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η ανανέωση του θρεπτικού μέσου της φλάσκας, πραγματοποιείται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων. Αρχικά, γίνεται απόχυση του περιεχομένου της φλάσκας και στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη φρέσκου θρεπτικού μέσου RPMI, με περιεκτικότητα 5% σε FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικά pen/strep. Για τα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε φλάσκα T75 (75cm<sup>2</sup> επιφάνειας), ωστόσο ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας προστίθενται:

- 14 ml RPMI στις T75 (75cm<sup>2</sup> επιφάνειας)
- 6 ml RPMI στις T25 (25cm<sup>2</sup> επιφάνειας)

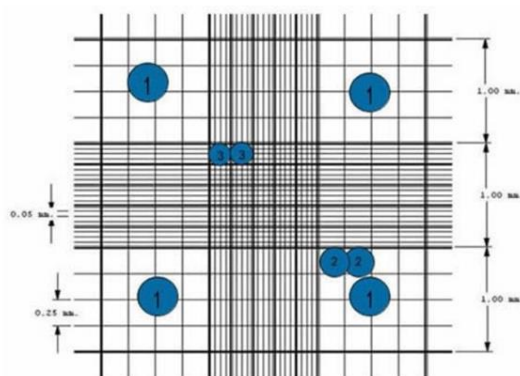
### 3.1.5 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ - ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Όταν η πυκνότητα της κυτταροκαλλιέργειας αγγίζει περίπου το 80%, διεξάγεται η ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Η συχνότητα πραγματοποίησης της διαδικασίας εξαρτάται από το χρόνο διπλασιασμού της εκάστοτε κυτταρικής σειράς. Η διαδικασία ακολουθείται ως εξής:

Αρχικά αποχύνεται το περιεχόμενο της φλάσκας και γίνεται πλύση με χλωριούχο νάτριο (NaCl)-[Demo ABEE, κωδικός: 2107757] για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού FBS, ο οποίος έχει την δυνατότητα να απενεργοποιεί τη θρυψίνη. Έπειτα προστίθενται 2 ml θρυψίνης 1X στη φλάσκα T75, προκειμένου να καλυφθεί όλη η προσκολλημένη επιφάνεια των κυττάρων. Στη συνέχεια πρέπει να ενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης και για το λόγο αυτό πραγματοποιείται επώαση της καλλιέργειας με τη θρυψίνη στον κλίβανο στους 37 °C ώσπου να αποκολληθούν τα κύτταρα. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά. Η επώαση με την θρυψίνη δεν θα πρέπει να ξεπερνά κάποια συγκεκριμένα χρονικά όρια καθώς η θρυψίνη γεράζει και σκοτώνει τα κύτταρα. Ακολούθως, η επωαζόμενη φλάσκα δέχεται με λεπτές κινήσεις ομαλά χτυπήματα στο κάτω μέρος της ώστε να αποκολληθούν και τα τυχόν εναπομείναντα προσκολλημένα κύτταρα. Η επιτυχία της αποκόλλησης των κυττάρων ελέγχεται στο ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40 CFL της εταιρίας Zeiss) του εργαστηρίου. Οι επόμενες πειραματικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρο στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου προστίθεται στη φλάσκα 6 ml RPMI που περιέχει ορό ώστε να απενεργοποιηθεί πλέον η δράση της θρυψίνης. Σημαντικό και αναπόσπαστο βήμα είναι η πολύ καλή ανάδευση με αποστειρωμένη πιπέτα, καθ' όλη την επιφάνεια της φλάσκας, ώστε να απενεργοποιηθούν εξολοκλήρου τα όποια υπολείμματα θρυψίνης. Τέλος με βάση το εκάστοτε ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, προστίθεται η ανάλογη ποσότητα του εναιωρήματος που συλλέχθηκε από την ανάδευση στην φλάσκα και προστίθεται RPMI 5% έως ότου επιτευχθεί ο κατάλληλος τελικός όγκος. Η φλάσκα τοποθετείται εκ νέου στον κλίβανο, ώστε να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν τα εναπομείναντα κύτταρα.

### 3.1.6 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER & ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μια απαραίτητη διαδικασία πριν από κάθε διεξαγωγή ενός πειράματος κυτταροκαλλιέργειας είναι η κατά προσέγγιση καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο είναι μια παχιά γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα (πλάκα Neubauer) και περιλαμβάνει μια κεντρική περιοχή σχεδιασμένη ως θάλαμος μέτρησης. Αυτή η περιοχή χωρίζεται σε 2 θαλάμους μέτρησης. Ο κάθε θάλαμος, αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm.



Εικόνα 18: Πλάκα Neubauer ( <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx>)

Η διαδικασία καταμέτρησης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Συλλογή των κυττάρων μέσω θρυψινοποίησης
2. Πολύ καλή ανάδευση των κυττάρων και μεταφορά 90μl από το δείγμα των κυττάρων σε ένα φιαλίδιο των 1,5ml ((Eppendorf)
3. Σε αυτό το φιαλίδιο με τα κύτταρα γίνεται προσθήκη 10μl από τη χρωστική Trypan Blue [Gibco,ThermoFisher Scientific- κωδικός:15250-061] η οποία έχει την δυνατότητα να βάφει με μπλέ χρώμα τις μεμβράνες των νεκρών κυττάρων στο δείγμα και εξυπηρετεί τη διάκριση των ζωντανών κυττάρων, τα οποία απεικονίζονται με έντονο φωτεινό άσπρο προς κίτρινο χρώμα
4. Προκειμένου να μην διασκορπιστεί το δείγμα και να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο θάλαμο μέτρησης της πλάκας Neubauer τοποθετείται πάνω σε αυτόν μία ειδική πλαστική καλυπτρίδα.
5. Ακολουθώς γίνεται καλή ανάδευση του φιαλιδίου με το δείγμα κυττάρων και εξάγεται από αυτό μια ποσότητα της τάξεως των 20μl τα οποία προστίθενται με προσοχή πάνω στην πλάκα μέσω μίας εσοχής που δημιουργείται από την καλυπτρίδα πάνω στην πλάκα.
6. Παρατηρώντας την πλάκα Neubauer κάτω από το μικροσκόπιο γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη ενός σταυρού. Γύρω από αυτόν τον σταυρό σχηματίζονται 4 περιοχές ή αλλιώς τεταρτημόρια (αποτελούμενα από 16 πιο μικρά τετράγωνα) στα οποία γίνεται και η καταμέτρηση των κυττάρων. Δεκτά στη καταμέτρηση γίνονται τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των ορίων των τεσσάρων τεταρτημορίων.
7. Η αναγωγή των ζωντανών κυττάρων που μετρήθηκαν σε αυτά του αρχικού δείγματος υπολογίζεται μέσω μιας μαθηματικής εξίσωσης που αναγράφεται παρακάτω:

$$\text{Αριθμός κυττάρων: } \frac{x}{4} * 10^4 * y$$

Όπου x: ο αριθμός των κυττάρων που μετρήσαμε συνολικά και στα 4 τεταρτημόρια

Όπου y: Είναι η αραιώση από τα κύτταρα προς μέτρηση (10:1 στη συγκεκριμένη περίπτωση)

### 3.1.7 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε πολλές περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητη η ψύξη των κυττάρων, για τη μακροχρόνια αποθήκευση κυτταρικών σειρών, με σκοπό την αποφυγή μολύνσεων, γήρανσης και ελαχιστοποίηση της γενετικής παρέκκλισης. Προκειμένου να επιτευχθεί η κατάψυξη των κυττάρων είναι αναγκαίος ένας κρυοπροστατευτικός παράγοντας, που τα προστατεύει από συνθήκες ικανές να αποβούν θανατηφόρες για αυτά λόγω της απότομης πτώσης της θερμοκρασίας. Πρόκειται για τον παράγοντα DMSO (dimethylsulfoxide), του οποίου ο ρόλος είναι να οδηγήσει σε μια πιο αργή και σταδιακή ψύξη των κυττάρων. Το σταδιακό πάγωμα μειώνει το φαινόμενο σχηματισμού κρυστάλλων και του τραυματισμού τους. Πρέπει να αναφερθεί ωστόσο, ότι το 99,8% DMSO που χρησιμοποιείται είναι τοξικό για τα κύτταρα και για το λόγο αυτό ενδείκνυται η ανάμιξη του μαζί με FBS ορό. Έτσι, δημιουργείται ένα μείγμα περιεκτικότητας 90% FBS και 10% DMSO το οποίο καλείται μέσο παγώματος ή “freezing medium”.

Σημαντική προϋπόθεση στην διαδικασία της κατάψυξης των κυττάρων είναι η κυτταροκαλλιέργεια να βρίσκεται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων και να μην έχουν γίνει πολλά περάσματα σε αριθμό. Για να γίνει η ψύξη τους, ακολουθούνται τα βήματα που αναφέρθηκαν στην ανακαλλιέργεια στο κομμάτι 3.1.5 της διπλωματικής εργασίας και έπειτα ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Το εναιώρημα των κυττάρων που συλλέχθηκε με την ανάδευση, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 1200 στροφές.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναιωρείται το ίζημα. Σε αυτό προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα freezing medium (περίπου 1 ml ανά  $4 \times 10^6$  cells) στάγδην ώστε να προληφθεί το επικείμενο κυτταρικό στρες.
- Τέλος, το μείγμα με τα κύτταρα στο μέσο παγώματος μεταφέρεται σε φυαλίδιο κατάψυξης (cryovial), σε ποσότητα του 1ml και τοποθετούνται σε συσκευή ισοπροπανόλης για σταδιακή ψύξη. Η τελική αποθήκευση γίνεται στη κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.8 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μια διαδικασία εξίσου σημαντική με την κατάψυξη των κυττάρων και που χρήζει λεπτών και προσεκτικών χειρισμών, είναι και η απόψυξή τους από τους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Κατά την απόψυξη, είναι απαραίτητο να διατηρηθεί στο έπακρο η ακεραιότητα των κυττάρων και για το λόγο αυτό πρέπει να πραγματοποιηθούν ταχύτατα βήματα όπως περιγράφονται ακολούθως:

- i. Πρωτίστως γίνεται ήπια ανάδευση στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για περίπου 1 λεπτό με σκοπό να ξεπαγώσει το περιεχόμενο του cryovial.
- ii. Στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής γίνεται μεταφορά του περιεχομένου σε σωληνάριο (falcon) και σε αυτό προστίθενται στάγδην 5 ml RPMI . Έπειτα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 900 στροφές ανά λεπτό.
- iii. Αφού τελιώσει η φυγοκέντρηση, αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται.

- iv. Προστίθενται 5 ml RPMI και μεταφέρεται προσεκτικά σε μια φλάσκα όπου συμπληρώνεται RPMI μέχρι τελικού όγκου 14 ml. Η φλάσκα τοποθετείται εν τέλη στον κλίβανο με σκοπό την εκ νέου επώαση των κυττάρων.

### 3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ PDK-1

Με την πειραματική μέθοδο αποσιώπησης της κινάσης PDK-1, επιχειρήθηκε η αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη κινάση ώστε να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες της επίδρασης της σίγησης αυτής, στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1.

Η αποσιώπηση του mRNA επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης κατάλληλου siRNA [FlexiTube siRNA-NM\_002613 NM. AAGCGGTTAGGCTGTGAGGAA SI00605780 Hs\_PDPK1\_8]ειδικού για την κινάση PDK-1, καθώς και τη χρήση ενός negative control siRNA [AllStars Negative Control siRNA (5 nmol)], το οποίο, αποτελεί συνήθως ένα μη στοχευόμενο μόριο siRNA που είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να μην στοχεύει καμία αλληλουχία. Το τελευταίο χρησιμοποιείται δηλαδή, για τον προσδιορισμό των μη ειδικών επιδράσεων της επιμόλυνσης με siRNA και για σύγκριση με τα κύτταρα που έχουν υποστεί επεξεργασία με siRNA. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον κύτταρα PANC-1 που δε φέρουν καμία τροποποίηση (Untreated). Για το σκοπό της επιμόλυνσης των κυττάρων με τις παραπάνω αλληλουχίες, χρησιμοποιείται η λιποαφεκταμίνη (Lipofectamine 2000)-[Invitrogen by Thermo Fischer Scientific:11668-030], η οποία είναι ένα κατιονικό αντιδραστήριο με βάση το λιπόσωμα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρέχει in vitro υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης και υψηλά επίπεδα έκφρασης διαγονιδίων (Brian Dalby et al., 2004).

Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής:

- i. Ημέρα 1<sup>η</sup>

Τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1 συλλέγονται με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και στρώνονται σε πιάτα 6 θέσεων (six well plates) με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί πυκνότητα περίπου 60 % σε κάθε πηγάδι (το ποσοστό διαφέρει ανάλογα με τη κυτταρική σειρά που μελετάται). Στη προκειμένη περίπτωση στρώθηκαν περίπου 150.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 2 ml.

Έπειτα τα πιάτα 6 θέσεων τοποθετούνται στο κλίβανο (θερμοκρασία 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% επίπεδα υγρασίας) για 24 ώρες ώστε τα κύτταρα να κολλήσουν στην επιφάνεια των πηγαδιών. Στα πηγάδια προστέθηκε θρεπτικό μέσο (RPMI) με 5% FBS και 1% L-glutamine, χωρίς όμως την παρουσία αντιβιοτικών όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη.

- ii. Ημέρα 2<sup>η</sup>

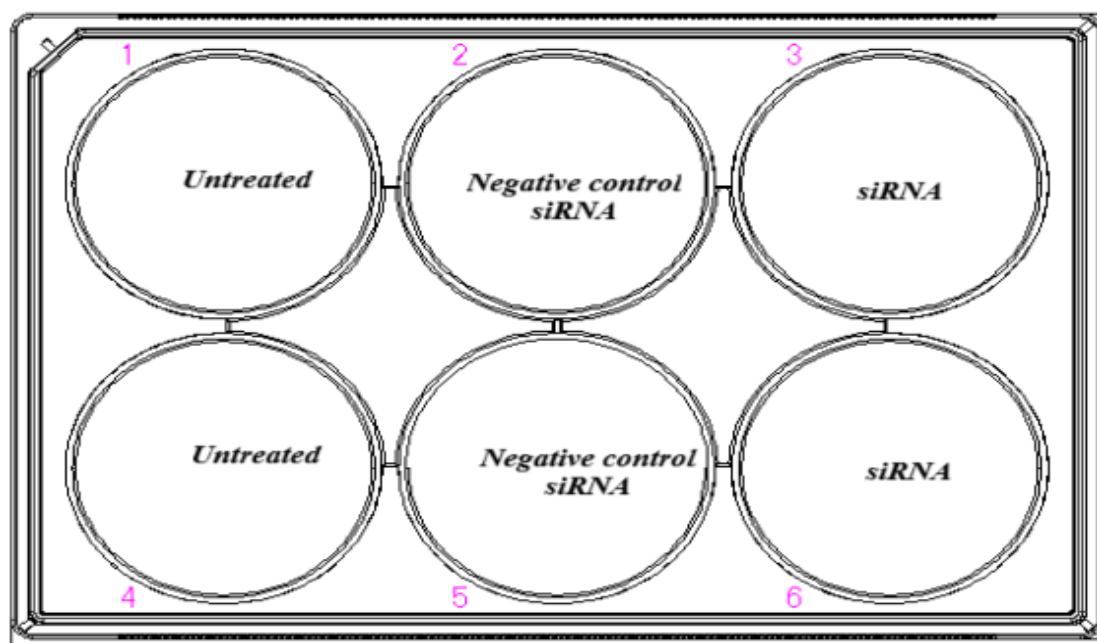
Ξεκινάει η προετοιμασία των απαραίτητων διαλυμάτων για τη πειραματική διαδικασία. Τα διαλύματα που παρασκευάζονται είναι απαραίτητα για την επιμόλυνση των κυττάρων τόσο με το siRNA όσο και με το αντίστοιχο negative control siRNA. Ύστερα

από τους κατάλληλους υπολογισμούς βρέθηκε ότι ο τελικός όγκος κάθε πηγαδιού θα είναι 2 ml, από τα οποία τα 1750μl θα είναι το θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών) και 250μl από τα μείγματα που θα περιέχουν το siRNA ή το negative control siRNA αντίστοιχα.

