



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ - ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η επίδραση της αποσιώπησης της πρωτεΐνης TMEM97
στην**

ανάπτυξη παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων»

ΜΑΥΡΟΦΟΡΑ ΞΑΝΘΙΠΠΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΣΑ, 2024



UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

FACULTY OF MEDICINE



PHARMACOLOGY LAB

MASTER PROGRAM

HUMAN GENETICS - GENETIC COUNSELING

MASTER'S THESIS

**« The effect of TMEM97 protein silencing on
growth of pancreatic cancer cells »**

MAVROFORA XANTHIPPI

MASTER STUDENT

LARISSA, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) **ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Παν/μίου Θεσσαλίας -Επιβλέπων
- 2) **ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μίου Θεσσαλίας- Συνεπιβλέπουσα
- 3) **ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Παν/μίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Η επίδραση της αποσιώπησης της πρωτεΐνης TMEM97 στην ανάπτυξη παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων» εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2024 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δήμα Κωνσταντίνου, στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος της Ιατρικής, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Με το πειραματικό κομμάτι της εργασίας να είναι αποκλειστικά εργαστηριακό, η άριστη λειτουργία του εργαστηρίου αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα της ομαλής διεξαγωγής των πειραμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Δήμα Κωνσταντίνο για την αποδοχή μου στην εργαστηριακή του ομάδα και τη σημαντική βοήθειά του στην ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου. Δουλεύοντας στο εργαστήριό του αποκόμισα γνώσεις όσον αφορά τον τρόπο διεξαγωγής έρευνας και εκπαιδεύτηκα σε ορισμένες τεχνικές, όμως ταυτόχρονα ήταν μία σημαντική εμπειρία που μου δίδαξε την υπευθυνότητα με την οποία πρέπει να αντιμετωπίζεται ο χώρος εργασίας.

Επίσης, ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην καθηγήτρια Τσέζου Ασπασία, καθώς και την Παπαθανασίου Ιωάννα που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής και μου έδωσαν χρήσιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κουτσουγιάννη Φανή, για την επίβλεψη, την οργάνωση και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Αλεξοπούλου Δήμητρα για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχε για την καλύτερη πρόοδό μου, αλλά και τους υποψήφιους διδάκτορες, Παπαδογιάννη Ευαγγελία και Λαφαζάνη Κωνσταντίνο και τον επιστημονικό συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μπέγα Ηλία για την άποψη συνεργασία στο εργαστήριο καθ' όλο το ακαδημαϊκό έτος. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη, υλική και κυρίως ψυχολογική που μου παρέχει σε κάθε μου προσπάθεια, το ίδιο και σε αυτή.

Στον Παναγιώτη, που έφυγε νωρίς

Ξανθίππη Μαυροφόρα

Οκτώβριος, 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της αποσιώπησης της πρωτεΐνης TMEM97 στον παγκρεατικό καρκίνο. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που χαρακτηρίστηκε πρόσφατα από μελέτες ως σίγμα-2 υποδοχέας. 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 TMEM97, επιτεύχθηκε η αποσιώπηση της πρωτεΐνης στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached, που αποτελεί πρωτογενή κυτταρική σειρά. Με τον τρόπο αυτό, δύναται να αξιολογηθεί η εμπλοκή αυτής της πρωτεΐνης στην καρκινογένεση του παγκρεατικού καρκίνου. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης μίας ακόμη πρωτεΐνης, της PGRMC1, που σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι σχηματίζει σύμπλοκο με τον TMEM97.

Αρχικά, ελέγχθηκε μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot η αποσιώπηση της πρωτεΐνης TMEM97 και της PGRMC1. Στη συνέχεια και αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής αποσιώπηση των δύο γονιδίων τα κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την δυνατότητα τους να δημιουργούν αποικίες (clonogenic assay). Επίσης μελετήθηκε, ο ρόλος της αποσιώπησης των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1 στον κυτταρικό κύκλο με κυτταρομετρία ροής (FACS), καθώς και ο ρόλος της Σιραμεσίνης σε αυτόν. Τέλος έγινε έλεγχος της δράσης του σίγμα-2 προσδέτη αγωνιστή Σιραμεσίνη, μέσω πειραμάτων ελέγχου κυτταροτοξικότητας (SRB Assay), μετά την αποσιώπηση των δύο πρωτεϊνών ώστε να μελετηθεί ο ρόλος τους στην δράση της πρότυπης αυτής ουσίας-αγωνιστή των σίγμα-2 υποδοχέων.