Τόσο το μείγμα που περιέχει το siRNA όσο και αυτό που περιέχει το negative control (Εικόνα 19), αποτελούνται από λιποαφεκταμίνη (Lipofectamine 2000. Τα δύο αυτά μείγματα περιέχουν επίσης το μέσο Opti-Mem™ [Gibco™, Catalog number: 31985062] το οποίο είναι ένα μέσο μειωμένου ορού που χρησιμοποιείται κατά τη επιμόλυνση γενετικών μορίων σε κύτταρα θηλαστικών (Rashid & Coombs, 2019). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20) αναπαρίσταται ο σχεδιασμός του πειράματος της αποσιώπησης του mRNA που κωδικοποιεί την PDK-1, ο οποίος περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 19: Τα φιαλίδια που περιέχουν siRNA και το negative control siRNA που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση ενός πιάτου 6 θέσεων με το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού .

Αν λοιπόν το πείραμα απαιτεί τη δημιουργία δύο πιάτα 6 θέσεων που έχουν την μορφή της παραπάνω εικόνας (εικόνα 20) θα προετοιμαστούν 4 erppendorfs με τις εξής αναλογίες:

- i. Erppendorf 1: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem<sup>TM</sup> + 10 μl siRNA
- ii. Erppendorf 2: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem<sup>TM</sup> + 10 μl negative control siRNA
- iii. Erppendorf 3: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem<sup>TM</sup> + 10 μl Lipofectamine
- iv. Erppendorf 4: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem<sup>TM</sup> + 10 μl Lipofectamine

Επόμενη κίνηση είναι η μεταφορά του περιεχομένου του Erppendorf 1 στο Erppendorf 3 και αντίστοιχα το περιεχόμενο του Erppendorf 2 στο Erppendorf 4. Τα δύο τελικά Erppendorfs (3και 4) έχουν πλέον τελικό όγκο 1ml το καθένα και αποτελούνται από 980μl Opti-Mem<sup>TM</sup>, 10μl Lipofectamine και 10μl siRNA ή 10μl negative control siRNA αντίστοιχα. Τα δύο Erppendorfs επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Κατά την δεκαπεντάλεπτη αναμονή απορρίπτεται το περιεχόμενο σε θρεπτικό μέσο των πιάτων 6 θέσεων και κάθε πηγάδι ξεπλένεται με 1ml φυσιολογικό ορό προσεκτικά ώστε να μην αποκολληθούν τα προσκολλημένα κύτταρα στα πηγάδια.

Έπειτα κατανέμονται στα πηγάδια οι εξής αναλογίες διαλυμάτων:

- i. Στα πηγάδια με τα δείγματα ελέγχου, χωρίς καμία προσθήκη siRNA ή negative control (Untreated) προστίθενται 250μl Opti-Mem<sup>TM</sup> + 1750μl θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών)
- ii. Στα πηγάδια με το siRNA προστίθενται 250μl από το Erppendorf 3 + 1750μl θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών)
- iii. Στα πηγάδια με το negative control siRNA προστίθενται 250μl από το Erppendorf 4 + 1750μl θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών)

Τέλος τα πιάτα 6 θέσεων τοποθετούνται για επώαση στον κλίβανο (θερμοκρασία 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% επίπεδα υγρασίας) για το χρονικό διάστημα που απαιτεί το πείραμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση εξετάστηκαν συγκεκριμένα time points στις 48, 52, 56 και 72 ώρες επώασης με το siRNA. Με το πέρας του χρονικού πλαισίου που ορίζεται λαμβάνονται κύτταρα με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης για να χρησιμοποιηθούν σε ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western, η κυτταρομετρία ροής, η δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών και δημιουργία αποικιών.

### 3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN- WESTERN BLOT

#### 3.3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΛΥΜΑΤΩΝ

Η δημιουργία λυμάτων είναι μια πειραματική διαδικασία που ακολουθείται προκειμένου να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα της διαδικασίας που περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα (3.2) με σκοπό την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών που μελετώνται στο πείραμα μέσω της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης κατά "Western blot". Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν λύματα για τα κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την PDK-1, κύτταρα που δεν έχουν υποστεί τη αποσιώπηση και φέρουν την ειδική αλληλουχία negative control siRNA και κύτταρα που δεν έχουν υποστεί καμία τροποποίηση (untreated) για 48 και 72 ώρες επώασης, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αποσιώπησης του επιθυμητής πρωτεΐνης. Πριν τη δημιουργία των λυμάτων, προηγείται μια διαδικασία, συλλογής και καθαρισμού των κυττάρων ως εξής:

- i. Πρώτα συλλέγεται το εναιώρημα από το αντίστοιχο πηγάδι του πιάτου 6 θέσεων, σε falcon των 15 ml.
- ii. Γίνεται πλύση με 2 ml NaCl 2 φορές με τη χρήση πιπέτας του 1 ml.
- iii. Προστίθεται 1 ml θρυψίνης 1X και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- iv. Έπειτα, το πιάτο 6 θέσεων, αποσύρεται από τον κλίβανο και προστίθενται σε αυτό 2 ml εναιωρήματος από το falcon, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη, ακολούθως, γίνεται ανάδευση με την πιπέτα, συλλογή και επιστροφή της ποσότητας στο falcon.
- v. Στη συνέχεια, γίνεται πλύση του αντίστοιχου πηγαδιού με 1 ml NaCl με πιπέτα, συλλογή της ποσότητας και προσθήκη στο falcon, για να μειωθεί όσο είναι δυνατόν η απώλεια κυττάρων.
- vi. Ακολούθως το κάθε πηγάδι ελέγχεται στο μικροσκόπιο, για να διαπιστωθεί εάν έχε γίνει συλλογή όλων των κυττάρων που αποκολλήθηκαν.
- vii. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μετρούνται με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer .
- viii. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 λεπτά).
- ix. Μετά από τη φυγοκέντρηση, γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 5 ml NaCl στο ίζημα των κυττάρων.
- x. Ακολουθεί άλλη μια φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 λεπτά).
- xi. Τέλος, μετά από τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα αποθηκεύεται στους -80°C, έως ότου πραγματοποιηθεί η διαδικασία της λύσης.

Η λύση των κυττάρων απαιτεί αρχικά την χρήση ενός Lysis Buffer το οποίο προκύπτει από την ανάμιξη ενός διαλύματος που χρησιμοποιείται για τη λύση κυττάρων και ιστών, RIPA 1X [RIPA Buffer, Cell signaling #9806S] και ενός διαλύματος που προάγει την αναστολή φωσφατασών και πρωτεασών (PI, Phosphate/Protease Inhibitors- Cell signaling #5872S).

Στο κάθε εξεταζόμενο δείγμα κυττάρων τα οποία προέκυψαν από τη παραπάνω διαδικασία προστίθεται Lysis Buffer σε αναλογία 60μl ανα 10<sup>6</sup> κύτταρα. Απαραίτητη

προϋπόθεση καθ' όλη την χρονική διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι τα δείγματα να βρίσκονται τοποθετημένα σε πάγο ώστε να δράσουν τα ένζυμα που εμπεριέχονται στο Lysis Buffer. Με την προσθήκη αυτού του διαλύματος λύσης ακολουθούν τα εξής βήματα:

- i. Επώαση δειγμάτων στο πάγο για 30 λεπτά.
- ii. Ταυτόχρονη δυνατή και συχνή ανάδευσή τους σε εργαστηριακό Vortex με σκοπό την όσο καλύτερη επίτευξη της ομοιογένειάς τους αλλά και την επιτυχή δράση των ενζύμων που έχουν προστεθεί.
- iii. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 στροφές ανα λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C.
- iv. Με το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf του 1,5 ml και επαναλαμβάνεται το 3ο βήμα. Σκοπός είναι να παρατηρηθεί ένα διαυγές υπερκείμενο. Σε περίπτωση που δεν είναι διαυγές επαναλαμβάνεται εκ νέου το βήμα 4.
- v. Επακόλουθη επαναμεταφορά σε νέο eppendorf του 1,5 ml και τελικώς αποθήκευση στους -80 °C.

### 3.3.2 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD : ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Με το πέρας της διαδικασίας λύσης των κυττάρων είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση του κάθε λύματος. Προκειμένου να εξυπηρετηθεί αυτός ο σκοπός πραγματοποιείται η ποσοτική μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει την χρήση ενός ειδικού kit [Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo,23227)] και βασίζεται στη δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης βασισμένης σε γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, την αλβουμίνη. Η μέτρηση γίνεται έμμεσα μέσω φωτομέτρησης σε μήκος κύματος 540nm (single wave) σε φωτόμετρο της Bio-Tek Instruments (Microplate reader, EL311S), με υπολογισμό των συγκεντρώσεων τον υπό μελέτη πρωτεϊνών με την βοήθεια του Microsoft Excel. Πιο αναλυτικά, κατά την διαδικασία της Bradford χρησιμοποιούνται πιάτα 96 θέσεων (96-well plates), όπου σε κάθε πηγαδάκι που θα χρησιμοποιηθεί προστίθενται 5μl του εκάστοτε δείγματος άγνωστης συγκεντρώσεως και 20μl PBS 1X. Στη συνέχεια, σε μια δεύτερη στήλη γίνεται προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων της πρότυπης πρωτεΐνης αλβουμίνης, όπου με βάση αυτή θα υπολογισθούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Ακολούθως σε κάθε πηγάδι προστίθενται 200μl του αντιδραστηρίου AB που εμπεριέχει και την χρωστική Coomassie blue G-250 που έχει την δυνατότητα να προσδένεται στις πρωτεΐνες. Η αναλογία για την κατάλληλη παρασκευή του μίγματος του αντιδραστηρίου είναι A:B=50:1. Το πιάτο επωάζεται έπειτα στον κλίβανο στους 37 °C για μισή ώρα και τέλος, γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος στο φωτόμετρο.

### 3.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη αποσιώπηση του του mRNA που κωδικοποιεί την επιλεγμένη πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Western Blot στα δείγματα που παρασκευάστηκαν έπειτα τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα

3,3,1. Με την τεχνική της Western Blot παρατηρήθηκε η έκφραση της παραγόμενης πρωτεΐνης --1 πριν και μετά τη αποσιώπηση του αντίστοιχου mRNA στα κύτταρα PANC-1-

Πρώτο βήμα για την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης είναι η παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης μέσω του οποίου θα γίνει διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος [SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Electrophoresis Gel)]. Οι πρωτεΐνες που έχουν μικρότερο μοριακό βάρος μετακινούνται πιο γρήγορα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος ενώ εκείνες που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος παρουσιάζουν πιο αργή μετακίνηση. Το παραπάνω πηκτώμα αποτελείται από δύο διαδοχικά κομμάτια. Πιο συγκεκριμένα από ένα πηκτώμα στο οποίο πακετάρονται οι πρωτεΐνες (stacking gel) και από ένα πηκτώμα στο οποίο γίνεται ο επιθυμητός διαχωρισμός των πρωτεϊνών (Running/Resolving gel).

Το πηκτώμα παρασκευάζεται με βάση τα μοριακά βάρη των υπο μελέτη πρωτεϊνών. Στη προκειμένη περίπτωση η πρωτεΐνη που εξετάζεται είναι η PDK-1 με μέγεθος περίπου 58-68 kDa και για το λόγο αυτό ετοιμάστηκαν πηκτώματα διαχωρισμού 8%. Η γενική αρχή στη προετοιμασία ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης ορίζει ότι όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών τόσο μικρότερο είναι το ποσοστό του πηκτώματος διαχωρισμού. Από την άλλη πλευρά το πηκτώμα πακεταρίσματος έχει πάντα πυκνότητα 5%. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πηκτωμάτων αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα.

	Πηκτώμα διαχωρισμού 8%	Πηκτώμα πακεταρίσματος 5%
<b>UpH2O</b>	4,7 ml	5,7 ml
<b>30% Ακρυλαμίδη (Serva, 10687.01)</b>	2,7 ml	1,7 ml
<b>Tris Buffer 1,5M, pH=8,8 (PanRean AppliChem, code: A1086,1000)</b>	2,5 ml	-
<b>Tris Buffer 0,5M, pH= 6,8 (PanRean- AppliChem,code: A1086,1000)</b>	-	2,5 ml
<b>SDS 10% (Sigma, BCBV7969)</b>	100 µl	100 µl
<b>TEMED (Sigma, BCBV7969)</b>	5 µl	5 µl
<b>APS 10% (Ammonium peroxodisulfate, Serva, 13375.01)</b>	50 µl	50 µl

Πίνακας 1: τα αναλόμενα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πηκτωμάτων.

Αναλύοντας τα υλικά του παραπάνω πίνακα αξίζει να αναφερθεί ότι το διάλυμα Tris είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα με συγκεκριμένο pH (πάντα πρέπει να ελέγχεται πριν από κάθε πειραματική διαδικασία) και ότι το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που παίζει σημαντικό ρόλο στην σωστή αποδιάταξη των πρωτεϊνών καθώς και στην

ομοιόμορφη κατανομή του αρνητικού φορτίου. Επίσης, οι πολυμεριστικοί παράγοντες APS ( Ammonium peroxydisulfate) και TEMED, οδηγούν στην πήξη του πηκτώματος και είναι απαραίτητο να προστίθενται πάντα τελευταίοι και ταυτόχρονα στο διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, η πήξη του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης προκύπτει από τον πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός αυτός επάγεται από την παρουσία ελευθέρων ριζών στο διάλυμα, οι οποίες παράγονται από το APS και η αντίδραση σχηματισμού τους καταλύεται από το TEMED.

### 3.3.4 ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών είναι μια πειραματική διαδικασία που έχει ως βάση διαχωρισμό των πρωτεϊνών λόγω της ικανότητας του να μετακινούνται κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Σημαντικός παράγοντας αποτελεί το SDS που προστέθηκε στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες των δειγμάτων δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για τη μετακίνηση τους ανοδικά προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Όπως προαναφέρθηκε οι πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος είναι αυτές που κινούνται πιο γρήγορα στο πήκτωμα σε σχέση με τις αντίστοιχα μεγαλύτερες.

Προκειμένου να προετοιμαστεί το διάλυμα με το οποίο θα φορτωθεί το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπολογίζεται πρωτίστως, μέσω στατιστικών μεθόδων από τα αποτελέσματα της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε από τη διαδικασία Bradford, η απαιτούμενη ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση απαιτούνται 24μg. Έπειτα πρέπει να προετοιμαστούν και τα υπόλοιπα αναλώσιμα που συνιστούν το λεγόμενο "loading buffer" και είναι τα εξής: το ρυθμιστικό διάλυμα Tris base (0,5 M, pH= 6,8), το μπλέ της βρωμοφαινόλης 0,2 %, 20% SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη και γλυκερόλη. Κάθε μια από τις ουσίες είναι απαραίτητη για την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης καθώς το SDS όπως αναφέρθηκε χρησιμεύει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στην αρνητική τους φόρτιση, η β-μερκαπτοαιθανόλη χρησιμεύει στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών, η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων και διευκολύνει το φόρτωμα αυτών σε κάθε πηγάδι του πηκτώματος, ενώ η βρωμοφαινόλη μπλε χρησιμοποιείται ώστε να είναι ορατή η διαδρομή των πρωτεϊνών στο πήκτωμα.

Εν τέλει σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος θα προστεθεί διάλυμα φορτώσεως που αποτελείται από 7μl loading buffer, από τη κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος και από PBS 1X σε αναλογία ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ποσότητα των 28μl τελικού όγκου. Η ποσότητα κάθε ουσίας παρουσιάζεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΑ</b>
<b>SDS 20%</b> ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ) ( <i>PanReac AppliChem, code: L4509-500G</i> )	20μl
<b>Γλυκερόλη</b> ( <i>PanReac AppliChem, code: 1Y012739</i> )	400μl
<b>Βρωμοφαινόλη</b> ( <i>Sigma, code: B0126-5G</i> )	100 μl
<b>Tris 0,5 M</b> ( <i>PanReac AppliChem, code: 0M013429</i> )	100 μl

<b>PBS 1X</b> (Phosphate Buffered Saline 10X) (BioSera, code: MS00HR100N)	Ποσότητα ανάλογη του δείγματος
<b>Marker</b> (Lonza, ProSieve™ QuadColor™ Protein-Marker, 00193837)	20 μl

Πίνακας 2: τα αναλώσιμα υλικά του διαλύματος φορτώσεως.

Μετά τη προετοιμασία τους τα διαλύματα φορτώσεως τοποθετούνται στους 95 °C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη των πολυπεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών στα δείγματα. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο, ώστε να υγροποιηθούν οι υδρατμοί και να ελαχιστοποιηθούν στο μέγιστο δυνατόν οι απώλειες δείγματος. Εν συνεχεία και προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης στη συσκευή προστίθεται διάλυμα διαχωρισμού (Running Buffer) 1X με pH=8.3, το οποίο απαρτίζεται από 900ml απιονισμένο νερό, 144gr γλυκίνη, 30,3gr Tris Base και 10gr SDS. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται σε τάση 100Volt έως ότου το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης να περάσει από τη φάση πακεταρίσματος στη φάση διαχωρισμού όπου και αυξάνεται στα 200Volt για το υπόλοιπο της διαδικασίας.

### 3.3.5 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ MEMBRANE PVDF (TRANSFER)

Το επόμενο σημαντικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας είναι η μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μια μεμβράνη PVDF (διφθοριούχου πολυβινυλιδίνης). Το διάλυμα στο οποίο βασίζεται κατά κόρον αυτή η μέθοδος μεταφοράς των πρωτεϊνών ονομάζεται “Transfer Buffer”, το οποίο αποτελείται από γλυκίνη, μεθανόλη 20%, ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-Base) 25mM και απιονισμένο νερό. Αρχικά, η μεμβράνη τοποθετείται για 15 δευτερόλεπτα υπό ανάδευση σε καθαρή μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επέλθει η ενεργοποίηση της και κατόπιν ξεπλένεται σε καθαρό νερό (ultra pure) και τοποθετείται σε transfer buffer για την εξισορρόπηση της. Το transfer buffer είναι αυτό μέσα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί και η μεταφορά των πρωτεϊνών, με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος σταθερής έντασης της τάξεως των 400mA σε ταυτόχρονη κυμαινόμενη τάση (Volt). Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 75 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα με τη χρωστική Ponceau S., ώστε να διαπιστωθεί αν έγινε με επιτυχία η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη PVDF. Παράλληλα το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης βάφεται με τη χρωστική Coomassie Blue με σκοπό τον έλεγχο παρουσίας εναπομείναντος ποσότητας πρωτεϊνών στο πήκτωμα.

### 3.3.6 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN- WESTERN BLOT

Συνοψίζοντας τα έως τώρα βήματα η ανοσοαποτύπωση κατά Western blot χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και ταυτοποίηση πρωτεϊνών καθώς ένα μείγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται με βάση το μοριακό βάρος κατά μήκος ενός πήκτωματος πολυακρυλαμίδης μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης. Το αποτέλεσμα που προκύπτει μεταφέρεται ακολούθως σε μια μεμβράνη όπου σχηματίζεται μια χαρακτηριστική ζώνη για κάθε πρωτεΐνη. Τρίτο και καταλυτικό βήμα της

ανοσοαποτύπωσης η στόχευση της επιθυμητής πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας το κατάλληλο πρωταρχικό και δευτερεύον αντίσωμα με σκοπό την οπτικοποίηση τελικά του αποτελέσματος (Mahmood & Yang, 2012).

Πιο αναλυτικά, με το πέρας της διαδικασίας της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη και της χρώσης της με το διάλυμα Ponceau S, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό κουτάκι που περιέχει ένα διάλυμα πλύσης [TBST 1X (Tris-Buffered Saline, 0,1% TWEEN® 20 Detergent)] όπου για 10 λεπτά η μεμβράνη τίθεται υπό ανάδευση. Η διαδικασία της πλύσης επαναλαμβάνεται εις τριπλούν και κάθε φορά γίνεται απόχυση του TBST και προστίθεται νέο. Ύστερα η μεμβράνη επωάζεται υπό ανάδευση για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ένα κατάλληλο διάλυμα, γνωστό και ως "blocking buffer" που περιέχει 5% FBS και 1X TBST, ένα διάλυμα το οποίο είναι ικανό να δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Το διάλυμα αυτό συνήθως διαφέρει μεταξύ των διαφόρων αντισωμάτων και ορίζεται ανάλογα με το ενδεδειγμένο πρωτοκόλλο του εκάστοτε αντισώματος.

Ακολούθως, προστίθενται τα πρώτα αντισώματα (Πίνακας 3) στην εκάστοτε μεμβράνη τα οποία και επωάζονται σε θερμοκρασία της τάξεως των 4°C συνήθως σε μία ολονύκτια διαδικασία. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, απομακρύνεται το πρώτο αντίσωμα και η μεμβράνη ξεπλένεται εκ νέου 3 φορές με το διάλυμα TBST. Εν συνεχεία. (Πίνακας 4). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η επιλογή του δεύτερου αντισώματος γίνεται με βάση το πρωτόκολλο που ορίζεται από το πρώτο αντίσωμα.

Πρωτογενές αντίσωμα	Οργανισμός προέλευσης	Αραίωση	Εταιρία
anti-PDK-1	κουνέλι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 13037
anti-actin β	ποντίκι	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 3700

Πίνακας 3: τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Δευτερογενές αντίσωμα	Οργανισμός προέλευσης	Αραίωση	Εταιρία
anti-Rabbit	αίγα	1:10.000	Cell Signaling, κωδικός: 7074
anti-Mouse	άλογο	1:10.000	Cell Signaling, κωδικός: 7893

Πίνακας 4: τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Τέλος, με σκοπό τελικά την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιείται ένα υπόστρωμα ενίσχυσης της χημειοφωταύγειας που ονομάζεται ECL (Biorad, Clarity™ Western ECL Substrate, 170-5060) με το οποίο κάθε μεμβράνη πριν την απεικόνισή της επωάζεται για 5 λεπτά. Η απεικόνιση πραγματοποιείται μέσω χημειοφωταύγειας με την χρήση του μηχανήματος Uvitec Cambridge σε συνδυασμό με το λογισμικό Alliance (Version 16.06). Η διαδικασία της Western Blot πραγματοποιήθηκε από δύο φορές για κάθε διαφορετικό και ανεξάρτητο πείραμα πριν και μετά τη αποσιώπηση της PDK-1. Η ποσοτικοποίηση της απεικόνισης των αποτελεσμάτων σε σχέση με την ακτίνη (housekeeping protein) γίνεται με τη χρήση του προγράμματος Image J, μία διαδικασία γνωστή και ως "πυκνομετρία". Με την βοήθεια του Image J, αρχικά γίνεται η μέτρηση της ακτίνης (actin) η οποία και

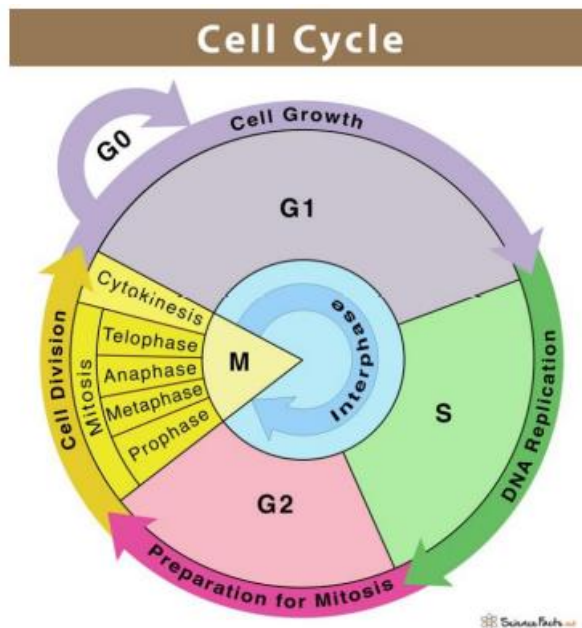
αποτελεί το αντίσωμα αναφοράς (House keeping gene) στην προεχειμένη πειραματική διαδικασία και ορίζει το ισοφόρτωμα των δειγμάτων (προϋπόθεση αποτελεί το ισοφόρτωμα των δειγμάτων).

### 3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

#### 3.4.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Η αναπαραγωγή των κυττάρων συμβαίνει μέσω της διαίρεσης. Κατά την οποία από ένα κύτταρο προκύπτουν δύο θυγατρικά, στη συνέχεια τα θυγατρικά κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος και διαιρούνται με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός κυτταρικού πληθυσμού ο οποίος προέκυψε από ένα αρχικό κύτταρο. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από 4 πλήρως συντηρημένες και ρυθμιζόμενες φάσεις διαδικασίες, την κυτταρική αύξηση όπου μεγαλώνει το κύτταρο σε μέγεθος, την αντιγραφή του DNA όπου διπλασιάζεται το γενετικό υλικό, το διαχωρισμό των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα, και την κυτταρική διαίρεση κατά την οποία τα δύο κύτταρα που προκύπτουν διαχωρίζονται πλήρως.

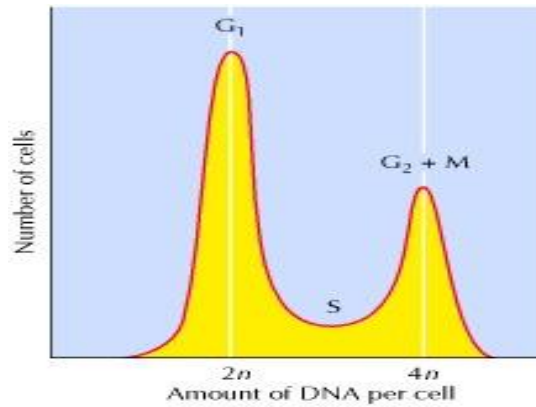
Ο κυτταρικός κύκλος διακρίνεται σε δύο κύριες φάσεις: τη μίτωση και την μεσόφαση. Το 95% του κύκλου καλύπτεται από τη μεσόφαση, ενώ η μίτωση και η κυτταροκίνηση αποτελούν περίπου το 5% της διαδικασίας αυτής (Schafer, 1998). Η μίτωση είναι το πιο σημαντικό στάδιο του κύκλου καθώς σχετίζεται με το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και ολοκληρώνεται με την κυτταρική διαίρεση-κυτοκίνηση. Αποτελείται από 4 φάσεις οι οποίες διαδέχονται αδιάκοπα η μία την άλλη. Αυτές είναι η πρόφαση, η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση. Πιο αναλυτικά η μεσόφαση είναι το διάστημα κατά το οποίο συμβαίνει η κυτταρική αύξηση και η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Μετά τη μίτωση ακολουθεί η φάση G1 ή αλλιώς φάση του 1ου μεσοδιαστήματος η οποία αφορά το διάστημα μεταξύ της μίτωσης και την αντιγραφής του DNA, στη φάση αυτή το κύτταρο αυξάνει σε μάζα και είναι μεταβολικά ενεργό. Έπειτα ακολουθεί η φάση S ή αλλιώς φάση σύνθεσης κατά την οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Τέλος ακολουθεί η φάση G2 ή αλλιώς φάση 2ου μεσοδιαστήματος κατά την οποία συνεχίζεται η αύξηση του κυττάρου και γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση ενώ το κύτταρο ετοιμάζεται για τη μίτωση. Επιπλέον τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν σε μία 4η φάση γνωστή ως G0 κατά την οποία το κύτταρο παραμένει αδρανές, παύει δηλαδή να διαιρείται, ή προορίζεται για απόπτωση (Murray, 1994). Οι περισσότεροι πληθυσμοί κυττάρων δεν βρίσκονται σε συγχρονισμό, δηλαδή μέσα σε έναν ιστό σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή τα κύτταρα βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις.



Εικόνα 21: Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου (Cell Cycle: Definition, Phases, and Diagram n.d.)

### 3.4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία γρήγορη και άμεση μέθοδο ανάλυσης πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα σε κυτταρικούς πληθυσμούς. Μπορεί δηλαδή να μετρηθεί το μέγεθος, η εσωτερική πολυπλοκότητα και η ένταση του φθορισμού ενός κυττάρου. Κάθε κυτταρόμετρο μπορεί να έχει περισσότερες από μία πηγές ακτινοβολίας, με διάφορα μήκη κύματος, οι οποίες παράγουν σκεδασμένο και φθορίζων φωτεινό σήμα το οποίο ανιχνεύεται από ειδικούς ανιχνευτές. Πιο συγκεκριμένα, κατάλληλοι φακοί και πρίσματα κατευθύνουν την δέσμη λέιζερ στα κύτταρα. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διέρχεται από τη δέσμη λέιζερ πραγματοποιείται ένα συμβάν και τότε η ακτινοβολία σκεδάζεται σε δύο κατευθύνσεις ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα και φθορισμός της ακτινοβολίας. Έτσι προκύπτει, ο λεγόμενος εμπρόσθιος σκεδασμός, του οποίου η κατεύθυνση είναι σχεδόν παράλληλη με την κατεύθυνση της αρχικής ακτινοβολίας (Forward Scatter or FSC) και σχετίζεται με το μέγεθος του κυττάρου και ο πλευρικός σκεδασμός με κατεύθυνση 90ο μοιρών σε σχέση με την αρχική (Side Scatter or SSC), ο οποίος σχετίζεται με την πολυπλοκότητα του κυττάρου. Ο σκεδασμός του φωτός είναι ανεξάρτητος του φθορισμού. Στη συνέχεια τα σήματα αυτά μετατρέπονται σε ηλεκτρονικά και αναλύονται μέσω υπολογιστή. Έτσι οι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν να αναλυθούν με βάση το φθορισμό τους ή το σκεδασμό του φωτός. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος που βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανοσολογία, την ιολογία, την μοριακή βιολογία κ.α. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου (McKinnon, 2018), (Givan, 2011), (Darzynkiewicz et al., 2001).



Εικόνα 22: Αναπαράσταση γραφήματος που προκύπτει από την ένταση φθορισμού (ποσότητα DNA) και την ποσότητα κυττάρων. (Cooper & Hausman, 2007).

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου βασίζεται λοιπόν στην ένταση φθορισμού των κυττάρων, η οποία συσχετίζεται με την ποσότητα DNA που περιέχουν. Η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται κατά την S φάση, στην G<sub>2</sub>/M έχει ήδη διπλασιαστεί ενώ στην G<sub>1</sub> φάση είναι η μισή. Η απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου γίνεται σε ιστόγραμμα (μονοπαραμετρικό διάγραμμα) όπου παρουσιάζεται το πλήθος των κυττάρων συναρτήσει της έντασης της χρώσης.

Τέλος πραγματοποιείται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel και συγκεκριμένα, με τη δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test υπολογίζεται η στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία.

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στο παρόν πείραμα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου της καρκινικής κυτταρικής σειράς PANC-1, στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το κατάλληλο siRNA σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, δηλαδή αυτά που έχουν επιμολυνθεί με negative control siRNA και εκείνα που δεν έχουν τροποποιηθεί καθόλου (untreated). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Αρχικά πραγματοποιείται στρώσιμο κυττάρων PANC-1 τα οποία έχουν συλλεχθεί με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης σε πιάτα 6 θέσεων. Πρόκειται συγκεκριμένα για κύτταρα που επιμολύνονται με το κατάλληλο siRNA και αντίστοιχα κύτταρα που επιμολύνονται με negative control siRNA καθώς και κύτταρα untreated. Συγκεκριμένα σε κάθε πηγάδι στρώνονται περίπου 150.000 κύτταρα όπου γίνονται οι απαραίτητες διεργασίες. Στη συνέχεια επωάζονται σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% επίπεδα υγρασίας για τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα (48-52-56-72 ώρες).

Μετά το πέρας του εκάστοτε χρονικού σημείου απομακρύνεται συλλέγονται τα κύτταρα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Συλλογή του θρεπτικού των πηγαδιών σε ένα φιαλίδιο ώστε να μη υπάρχουν απώλειες κυττάρων.
2. Κάθε πηγάδι ξεπλένεται με 1ml NaCl και έπειτα προστίθεται 1 ml θρυψίνης
3. Τοποθέτηση των πιάτων 6 θέσεων στον κλίβανο για μικρό χρονικό διάστημα
4. Προσθήκη 2ml RPMI με περιεκτικότητα 5% FBS, με σκοπό να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται πάλι στο φιαλίδιο.
5. Μέτρηση των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο (Ενότητα 3.1.6), καλή και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 14000 στροφές για 10 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, πλύση με NaCl και φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για επιπλέον 10 λεπτά.
7. Αφού απομακρυνθεί το NaCl γίνεται σπάσιμο των κυττάρων ώστε να διασπαστούν τα υπάρχοντα συσσωματώματα
8. Προσθήκη αιθανόλης 90% στάγδην και υπό ανάδευση στο vortex.
9. Τέλος αποθήκευση των κυττάρων στους -20οC.

Προκειμένου, ύστερα να προετοιμαστούν τα δείγματα που προέκυψαν για ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιούνται οι εξής διαδικασίες:

Αρχικά στα δείγματα προστίθενται 2ml ορού και στη συνέχεια 10ml PBS 1X και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1600 στροφές για 10 λεπτά. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο, ακολουθεί καλή ανάδευση και προστίθεται στο ίζημα το μείγμα που χρησιμοποιείται για τη χρώση των κυττάρων, όπου σε 1 εκατομμύριο κύτταρα αντιστοιχούν 300μl μείγματος.

Το μείγμα αποτελείται από:

- Κιτρικό οξύ- Sodium citrate (Sigma, code:71402-100G), λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα
- Ιοδιούχο προπίδιο- PI (Propidium Iodide) (Sigma, code: BCCB3059)
- RNAase (DNAase free), το οποίο χρησιμοποιείται για να καταστρέψει το RNA

Τα δείγματα τοποθετούνται για 30 λεπτά στον κλίβανο στους 37 °C. Μετά το πέρας των 30 λεπτών τα δείγματα εισάγονται στο κυτταρόμετρο, αφού πρώτα πραγματοποιηθεί επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση με χρήση αυτόματης πιπέτας ώστε να διαχωριστούν όλα τα κύτταρα πριν την ανάλυση.

### 3.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)

Η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών είναι μια *in vitro* διαδικασία κατά την οποία αξιολογείται η ικανότητα που διαθέτουν κάποια μεμονωμένα κύτταρα να επιβιώνουν

και να αναπαράγονται με σκοπό τον σχηματισμό αποικιών. Η αποικία ορίζεται από τουλάχιστον 50 κύτταρα. Αυτή η ανάλυση περιεγράφηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1950 (Ruck & Marcus, 1955) , όπου χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των επιπτώσεων της ακτινοβολίας στην επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και στη συνέχεια έπαιξε ουσιαστικό ρόλο στη ραδιοβιολογία. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της έρευνας για τον καρκίνο, καθώς ο σχηματισμός κλώνων ερμηνεύεται ως χαρακτηριστικό καρκινικών κυττάρων με ικανότητες έναρξης όγκου (Backer et al., 2011). Αυτή η ανάλυση χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό του αναπαραγωγικού θανάτου ενός καρκινικού κυττάρου και επίσης για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας κυτταροτοξικών φαρμάκων και επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η αποσιώπηση ενός γονιδίου (*Clonogenic Assay: What, Why and How* (2023), n.d.; Rafahi et al., 2011).

Εν προκειμένου, στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία μελετάται η επίπτωση της διαδικασίας αποσιώπησης του mRNA που κωδικοποιεί την PDK-1, στην ικανότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1 να δημιουργούν αποικίες. Πρωτίστως, συλλέγονται κύτταρα ύστερα από την διαδικασία της θρυψινοποίησης που περιγράφηκε παραπάνω ( Ενότητα 3.1.4) και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που χρειάζεται το συγκεκριμένο πείραμα. Ο αριθμός των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν σε κάθε πηγάδι εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά. Στο συγκεκριμένο πείραμα, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε η παγκρεατική καρκινική σειρά κυττάρων PANC-1, χρειάζεται ως αρχικός πληθυσμός κυττάρων ανά πηγάδι τα 800 κύτταρα. Πιο αναλυτικά σε πιάτα 6 θέσεων (six wells) στρώνεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων στα οποία έχει υποστεί αποσιώπηση το mRNA της PDK-1. Επιπλέον στρώνονται πιάτα 6 θέσεων που αποτελούν τα negative control, δηλαδή κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί οποιαδήποτε αποσιώπηση της PDK-1. Σε όλα τα πηγάδια προστίθεται θρεπτικό μέσο RPMI σε τελικό όγκο 2ml.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% επίπεδα υγρασίας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που ανέρχεται στις δύο εβδομάδες. Μετά το πέρας της επώασης, με σκοπό να αναλυθεί η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης στην ικανότητα της δημιουργίας αποικιών στο συγκεκριμένο πλαίσιο ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη 1ml TCA 20% (Trichloroacetic acid) και επώαση στους 4°C για 1 ώρα και πλύση με απιονισμένο νερό.
2. Χρώση με 1ml SRB (Sulforhodamine B) και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκεκριμένη αποτελεί μια χρωστική με δυο σουλφονικές ομάδες που προσδένεται σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, κάτω από ήπιες όξινες συνθήκες και αποσυνδέεται κάτω από βασικές συνθήκες. Η ποσότητα χρωστικής που εξάγεται από τα μονιμοποιημένα κύτταρα, είναι ανάλογη της κυτταρικής μάζας.
3. Πλύση της χρωστικής SRB με οξικό οξύ 1% και στέγνωμα των κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Σκανάρισμα των πηγαδιών και λήψη φωτογραφιών με τη χρήση μικροσκοπίου καθώς οι αποικίες είναι πιο ορατές έπειτα από τη χρώση τους με SRB.

5. Αφού γίνει το σκανάρισμα των πηγαδιών, ακολουθεί, προσθήκη σε αυτά Trizma base σε συγκέντρωση 10mM, το οποίο είναι ρυθμιστικό διάλυμα ελαφρώς βασικό και βοηθά στην απελευθέρωση της δεσμευμένης χρωστικής από τα κύτταρα, ώστε στη συνέχεια να γίνει ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας. Τα πιάτα με το Trizma Base επωάζονται για 10 λεπτά στον κλίβανο στους 37 οC.
6. Μετά το πέρας των δέκα λεπτών αναδεύονται ήπια στην μπαλαρίνα για 10 λεπτά στις 30 στροφές.
7. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540 nm σε φωτόμετρο

Τέλος απαραίτητη είναι η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel και συγκεκριμένα, με τη δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία

### 3.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (Wound Healing assay)

Η συγκεκριμένη πειραματική μέθοδος, χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί αν η αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την PDK-1 αναστέλλει την ικανότητα μετανάστευσης των παγκρεατικών καρκινικών PANC-1.

Η μέθοδος επούλωσης πληγών είναι μια *in vitro* δοκιμασία για τη μελέτη της μετανάστευσης των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι με τη δημιουργία ενός τεχνητού κενού (πληγή) σε έναν πληθυσμό κυττάρων, τα κύτταρα που βρίσκονται στις δύο άκρες της πληγής θα μετακινηθούν ώστε να επουλώσουν την πληγή και να δημιουργήσουν ξανά διακυτταρικούς δεσμούς μεταξύ τους. Έτσι σε έναν πληθυσμό καρκινικών κυττάρων που έχουν την ιδιότητα να μεταναστεύουν, χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις ενός κυτταροτοξικού παράγοντα ή λαμβάνουν χώρα διάφορες γενετικές τροποποιήσεις, ώστε να παρατηρηθεί εάν είναι δυνατόν να καθυστερήσει ή ακόμα και να αναστείλει η επούλωση της πληγής από τα κύτταρα αυτά (Liang et al., 2007).

Η διαδικασία της μεθόδου ελέγχου επούλωσης πληγών ξεκινάει με την συλλογή των κυττάρων που έχουν ή δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση της επιλεγμένης πρωτεΐνης έπειτα από 48 ώρες επώαση με τη μέθοδο της θρυψινοποίησης. Η πυκνότητα των κυττάρων που διαπιστώθηκε ότι είναι η βέλτιστη για τη συγκεκριμένη μέθοδο και για την κυτταρική σειρά PANC-1 ήταν τα 25.000 κύτταρα ανά πηγάδι, οπότε και συλλέχθηκαν τόσα κύτταρα μετά τη θρυψινοποίηση. Τα κύτταρα στρώθηκαν σε πιάτο 96 θέσεων (100μl/πηγάδι) και επώασθηκαν για 24ώρες στον κλίβανο ώστε να προσκολληθούν στον πάτο των πηγαδιών και να προσαρμοστούν στις συνθήκες. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η δημιουργία πληγών με την εξής διαδικασία:

1. Αρχικά με το ρύγχος των 200μl tip έγινε πληγή σε κάθε θέση.
2. Έπειτα έγινε αφαίρεση του περιεχομένου των πηγαδιών
3. Ακολούθως, έγιναν πλύσεις με NaCl, με σύριγγα των 5ml, πολύ προσεχτικά και καθόλου απότομες κινήσεις, ώστε να φύγει κάθε υπόλειμμα κυττάρου που μπορεί να ξεκόλλησε με τη δημιουργία πληγής αλλά χωρίς να ξεκολλήσουν τα υπόλοιπα κύτταρα που παρέμειναν γύρω από την πληγή.

4. Μετά το βήμα αυτό και με γρήγορες αλλά προσεχτικές και πάλι κινήσεις, προστέθηκαν 200 μl RPMI στα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την PDK-1, καθώς και στα κύτταρα που αποτελούν το Negative Control siRNA δηλαδή αυτά που δεν έχουν υποστεί κάποια τροποποίηση. Το βήμα αυτό γίνεται σχετικά γρήγορα καθώς τα κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα ειδικά μετά τη δημιουργία της πληγής και δεν πρέπει να παραμένουν χωρίς μέσο καλλιέργειας για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, στο ανάστροφο μικροσκόπιο παρατηρείται το πιάτο και φωτογραφίζεται κάθε πηγάδι ξεχωριστά (μέσω της κάμερας AxionCam ERc5s της εταιρίας Zeiss), με τέτοιο τρόπο που να φαίνεται η πληγή και τα κύτταρα γύρω από αυτή. Αυτές οι φωτογραφίες αντιπροσωπεύουν την ώρα 0 και τις 2 επόμενες μέρες, δηλαδή μετά από 24 και 48 ώρες, φωτογραφίζοντας τα πηγάδια στο ίδιο ακριβώς σημείο. Αυτό γίνεται, ώστε να εξασφαλισθούν συγκρίσιμα αποτελέσματα και να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρέασε και σε ποιο χρονικό σημείο, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1 το ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων, πάντα σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

Η διάρκεια του πειράματος εξαρτάται από τα δείγματα ελέγχου όπου ιδανικά αναμένεται η πληγή να επουλώνεται. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από τις μετρήσεις εμβαδών των πληγών που μετριοούνται στις φωτογραφίες (PowerPoint) σε κάθε ώρα ελέγχου και με τη μετατροπή αυτών σε ποσοστό ανοιχτής περιοχής ή ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων. Τέλος πραγματοποιείται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel και συγκεκριμένα, με τη δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test είναι δυνατόν να υπολογιστεί η στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία

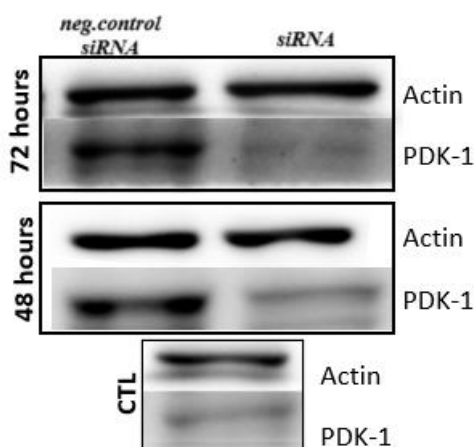
### 3.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel και συγκεκριμένα, με τη δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test υπολογίσαμε τη στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία. Η στατιστική σύγκριση γινόταν κάθε φορά για κάθε συγκέντρωση και ουσία σε σχέση με το εκάστοτε δείγμα ελέγχου. Για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα έπρεπε το p-value να είναι μικρότερο της τάξης του 0,05 ( $p < 0,05$ ). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πραγματοποιήθηκε ύστερα από επεξεργασία και συλλογή των αποτελεσμάτων της πυκνομετρίας με τη βοήθεια του προγράμματος Image J, επίσης μέσω της χρήσης του προγράμματος της Microsoft Excel και του T-test.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

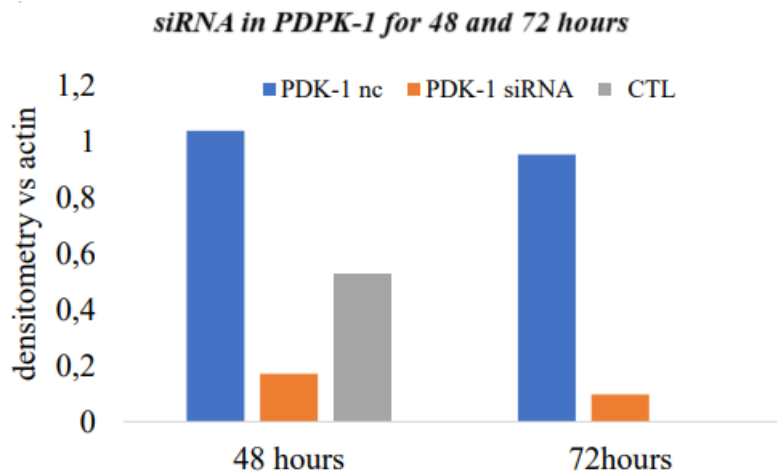
### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ PDK-1 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN- WESTERN BLOT

Στο συγκεκριμένο πείραμα, μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western, έγινε έλεγχος των επιπέδων την έκφρασης της πρωτεΐνης PDK-1 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1, ύστερα από αποσιώπηση του mRNA της PDK-1 με siRNA σε δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης των 48 και 72 ωρών. Ως μάρτυρας ισοφορτώματος μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη η οποία εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (housekeeping gene). Τα δείγματα ελέγχου (negative control) χωρίς επιμόλυνση με siRNA εκφράζουν σε φυσιολογικά επίπεδα την PDK-1. Αναφορικά με την έκφραση της πρωτεΐνης PDK-1, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23 παρατηρούμε ότι στις 72 ώρες επώασης είναι σχεδόν μηδενική και ενώ στις 48 ώρες επώασης η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχει μεγαλύτερη έκφραση. Στον αθεράπευτο πληθυσμό (negative control), η έκφραση είναι εμφανώς αυξημένη



Εικόνα 23: Έκφραση της πρωτεΐνης PDK-1 σε κύτταρα PANC-1, τα οποία επιμολύνθηκαν με siRNA της PDK-1 και με negative control siRNA σε κύτταρα που έχουν επωαστεί μόνο με θρεπτικό μέσο σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (48 και 72 ώρες). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 1) απεικονίζεται η πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων της PDK-1 σε σχέση με την ακτίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης, στα δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με το siRNA. Η μέτρηση της πυκνότητας έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο λόγος της πυκνότητας της πρωτεΐνης ως προς την πυκνότητα της ακτίνης.

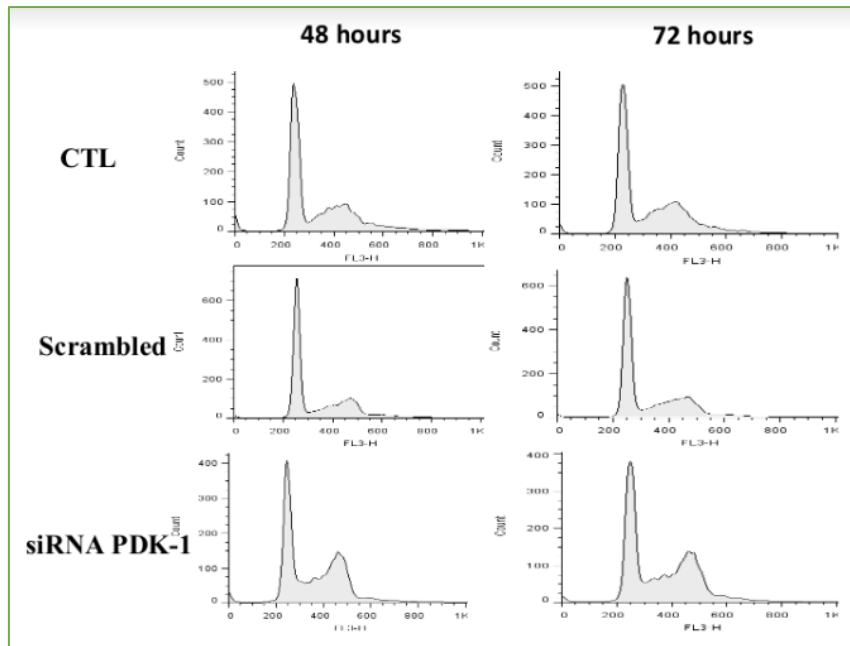


Γράφημα 1: Πυκνομετρία των επιπέδων έκφρασης της PDK-1 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1 σε σχέση με την ακτίνη (πρωτεΐνη αναφοράς) μετά την αποσιώπηση του PDPK-1 σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία (48 και 72 ώρες) για τα δείγματα ελέγχου (PDK-1 nc), τα δείγματα που επιμολύνθηκαν με siRNA (PDK-1 siRNA) και τα κύτταρα χωρίς καμία τροποποίηση (CTL). ( $p < 0,05$ )

## 4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

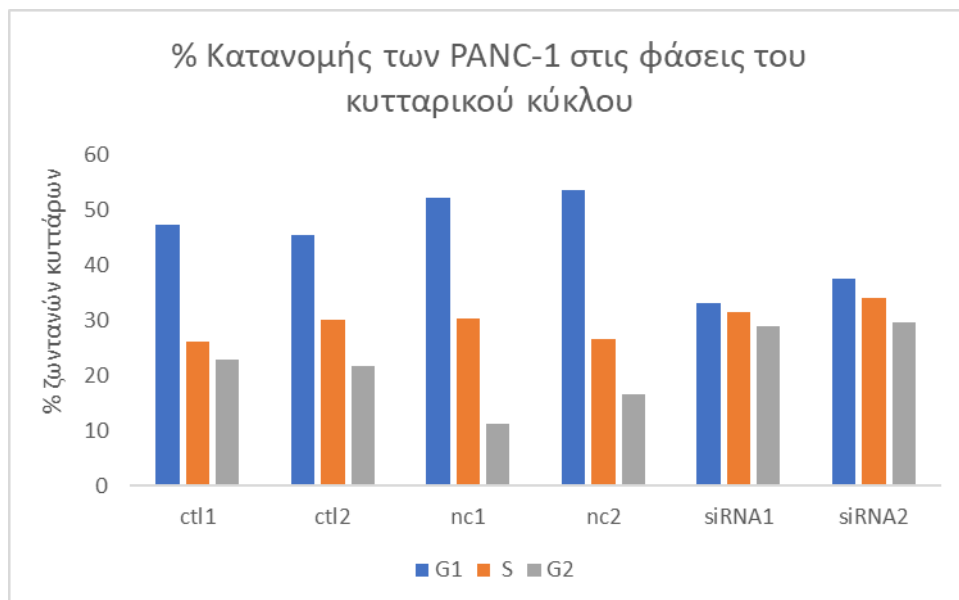
### 4.4.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ siRNA ΓΙΑ ΤΗΝ PDK-1 ΣΕ 48 & 72 ώρες

Η μέθοδος η οποία προαναφέρθηκε στην ενότητα [3.6] πραγματοποιήθηκε με σκοπό να προσδιοριστεί αν τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1, ύστερα από τη αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την PDK-1, παρουσιάζουν αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί κάποια τροποποίηση ή εκείνα που έχουν επιμολυνθεί με negative control siRNA. Παρακάτω στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας στις 48 και 72 ώρες. Η πρώτη κορυφή αφορά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία δεν έχει γίνει διπλασιασμός του DNA, στη συνέχεια ακολουθεί η φάση S και η επόμενη μικρότερη κορυφή αφορά κύτταρα που βρίσκονται στη G2 φάση όπου έχει διπλασιαστεί το DNA. Σε ασύγχρονο πληθυσμό που βρίσκεται σε φυσιολογικό κύκλο υπάρχουν κύτταρα τα οποία βρίσκονται κατανεμημένα και στις 3 φάσεις του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 24: Ιστογράμματα που δείχνουν την κατανομή των κυττάρων για επιμολυσμένα με negative control siRNA ή ειδικό siRNA για PDK-1 (κύτταρα siRNA PDK-1) στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από ανάλυση μέσω του προγράμματος ModFitlt Έκδοση 5. [Άξονας X, περιεχόμενο DNA. Άξονας Y τα συμβάντα (αριθμός των κύτταρα)].

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη διαδικασία της κυτταρομετρίας δεν φαίνεται να υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στον κυτταρικό κύκλο των 3 διαφορετικών πληθυσμών που εξετάζονται. Άρα η αποσιώπηση του της πρωτεΐνης PDK-1 δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίπτωση στον τρόπο με τον οποίο πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται τα παγκρεατικά κύτταρα PANC-1.

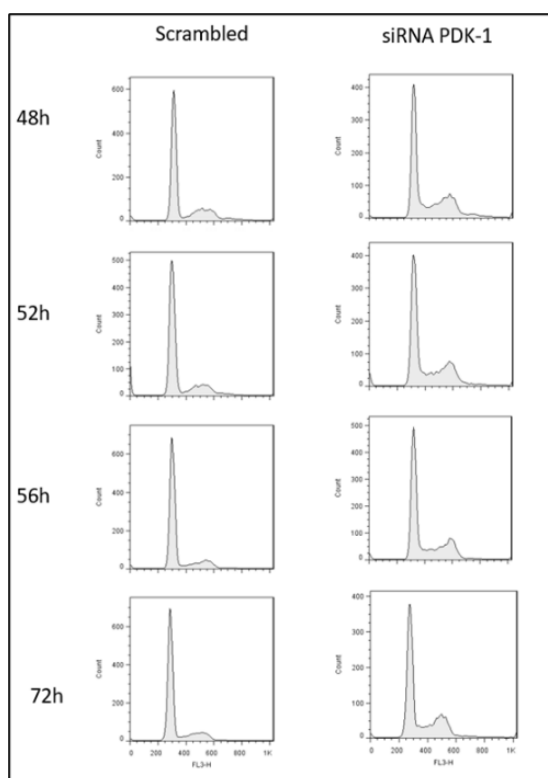


Γράφημα 2: Ραβδογράμματα που προέκυψαν ύστερα από ανάλυση της κυτταρομετρίας που δείχνουν την κατανομή των ζωντανών κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, S και G2/M). Με μπλε αναπαρίσταται η G1, με πορτοκαλί αναπαρίσταται η S και με γκρι παρουσιάζεται η G2/M φάση. όπου: ctl1/ctl2: δείγμα ελέγχου (control, untreated cells); nc1/nc2: negative control (scrambled);

siRNA1/siRNA2: δείγματα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η PDK-1. Τα 1,2 στα ακρωνύμια δείχνουν δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις. ( $p < 0,05$ )

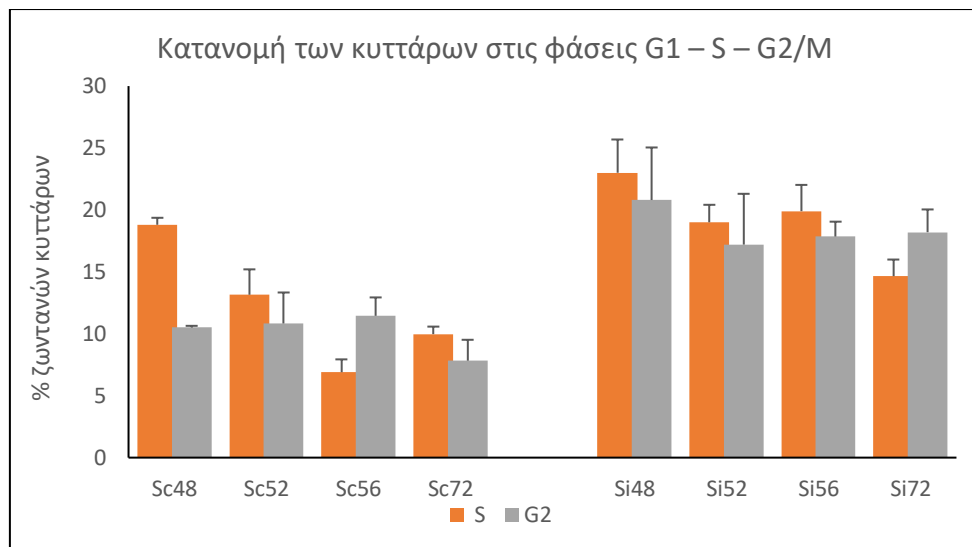
#### 4.4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ siRNA ΓΙΑ ΤΗΝ PDK-1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΣΙΑΣΤΗΜΑΤΑ

Παρακάτω στην εικόνα 25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας που επωάστηκαν με negative control siRNA και με siRNA για την PDK-1 σε ένα εύρος χρονικών διαστημάτων (48, 52, 56, 72 ώρες) με σκοπό να δούμε εάν σε διαφορετικές στιγμές πέραν των προηγούμενων θα εντοπίσουμε κάποια διαφορά στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων που δεν εκφράζουν την PDK-1.



Εικόνα25: Ιστογράμματα ύστερα από ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των PANC-1 που έχουν επωαστεί με negative control siRNA (Scrambled - αριστερά) και με siRNA για αποσιώπηση της PDK-1 (δεξιά), για 48, 52, 56 και 72 ώρες. Στον άξονα γ'γ είναι ο αριθμός των κυττάρων και στον άξονα χ'χ αναπαρίσταται η ποσότητα DNA των κυττάρων.

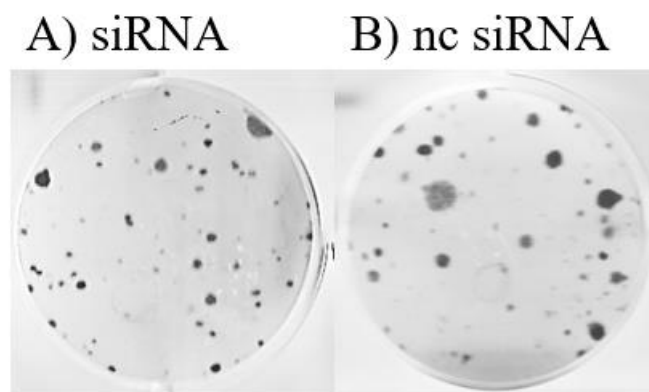
Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη διαδικασία της κυτταρομετρίας δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον κυτταρικό κύκλο των δύο διαφορετικών πληθυσμών που εξετάζονται και στις διαφορετικές χρονικές στιγμές (48, 52, 56 και 72 ώρες). Άρα η αποσιώπηση της PDK-1 δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίπτωση στον τρόπο με τον οποίο πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται τα καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα PANC-1. Απεναντίας φαίνεται ότι ο κυτταρικός κύκλος εκτελείται τουλάχιστον φυσιολογικά.



Γράφημα 3: Ραβδογράμματα που προέκυψαν ύστερα από ανάλυση της κυτταρομετρίας που δείχνουν την κατανομή των ζωντανών κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, S και G2/M) για τα negative controls (scrambled) και τα κύτταρα με το siRNA ύστερα από 48, 52, 56 και 72 ώρες. Με μπλε αναπαρίσταται η G1, με πορτοκαλί αναπαρίσταται η S και με γκρι παρουσιάζεται η G2/M φάση. όπου: Sc: δείγμα ελέγχου (negative control, scrambled); si: δείγματα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η PDK-1. Τα νούμερα δίπλα στα ακρωνύμια δείχνουν τις ώρες επώασης με Scrambled και siRNA, αντίστοιχα. ( $p < 0,05$ )

#### 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)

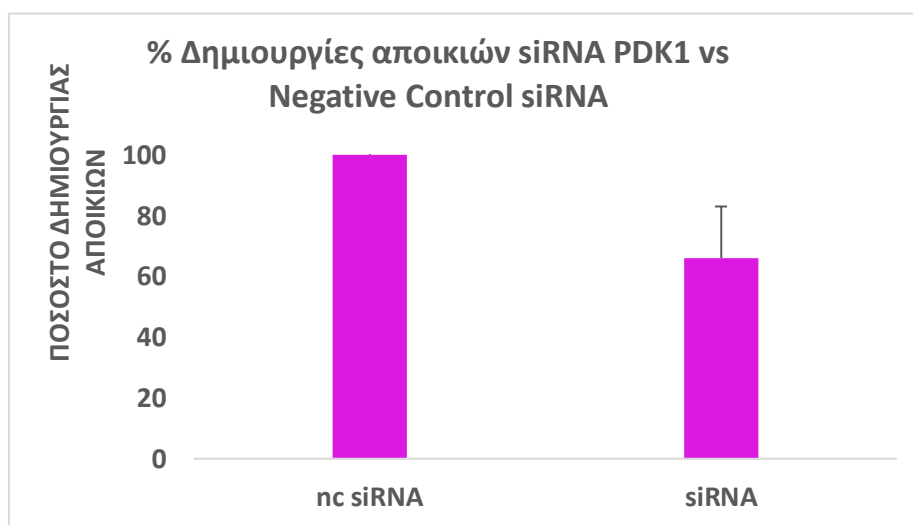
Στη συγκεκριμένη πειραματική μέθοδο, ελέγχθηκε η ικανότητα της αποσιώπησης του mRNA της PDK-1 να αναστέλλει την ιδιότητα των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων PANC-1 να δημιουργούν κλώνους. Όπως περιεγράφηκε στην Ενότητα 3.5, τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το κατάλληλο siRNA συγκρίθηκαν σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (nc), δηλαδή αυτά που έχουν επιμολυνθεί με negative control siRNA, μετά το πέρας 2 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο αυτή παρουσιάζονται στην Εικόνα 26 και στο Γράφημα 3 αντίστοιχα. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αποτελούν το μέσο όρο αυτών.



Εικόνα 26: Δημιουργία κλώνων των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1 επιμολυσμένων με siRNA (A) και με negative control (nc) siRNA (B)

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 26), φαίνονται με απλή παρατήρηση οι κλώνοι των κυττάρων που αναπτύχθηκαν στα πηγάδια έπειτα από επιμόλυνση τους με siRNA (A) και οι κλώνοι των κυττάρων ελέγχου ύστερα από επιμόλυνση με negative control siRNA (B). Στην εικόνα φαίνεται ότι η αποσιώπηση της PDK-1 δεν οδηγεί σε αναστολή δημιουργίας αποικιών, ωστόσο με απλή παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φάνηκε ότι υπάρχει διαφορά στο μέγεθος των αποικιών που σχηματίζονται. Στα επιμολυσμένα κύτταρα με siRNA οι αποικίες έχουν εμφανώς μικρότερο μέγεθος σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου με το negative control. Σε συνέχεια της απλής παρατήρησης, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του πειράματος της κλωνογένεσης μέσω φωτομέτρησης της οπτικής πυκνότητας του κάθε πηγαδιού στα 540nm. Τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε ποσοστό δημιουργίας κλώνων μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων.

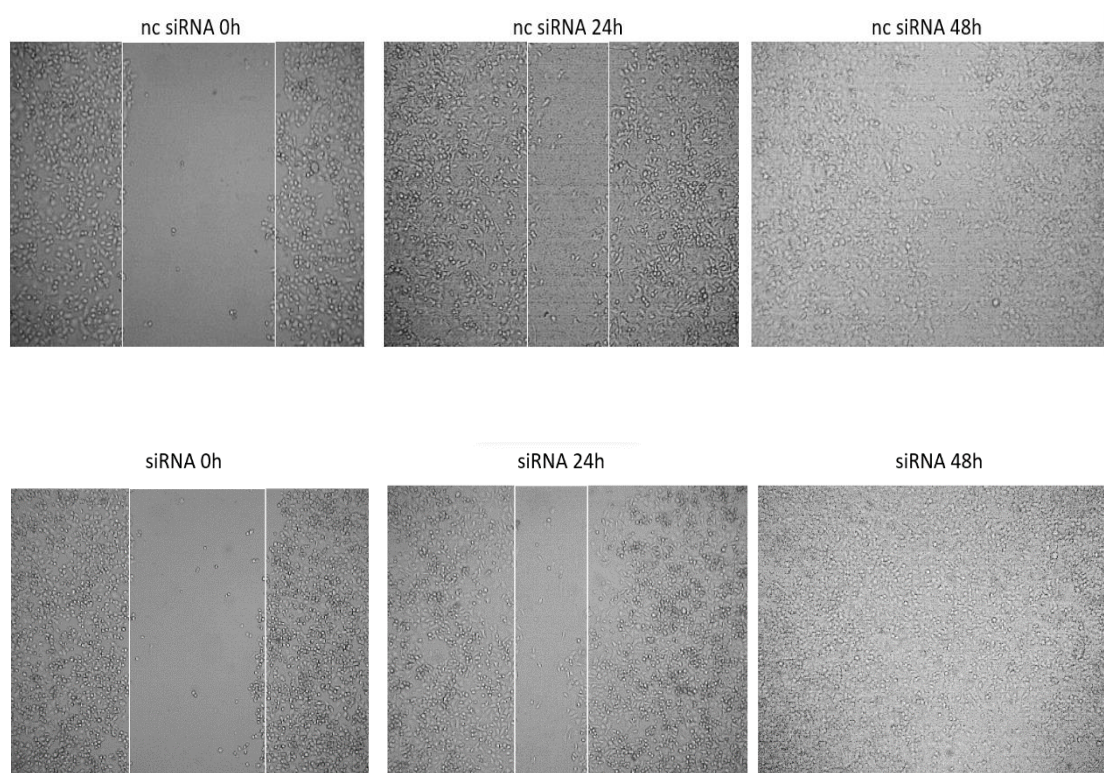
Με την στατιστική ανάλυση, παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά στο ποσοστό δημιουργίας αποικιών μεταξύ των επιμολυσμένων με siRNA κυττάρων και των επιμολυσμένων κυττάρων με negative control siRNA (Γράφημα 4)



Γράφημα 4: Σχηματισμός κλώνων των κυττάρων PANC-1 επιμολυσμένα με siRNA για την PDK-1 σε σχέση κύτταρα επιμολυσμένα με το negative control. ( $p < 0,05$ )

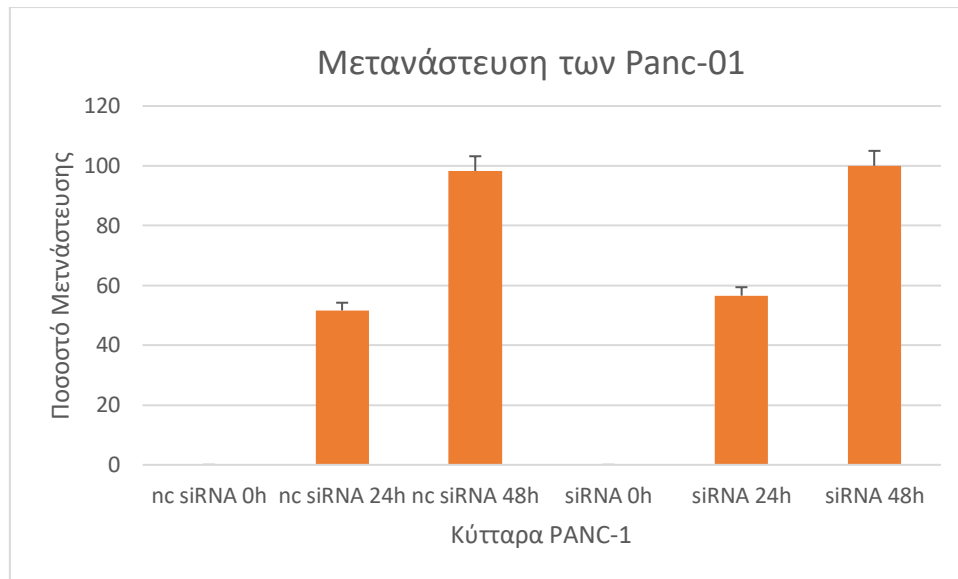
#### 4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (Wound Healing assay)

Με τον έλεγχο επούλωσης πληγών μελετήθηκε αν η αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1 επηρεάζει την μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων PANC-1. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στις 0 ώρες και μετά από 24 και 48 ώρες σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (negative control siRNA). Η διαδικασία αναλύθηκε στην ενότητα 3.6. Οι εικόνες που παρατίθενται είναι ενδεικτικές των αποτελεσμάτων (Εικόνα 27) που φωτογραφήθηκαν με το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.



Εικόνα 27: Απεικόνιση της μετανάστευσης των κυττάρων PANC-1 που έχουν επιμολυνθεί με negative control siRNA (πάνω) και siRNA (κάτω) στα χρονικά σημεία 0,24 και 48 ώρες.

Με βάση τον υπολογισμό των εμβαδών της κάθε πληγής στις παραπάνω φωτογραφίες υπολογίστηκε το ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων τόσο για τον πληθυσμό ελέγχου (negative control siRNA) όσο και για το πληθυσμό που επιμολύνθηκε με siRNA. Ο υπολογισμός έγινε με βάση το χρόνο μηδέν για κάθε συγκέντρωση, τη στιγμή της δημιουργίας της πληγής. Δηλαδή διαπιστώθηκε κατά πόσο μετανάστευσε ο κυτταρικός πληθυσμός σε σχέση με την αρχική πληγή όπου η μετανάστευση των κυττάρων λαμβάνεται ως μηδενική. Το παρακάτω γράφημα (Γράφημα 5) είναι αποτέλεσμα 4 ανεξάρτητων πειραμάτων και αποτελείται από τις μέσες τιμές αυτών.



Γράφημα 5: Ποσοστό μετανάστευσης των PANC-1 έπειτα από αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1. ( $p < 0,05$ )

Σύμφωνα με τις φωτογραφίες και το Γράφημα 5, το ποσοστό μετανάστευσης τόσο των κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί με το κατάλληλο siRNA όσο και αυτών που έχουν επιμολυνθεί με negative control siRNA μετά από 24 ώρες, ξεπερνάει το 50% ενώ μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα μεταναστεύουν σχεδόν 100% και στις δύο περιπτώσεις, με αποτέλεσμα την πλήρη επούλωση της πληγής.

## 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με μία μεγάλη πληθώρα ερευνών και επιδημιολογικών μελετών, ο παγκρεατικός καρκίνος και πιο συγκεκριμένα το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου αποτελεί έναν εξαιρετικά θανατηφόρο τύπο καρκίνου που παρουσιάζει πολύ κακή πρόγνωση και καθυστερημένη διάγνωση (Hu et al., 2021). Παρόλο που κατατάσσεται στη 12η θέση μεταξύ όλων των τύπων καρκίνου, βρίσκεται στην 7η θέση όσον αφορά τη θνησιμότητα (*GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC*, n.d.), υποδηλώνοντας την μεγάλη επιθετικότητα του εν λόγω τύπου καρκίνου και την ταχύτητα με την οποία αυτός εξελίσσεται. Το μείζον πρόβλημα με τον παγκρεατικό καρκίνο είναι η δυσκολία στην έγκαιρη πρόγνωσή του αλλά και στην εύρεση αποτελεσματικών πιο στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων μέχρι σήμερα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη μελέτη του ρόλου της PDK-1 στο παγκρεατικό καρκίνο. Η κινάση αυτή έχει βρεθεί ότι παίζει ένα πολύ κομβικό ρόλο σε δύο πολύ σημαντικά μονοπάτια της καρκινογένεσης, το PI3K/AKT/mTOR (Hemmings & Restuccia, 2012) και το RAS/MAPK (Houles & Roux, 2018). Η απορρύθμιση αυτών των μονοπατιών, οδηγεί κατ' επέκταση και στην απορρύθμιση των καίριων φυσιολογικών λειτουργιών των κυττάρων όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η πρωτεϊνική σύνθεση και η αγγειογένεση που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της καρκινογένεσης (Hemmings & Restuccia, 2012).

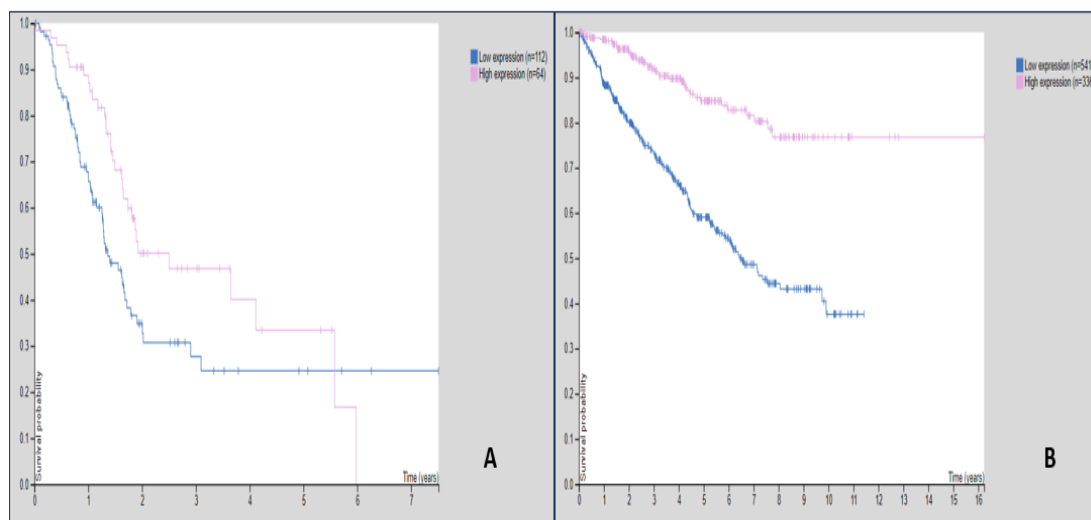
Η εργασία που εκπονήθηκε στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας βασίστηκε σε προηγούμενες μη δημοσιευμένες προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου μας. Ειδικότερα, η επώαση με έναν ειδικό αναστολέα για την PDK-1 εν ονόματι GSK2334470 (Najafon et al., 2011) είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή δημιουργίας αποικιών και την κυτταροστατική δράση του αναστολέα καταστέλλοντας την μεταναστευτική ικανότητα των PANC-1 κυττάρων. Επιπροσθέτως, η δράση του αναστολέα στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκε είχε σαν αποτέλεσμα την στάση του κυτταρικού κύκλου στην G0/1 φάση (G1 arrest) τόσο σε ασύγχρονα PANC-1 κύτταρα (δηλαδή κύτταρα που βρίσκονται σε φυσιολογικό κύκλο) όσο και σε συγχρονισμένα κύτταρα στην G0/1 φάση. Για τον λόγο αυτό, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω τα παραπάνω αποτελέσματα χωρίς τη χρήση αναστολέα αλλά ύστερα από αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1

Σε συνέχεια των προαναφερθέντων μελετών που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας, η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην *in vitro* αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PDK-1 ώστε να μπορέσει να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της κινάσης αυτής, όπως προκύπτει από τις μελέτες των αναστολέων στον παγκρεατικό καρκίνο. Επιπλέον με τη δημιουργία κυττάρων που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη μπορεί να αξιολογηθεί πιο ειδικά ο ρόλος της σε διαδικασίες όπως η ικανότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1 να σχηματίζουν αποικίες, να μεταναστεύουν και να πολλαπλασιάζονται. Όντας ήδη γνωστή η εμπλοκή της PDK-1 στα δύο πολύ σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, PI3K/AKT/mTOR και το RAS/MAPK, η απουσία της μπορεί να προσδώσει πολύ χρήσιμες πληροφορίες για την διαδικασία της καρκινογένεσης.

Εν συνεχεία, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η χρήση του siRNA οδήγησε στην χρονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση του mRNA όπως αυτή προέκυψε από την ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τα περαιτέρω πειράματα που διεξήχθησαν φαίνεται καταρχάς να μην είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από τη χρήση του GSK2334470 του ειδικού αναστολέα για την PDK-1. Πιο συγκεκριμένα κατά την αποσιώπηση του mRNA και της επακόλουθης, σχεδόν πλήρους, απώλειας έκφρασης της PDK-1 δεν παρατηρήθηκε ούτε αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ούτε αναστολή της μεταναστευτικής ικανότητας των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων PANC-1, όπως επίσης δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερα σημαντική αναστολή στην ικανότητα των κυττάρων αυτών να δημιουργούν κλώνους και να πολλαπλασιάζονται.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με πρόσφατες δημοσιευμένες εργασίες, όπως είναι η μελέτη της A.Emmanouilidi και των συνεργατών της, το 2019, που εστιάζει εξίσου, στο παγκρεατικό καρκίνο (Emmanouilidi et al., 2019). Η μελέτη αυτή, υποδεικνύει ότι, ύστερα από αποσιώπηση της PDK-1 in vitro με τη χρήση κατάλληλου siRNA προκαλείται σημαντική αναστολή της πολλαπλασιαστικής και αναπτυξιακής ικανότητας των κύτταρων του αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου (PDAC) σε συγκεκριμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παγκρέατος. Στην συγκεκριμένη μελέτη τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν διεξοδικά στην παγκρεατική καρκινική σειρά AsPC-1, ενώ αν και υπήρχε διαθέσιμη η παγκρεατική καρκινική σειρά PANC-1 που μελετάμε και εμείς, δεν ελέγχθηκε ως προς την αποσιώπηση της PDK-1. Περαιτέρω, αντίστοιχες μελέτες που αξιολογούν την επίπτωση που έχει η αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1 στη καρκινογένεση, έχουν διεξαχθεί και για άλλους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του οισοφάγου (Yu et al., 2012). Έτσι και σε αυτή την περίπτωση, η αποσιώπηση της PDK-1 μέσω siRNA, ανέστειλε την ανάπτυξη και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων EC9706 (esophageal cancer 9706), προωθώντας την απόπτωση in vitro, ενώ επίσης ανέστειλε την ανάπτυξη των όγκων σε ποντίκια in vivo, μειώνοντας παράλληλα την έκφραση της PDK1 στους ιστούς.

Από την άλλη, τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με δεδομένα της βάσης “The Human Protein Atlas” που αφορούν την πρωτεΐνη PDK-1. Συγκεκριμένα, από πληροφορίες της συγκεκριμένης βάσης σχετικά με τον παγκρεατικό καρκίνο και την PDK-1, φαίνεται να προκύπτει ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης παρουσιάζουν μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης σε σύγκριση με εκείνους που φέρουν χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης της PDK-1 (Εικόνα 28-A). Παρόμοια δεδομένα παρουσιάζονται επίσης για τον καρκίνο του νεφρού (Εικόνα 28-B). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν έναν ρόλο για την PDK-1, πιθανά ογκοκατασταλτικό, σε αντίθεση με όσο αναφέρονται στις μελέτες που αναφέρθηκαν πιο πάνω (Emmanouilidi et al., 2019; Yu et al., 2012)



Εικόνα 28: Διαγράμματα που απεικονίζουν την πιθανότητα επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος (Α) και του νεφρού (Β) ανάλογα με το εάν η έκφραση της πρωτεΐνης PDK-1 είναι υψηλή ή χαμηλή. (μπλε: χαμηλή έκφραση PDK-1, ροζ: υψηλή έκφραση PDK-1)

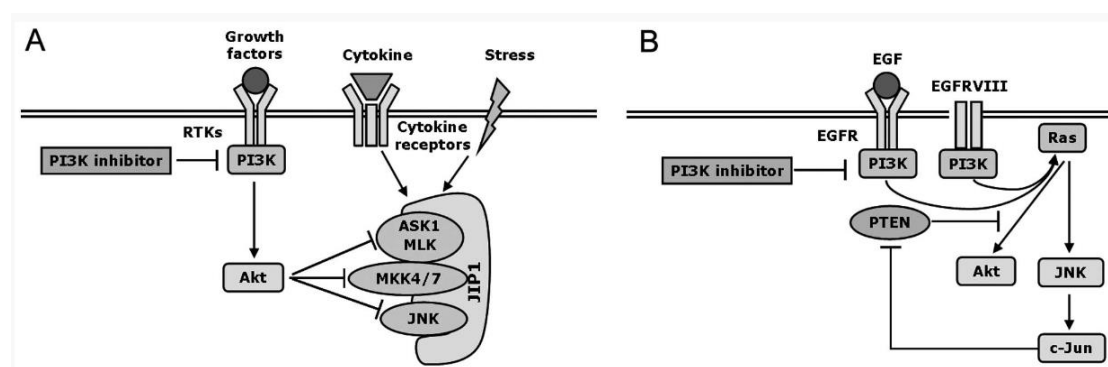
Από τα παραπάνω, και καθώς οι μελέτες αυτές είναι αρκετά πρόσφατες, προκύπτει ότι απαιτούνται περισσότερες πιο εκτενείς και διεξοδικές μελέτες για τη διαλεύκανση του ρόλου της PDK-1 στον παγκρεατικό καρκίνο. Ιδιαίτερης σημασίας είναι να απαντηθούν ερωτήματα που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη εργασία, όπως για παράδειγμα η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μας με τα αποτελέσματα που αφορούν τον αναστολέα GSK2334470 καθώς και με τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα δεδομένα για την αποσιώπηση της PDK-1. Πως είναι λοιπόν δυνατόν τα κύτταρα να συνεχίζουν να επιβιώνουν ακόμη και μετά την αποσιώπηση της PDK-1, ενός κομβικού μορίου στην προώθηση της επιβίωσης των κυττάρων;

Μία πιθανή εξήγηση, στα πιο πάνω ερωτήματα, μπορεί να είναι η χρονοεξαρτώμενη δράση της αποσιώπησης της πρωτεΐνης PDK-1. Συγκεκριμένα, είναι πολύ πιθανό η αποσιώπηση της πρωτεΐνης να έχει ανασταλτική δράση ως προς την πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων PANC-1, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα πέρα από τις χρονικές στιγμές που ελέγχθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία. Η παραπάνω υπόθεση βασίζεται και στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διαδικασία του clonogenic assay (Ενότητα 4.3). Επομένως χρήζει ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος η επέκταση των πειραμάτων σε διαφορετικά χρονικά σημεία ώστε να προκύψει μια πιο ολοκληρωμένη άποψη για την δράση της αποσιωπημένης PDK-1.

Μια ακόμα υπόθεση, που προκύπτει από την παρούσα διπλωματική διατριβή και μπορεί να εξηγήσει τα αποτελέσματά μας, είναι ότι ο GSK334470 μπορεί να χάνει την ειδικότητα του για την PDK-1 όταν εισέρχεται στο καρκινικό κύτταρο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη δράση και άλλων σημαντικών κινασών που εμπλέκονται στη καρκινογένεση, όπως η p90 ριβοσωμική S6 κινάση 2 (RSK2 : p90 ribosomal S6 kinase 2). Επίσης είναι πολύ πιθανό η ενδοκυττάρια δράση του GSK334470 να είναι χρονοεξαρτώμενη. Δηλαδή μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα ενδέχεται να χάνει την ειδικότητα του για τη PDK-1 και να επηρεάζει την

λειτουργία άλλων κινασών (Najafon et al., 2011). Τα παραπάνω συντελούν στην υπόθεση, ότι ο GSK2334470 ίσως να μην αναστέλλει ειδικά την δράση της κινάσης PDK-1, ασκώντας την αντικαρκινική δράση του, μέσω της αναστολής διαφορετικών κινασών που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Μια άλλη οπτική γωνία, είναι ότι παρά την αποσιώπηση της PDK-1, μπορεί να ενεργοποιούνται εναλλακτικά μονοπάτια που έχουν συσχετιστεί με την καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μονοπάτι MAPKK4/JNK/c-Jun, του οποίου η λειτουργία έχει συσχετιστεί με το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR. Πρωτεΐνες αυτών των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών φαίνεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω διάφορων δικτύων (AKT/JIP1/PDK-1, AKT/ASK1, MKK4/AKT), προωθώντας ή αναστέλλοντας την απόπτωση των κυττάρων (Εικόνα 29) (Zhao et al., 2015). Σε άλλες μελέτες παρατηρούνται παρόμοιες αλληλεπιδράσεις, μεταξύ των μονοπατιών MAPKK4/JNK/c-Jun και RAS/MEK/ERK (Jänne et al., 2017; Xue et al., 2018). Σε έρευνα για τη δράση των ουσιών trametinib και selumetinib, που αποτελούν αναστολείς της κινάσης MEK, παρατηρήθηκε ότι άρετε η αποτελεσματικότητά τους λόγω ενός πολύπλοκου μηχανισμού επανενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK. Συγκεκριμένα η αναστολή της κινάσης MEK, καταστέλλει τη παραγωγή της καθοδικής της πρωτεΐνης, DUSP4 (dual specificity phosphatase 4). Με το τρόπο αυτό ενεργοποιείται το μονοπάτι JNK-JUN καθώς μέρος της λειτουργίας της πρωτεΐνης DUSP4 είναι να αποφωσφορυλιώνει την κινάση JNK και να αναστέλλει την δράση της. Επακόλουθο γεγονός είναι η ενεργοποίηση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης HER που οδηγούν στην εκ νέου διέγερση του μονοπατιού MAPK εκμηδενίζοντας έτσι την ανασταλτική δράση των δύο ουσιών. Για τους παραπάνω λόγους λοιπόν, ίσως είναι αναγκαία η ταυτόχρονη διερεύνηση και άλλων μονοπατιών που είναι πιθανό να εμπλέκονται στη καρκινογένεση και να υπερκαλύπτουν την αποσιώπηση της PDK-1.



Εικόνα 29: Απλοποιημένο σχήμα που δείχνει διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοπατιών PI3K/AKT και JNK. Α) Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης PI3K/AKT αναστέλλει την επαγόμενη από στρες και κυτοκίνες ενεργοποίηση της JNK. Το JIP1 μπορεί να συνδεθεί απευθείας με τη περιοχή PH της AKT, οδηγώντας στο σχηματισμό της μονάδας AKT-JIP1 και στην αποσύνδεση του JNK από την ενότητα JIP-JNK. Επιπλέον, η AKT αλληλεπιδρά με τις κινάσες ASK1, MLK3 και MKK4 και τις φωσφορυλιώνει στα Ser83, Ser624 και Ser78 αντίστοιχα για να αναστείλει τη δραστηριότητα κινάσης τους, οδηγώντας στην απενεργοποίηση της JNK. Ο αναστολέας PI3K ενεργοποιεί τη σηματοδότηση JNK μέσω της απενεργοποίησης της AKT. Β) Το πρότυπο της συν-ενεργοποίησης AKT και JNK παρουσιάζεται στο πλαίσιο διέγερσης του EGF και της υπερέκφρασης EGFR ή EGFRVIII, καθώς και απώλειας του PTEN. Οι αναστολείς PI3K και η έκφραση του άγριου τύπου PTEN είναι σε θέση να

αναστέλλουν τόσο την ενεργοποίηση της AKT όσο και της JNK. Το ενεργοποιημένο c-Jun από το JNK συνδέεται με την αλληλουχία του εκκινήτη του PTEN, με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής του PTEN και την ενεργοποίηση της AKT (Zhao et al., 2015).

Κλείνοντας, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης PDK-1 στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC-1, στις πειραματικές συνθήκες της συγκεκριμένης μελέτης, οδήγησαν σε αποτελέσματα αντικρουόμενα αλλά με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Είναι προφανές ότι απαιτούνται πολύ πιο λεπτομερείς και σε βάθος μελέτες για την κατανόηση κι τη διαλεύκανση του ρόλου της PDK-1 στον παγκρεατικό καρκίνο ώστε να αποδειχθεί πέραν πάσης αμφιβολίας ότι η στόχευσή της θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, K., Kitago, M., Kitagawa, Y., & Hirasawa, A. (2021). Hereditary pancreatic cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 26(10), 1784–1792. <https://doi.org/10.1007/S10147-021-02015-6>
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., & Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Current Biology : CB*, 7(10), 776–789. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00336-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00336-8)
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R. J., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Current Biology : CB*, 7(4), 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00122-9)
- Amanam, I., & Chung, V. (2018). Targeted Therapies for Pancreatic Cancer. *Cancers*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/CANCERS10020036>
- Backer, M. V., Backer, J. M., & Chinnaiyan, P. (2011). Targeting the Unfolded Protein Response in Cancer Therapy. *Methods in Enzymology*, 491, 37–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385928-0.00003-1>
- Bahreyni, A., & Luo, H. (2020). Advances in Targeting Cancer-Associated Genes by Designed siRNA in Prostate Cancer. *Cancers*, 12(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123619>
- Bamodu, O. A., Chang, H. L., Ong, J. R., Lee, W. H., Yeh, C. T., & Tsai, J. T. (2020). Elevated PDK1 Expression Drives PI3K/AKT/MTOR Signaling Promotes Radiation-Resistant and Dedifferentiated Phenotype of Hepatocellular Carcinoma. *Cells 2020, Vol. 9, Page 746*, 9(3), 746. <https://doi.org/10.3390/CELLS9030746>
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3007094>
- Brierley, J. (2006). The evolving TNM cancer staging system: an essential component of cancer care. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 174(2), 155–156. <https://doi.org/10.1503/CMAJ.045113>
- Brune, K. A., Lau, B., Palmisano, E., Canto, M., Goggins, M. G., Hruban, R. H., & Klein, A. P. (2010). Importance of Age of Onset in Pancreatic Cancer Kindreds. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 119–126. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJP466>

- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., Jemal, A., Yu, X. Q., & He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(2), 115–132. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21338>
- Cheng, F., Su, L., & Qian, C. (2016). Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30), 48832–48841. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9453>
- Chin, V., Nagrial, A., Sjoquist, K., O'Connor, C. A., Chantrill, L., Biankin, A. V., Scholten, R. J. P. M., & Yip, D. (2018). Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011044.PUB2>
- Clonogenic assay: what, why and how (2023)*. (n.d.). Retrieved October 13, 2023, from <https://solatatech-com.ngontinh24.com/article/clonogenic-assay-what-why-and-how>
- Comprehensive Cancer Information - NCI*. (n.d.). Retrieved October 12, 2023, from <https://www.cancer.gov/>
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*. In *Sinauer Associates*.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Smolewski, P. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*, 38(2), 179–193. [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(01)90051-4)
- de Fougères, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., & Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(6), 443. <https://doi.org/10.1038/NRD2310>
- Emmanouilidi, A., Fyffe, C. A., Ferro, R., Edling, C. E., Capone, E., Sestito, S., Rapposelli, S., Lattanzio, R., Iacobelli, S., Sala, G., Maffucci, T., & Falasca, M. (2019). Preclinical validation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 inhibition in pancreatic cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1191-2>
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 606–619. <https://doi.org/10.1038/NRG1879>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 391:6669, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Genkinger, J. M., Kitahara, C. M., Bernstein, L., Berrington de Gonzalez, A., Brotzman, M., Elena, J. W., Giles, G. G., Hartge, P., Singh, P. N., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Weiderpass, E., Adami, H. O., Anderson, K. E., Beane-Freeman, L. E., Buring, J. E., Fraser, G. E., Fuchs, C. S., Gapstur, S. M., Gaziano, J. M., ... Jacobs, E. J. (2015). Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort

- studies. *Annals of Oncology*, 26(11), 2257–2266.  
<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV355>
- Gheorghe, G., Bungau, S., Ilie, M., Behl, T., Vesa, C. M., Brisc, C., Bacalbasa, N., Turi, V., Costache, R. S., & Diaconu, C. C. (2020). Early Diagnosis of Pancreatic Cancer: The Key for Survival. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(11).  
<https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS10110869>
- Givan, A. L. (2011). Flow Cytometry: An Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 699, 1–29. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5\\_1/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1/COVER)
- GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC. (n.d.). Retrieved October 12, 2023, from <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 144, 241.  
<https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2016.09.008>
- Gupta, S., Wang, F., Holly, E. A., & Bracci, P. M. (2010). Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking: a population-based study. *Cancer Causes & Control*, 21(7), 1047. <https://doi.org/10.1007/S10552-010-9533-6>
- Haga, S., Ozaki, M., Inoue, H., Okamoto, Y., Ogawa, W., Takeda, K., Akira, S., & Todo, S. (2009). The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology*, 49(1), 204–214.  
<https://doi.org/10.1002/HEP.22583>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A011189>
- Houles, T., & Roux, P. P. (2018). Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 48, 53–61. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2017.04.016>
- Hu, J. X., Lin, Y. Y., Zhao, C. F., Chen, W. B., Liu, Q. C., Li, Q. W., & Gao, F. (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World Journal of Gastroenterology*, 27(27), 4298. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I27.4298>
- Huang, B. Z., Pandol, S. J., Jeon, C. Y., Chari, S. T., Sugar, C. A., Chao, C. R., Zhang, Z. F., Wu, B. U., & Setiawan, V. W. (2019). New-onset Diabetes, Longitudinal Trends in Metabolic Markers, and Risk of Pancreatic Cancer in a Heterogeneous Population. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 18(8), 1812-1821.e7.  
<https://doi.org/10.1016/J.CGH.2019.11.043>

- Huguet, F., Rivin del Campo, E., Orthuon, A., Mornex, F., Bessières, I., Guimas, V., & Vendrely, V. (2022). Radiation therapy of pancreatic cancers. *Cancer/Radiothérapie*, *26*(1–2), 259–265. <https://doi.org/10.1016/J.CANRAD.2021.08.010>
- Jänne, P. A., Van Den Heuvel, M. M., Barlesi, F., Cobo, M., Mazieres, J., Crinò, L., Orlov, S., Blackhall, F., Wolf, J., Garrido, P., Poltoratskiy, A., Mariani, G., Ghiorghiu, D., Kilgour, E., Smith, P., Kohlmann, A., Carlile, D. J., Lawrence, D., Bowen, K., & Vansteenkiste, J. (2017). Selumetinib Plus Docetaxel Compared With Docetaxel Alone and Progression-Free Survival in Patients With KRAS-Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: The SELECT-1 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *317*(18), 1844. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.3438>
- Karpińska, M., & Czauderna, M. (2022). Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.807632/FULL>
- Kearney, J. F., Adsay, V., & Yeh, J. J. (n.d.). *Pathology and Molecular Characteristics of Pancreatic Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2021.06.003>
- Leroux, C., & Konstantinidou, G. (2021). Targeted therapies for pancreatic cancer: Overview of current treatments and new opportunities for personalized oncology. *Cancers*, *13*(4), 1–28. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13040799>
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, *2*(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2007.30>
- Luchini, C., Grillo, F., Fassan, M., Vanoli, A., Capelli, P., Paolino, G., Ingravallo, G., Renzulli, G., Doglioni, C., D'Amuri, A., Mattiolo, P., Pecori, S., Parente, P., Florena, A. M., Zamboni, G., & Scarpa, A. (2020). Malignant epithelial/exocrine tumors of the pancreas. *Pathologica*, *112*(3), 210–226. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-167>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mar Kolbeinsson, H., Chandana, S., Paul Wright, G., Chung, M., chandana, S., Paul wright, G., & chung, M. (2023). Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *Journal of Investigative Surgery*, *36*(1), 2129884. <https://doi.org/10.1080/08941939.2022.2129884>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, *120*, 5.1.1. <https://doi.org/10.1002/CPIM.40>
- Miyabayashi, K., Ijichi, H., & Fujishiro, M. (2022). The Role of the Microbiome in Pancreatic Cancer. *Cancers*, *14*(18). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14184479>
- Molina-Montes, E., van Hoogstraten, L., Gomez-Rubio, P., Löhr, M., Sharp, L., Molero, X., Márquez, M., Michalski, C. W., Farré, A., Perea, J., O'Rorke, M., Greenhalf, W., Ilzarbe, L., Tardon, A., Gress, T. M., Barberá, V. M., Crnogorac-Jurcevic, T., Muñoz-Bellvis, L., Domínguez-Muñoz, E., ... Malats, N. (2020). Pancreatic Cancer Risk in Relation to Lifetime Smoking Patterns, Tobacco Type, and Dose-Response Relationships. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for*

- Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 29(5), 1009–1018. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1027>
- Morani, A. C., Hanafy, A. K., Ramani, N. S., Katabathina, V. S., Yedururi, S., Dasyam, A. K., & Prasad, S. R. (2020). Hereditary and Sporadic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Update on Genetics and Imaging. *Radiology. Imaging Cancer*, 2(2). <https://doi.org/10.1148/RYCAN.2020190020>
- Murray, A. (1994). Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(6), 872–876. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90059-0)
- Najafov, A., Sommer, E. M., Axten, J. M., DeYoung, M. P., & Alessi, D. R. (2011a). Characterization of GSK2334470, a novel and highly specific inhibitor of PDK1. *Biochemical Journal*, 433(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20101732>
- Najafov, A., Sommer, E. M., Axten, J. M., DeYoung, M. P., & Alessi, D. R. (2011b). Characterization of GSK2334470, a novel and highly specific inhibitor of PDK1. *Biochemical Journal*, 433(2), 357–369. <https://doi.org/10.1042/BJ20101732>
- Noel, M., & Fiscella, K. (2019). Disparities in Pancreatic Cancer Treatment and Outcomes. *Health Equity*, 3(1), 532–540. <https://doi.org/10.1089/HEQ.2019.0057>
- Ohmoto, A., Yachida, S., & Morizane, C. (2019). Genomic Features and Clinical Management of Patients with Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS20030561>
- Pancreatic Cancer Types | Johns Hopkins Medicine*. (n.d.). Retrieved October 12, 2023, from <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/pancreatic-cancer/pancreatic-cancer-types>
- Pandol, S. J., & Raybould, H. E. (2011). Integrative responses of the gastrointestinal tract and liver to a meal. *Textbook of Gastroenterology*, 3–14. <https://www.wiley.com/en-us/Textbook+of+Gastroenterology%2C+5th+Edition-p-9781444359411>
- Pearce, L. R., Komander, D., & Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:1, 11(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrm2822>
- Puck, T. T., & Marcus, P. I. (1955). A RAPID METHOD FOR VIABLE CELL TITRATION AND CLONE PRODUCTION WITH HELA CELLS IN TISSUE CULTURE: THE USE OF X-IRRADIATED CELLS TO SUPPLY CONDITIONING FACTORS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41(7), 432. <https://doi.org/10.1073/PNAS.41.7.432>
- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic Assay: Adherent Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 49, 49. <https://doi.org/10.3791/2573>
- Raimondi, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2009). Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2009 6:12, 6(12), 699–708. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.177>

- Ramalhete, L., Vigia, E., Araújo, R., & Marques, H. P. (2023). Proteomics-Driven Biomarkers in Pancreatic Cancer. *Proteomes*, *11*(3), 24. <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES11030024>
- Rashid, M. ur, & Coombs, K. M. (2019). Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(6), 7718–7724. <https://doi.org/10.1002/JCP.27890>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, *10*(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/WJON1166>
- Rinzivillo, M., De Felice, I., Magi, L., Annibale, B., & Panzuto, F. (2020). Occurrence of exocrine pancreatic insufficiency in patients with advanced neuroendocrine tumors treated with somatostatin analogs. *Pancreatology*, *20*(5), 875–879. <https://doi.org/10.1016/J.PAN.2020.06.007>
- Santarpia, L., Lippman, S. M., & El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *16*(1), 103. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>
- Saurabh, S., Vidyarthi, A. S., & Prasad, D. (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, *239*(3), 543–564. <https://doi.org/10.1007/S00425-013-2019-5>
- Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. <Http://Dx.Doi.Org/10.1177/030098589803500601>, *35*(6), 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Setiawan, V. W., Stram, D. O., Porcel, J., Chari, S. T., Maskarinec, G., Le Marchand, L., Wilkens, L. R., Haiman, C. A., Pandol, S. J., & Monroe, K. R. (2019). Pancreatic Cancer Following Incident Diabetes in African Americans and Latinos: The Multiethnic Cohort. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *111*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJY090>
- Stolzenberg-Solomon, R. Z., Cross, A. J., Silverman, D. T., Schairer, C., Thompson, F. E., Kipnis, V., Subar, A. F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., & Sinha, R. (2007). Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *16*(12), 2664–2675. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0378>
- Sun, W., Zhou, H., Cheng, M., Zhuang, S., & Qiu, Z. (2020). Association between Socioeconomic Status and One-Month Mortality after Surgery in 20 Primary Solid Tumors: a Pan-Cancer Analysis. *Journal of Cancer*, *11*(18), 5449. <https://doi.org/10.7150/JCA.46088>
- Thillai, K., Lam, H., Sarker, D., & Wells, C. M. (2017). Deciphering the link between PI3K and PAK: An opportunity to target key pathways in pancreatic cancer? *Oncotarget*, *8*(8), 14173–14191. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.13309>
- Tsai, H. J., & Chang, J. S. (2019). Environmental Risk Factors of Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/JCM8091427>

- Vila-Navarro, E., Vila-Casadesús, M., Moreira, L., Duran-Sanchon, S., Sinha, R., Ginés, À., Fernández-Esparrach, G., Miquel, R., Cuatrecasas, M., Castells, A., Lozano, J. J., & Gironella, M. (2017). MicroRNAs for Detection of Pancreatic Neoplasia: Biomarker Discovery by Next-generation Sequencing and Validation in 2 Independent Cohorts. *Annals of Surgery*, 265(6), 1226. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001809>
- Wang, N., Fu, J., Li, Z., Jiang, N., Chen, Y., & Peng, J. (2022). The Landscape of PDK1 in Breast Cancer. *Cancers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14030811>
- What Is Cancer? - NCI.* (n.d.). Retrieved October 12, 2023, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition>
- Whitcomb, D. C. (2004). Inflammation and cancer: V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(2 50-2). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00115.2004/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30080417510001.JPEG>
- Xu, M., Jung, X., Hines, O. J., Eibl, G., & Chen, Y. (2018). Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiology and Potential Prevention by Weight Loss. *Pancreas*, 47(2), 158. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000974>
- Xu, W., Jiang, X., & Huang, L. (2019). RNA Interference Technology. *Comprehensive Biotechnology*, 560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>
- Xu, X., Chen, Y., Fu, Q., Ni, D., Zhang, J., Li, X., & Lu, S. (2019). The chemical diversity and structure-based discovery of allosteric modulators for the PIF-pocket of protein kinase PDK1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 361–374. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1553167>
- Xue, Z., Vis, D. J., Bruna, A., Sustic, T., Van Wageningen, S., Batra, A. S., Rueda, O. M., Bosdriesz, E., Caldas, C., Wessels, L. F. A., & Bernards, R. (2018). MAP3K1 and MAP2K4 mutations are associated with sensitivity to MEK inhibitors in multiple cancer models. *Cell Research* 2018 28:7, 28(7), 719–729. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0044-4>
- Yang, C., Huang, X., Liu, H., Xiao, F., Wei, J., You, L., & Qian, W. (2017). PDK1 inhibitor GSK2334470 exerts antitumor activity in multiple myeloma and forms a novel multitargeted combination with dual mTORC1/C2 inhibitor PP242. *Oncotarget*, 8(24). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16642>
- Yi, J. M., Guzzetta, A. A., Bailey, V. J., Downing, S. R., Neste, L. Van, Chiappinelli, K. B., Keeley, B. P., Stark, A., Herrera, A., Wolfgang, C., Pappou, E. P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Goggins, M. G., Herman, J. G., Wang, T. H., Baylin, S. B., & Ahuja, N. (2013). Novel Methylation Biomarker Panel for the Early Detection of Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(23), 6544–6555. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3224>
- Youn, M., Gomez, J. O., Mark, K., & Sakamoto, K. M. (2021). RSK Isoforms in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9070726>
- Yu, J., Chen, K. S., Li, Y. N., Yang, J., & Zhao, L. (2012). Silencing of PDK1 gene expression by RNA interference suppresses growth of esophageal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 13(8), 4147–4151. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.8.4147>

- Zhang, Y. B., Pan, X. F., Chen, J., Cao, A., Zhang, Y. G., Xia, L., Wang, J., Li, H., Liu, G., & Pan, A. (2020). Combined lifestyle factors, incident cancer, and cancer mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Cancer* 2020 122:7, 122(7), 1085–1093. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0741-x>
- Zhao, H. F., Wang, J., & To, S. S. T. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *International Journal of Oncology*, 47(2), 429–436. <https://doi.org/10.3892/IJO.2015.3052/DOWNLOAD>
- Zhu, F., Wang, H., & Ashamalla, H. (2020). Racial and Socioeconomic Disparities in the Treatments and Outcomes of Pancreatic Cancer Among Different Treatment Facility Types. *Pancreas*, 49(10), 1355–1363. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001688>