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη, παρατηρήθηκε πως, όσον αφορά στον υποδοχέα TMEM97, αν και η αποσιώπηση του φαίνεται να μειώνει σημαντικά την έκφρασή του, δεν φαίνεται να επηρεάζει ουσιαστικά την ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες ούτε τον κυτταρικό κύκλο. Η αποσιώπηση του υποδοχέα PGRMC1 δεν φαίνεται να επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, ωστόσο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη μείωση της ικανότητας δημιουργίας αποικιών, υποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας PGRMC1 παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην ογκογένεση σε σχέση με τον TMEM97, για πιο σαφή αποτελέσματα όμως κρίνεται απαραίτητη η διεκπεραίωση περισσότερων πειραμάτων. Επιπλέον, η Σιραμεσίνη, ως σίγμα-2 προσδέτης-αγωνιστής, παρουσιάζει αξιοσημείωτη δόσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση έναντι των πρωτογενών καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος Attached, καθιστώντας την πιθανό εργαλείο για την αναστολή της καρκινογένεσης στον παγκρεατικό καρκίνο, ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται να δρα ανεξάρτητα από την αποσιώπηση των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1. Αυτό υποδηλώνει ότι η Σιραμεσίνη δεν δρα αποκλειστικά μέσω των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1, κάτι που θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ενδιαφέρον πεδίο για μελλοντική μελέτη.

Λέξεις- Κλειδιά: TMEM97, PGRMC1, σίγμα-2 υποδοχέας, παγκρεατικός καρκίνος, siRNA Σιραμεσίνη.

ABSTRACT

The purpose of this thesis is to study the silencing of the TMEM97 protein in pancreatic cancer. TMEM97 is a protein recently characterized in studies as a sigma-2 receptor. The research was based on an endogenous cellular process called RNA interference (RNAi), where, through infection with a specific siRNA targeting TMEM97, the silencing of this protein was achieved in pancreatic cancer cells of the Attached primary cell line. This approach enables the evaluation of the involvement of this protein in the carcinogenesis of pancreatic cancer. Simultaneously, experiments were conducted to silence another protein, PGRMC1, which has been shown in recent studies to form a complex with TMEM97.

Initially, the silencing of TMEM97 and PGRMC1 was verified using the Western blot analysis. After confirming the successful silencing of both genes, the cells were studied for their ability to form colonies (clonogenic assay). Additionally, the role of TMEM97 and PGRMC1 receptor silencing in the cell cycle was examined using flow cytometry (FACS), as well as the role of Siramesine in this process. Finally, the action of the sigma-2 receptor agonist Siramesine was assessed through cytotoxicity experiments (SRB assay) after the silencing of both proteins to investigate their role in the action of this sigma-2 receptor agonist.

Based on the results of this study, it was observed that, concerning the TMEM97 receptor, although its silencing significantly reduces its expression, it does not seem to significantly affect the cells' ability to form colonies or impact the cell cycle. The silencing of the PGRMC1 receptor does not seem to affect the cell cycle but does appear to significantly reduce colony formation, suggesting that PGRMC1 plays a greater role in tumorigenesis than TMEM97. However, more experiments are needed for clearer results. Furthermore, Siramesine, as a sigma-2 receptor agonist, exhibits notable dose-dependent antiproliferative and cytotoxic effects against the Attached primary pancreatic cancer cells, making it a potential tool for inhibiting carcinogenesis in pancreatic cancer. Nevertheless, in all cases, it seems to act independently of the silencing of the TMEM97 and PGRMC1 receptors. This suggests that Siramesine does not act exclusively through the TMEM97 and PGRMC1 receptors, which could be an interesting area for future research.

Keywords: TMEM97, PGRMC1, sigma-2 receptor, pancreatic cancer, siRNA Siramesine.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	9
Εισαγωγή	10
1.1 Καρκίνος.....	10
1.1.1 Χαρακτηριστικά κακοήθους όγκου	11
1.1.1 Τα ορόσημα του καρκίνου.....	12
1.1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου.....	14
1.2 Παγκρεατικός καρκίνος	15
1.2.1 Ανατομία του παγκρέατος.....	15
1.2.1 Παθοφυσιολογία καρκίνου του παγκρέατος.....	16
1.2.2 Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου.....	17
1.2.3 Παράγοντες κινδύνου	19
1.2.4 Διάγνωση	22
1.2.5 Θεραπεία	22
1.3 Σίγμα υποδοχείς.....	24
1.3.1 PGRMC1(Progesterone receptor membrane component 1)	25
1.3.2 TMEM97(Transmembrane protein 97).....	26
1.3.3 Αγωνιστές/ Ανταγωνιστές σίγμα-2 υποδοχέων.....	28
1.3.4 Σιραμεσίνη.....	30
1.3.5 Αποσιώπηση υποδοχέων PGRMC1 και TMEM97 με siRNA.....	31
ΣΚΟΠΟΣ.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	34
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1.1 Κυτταρικές σειρές:.....	35
2.1.3 Καλλιέργεια κυττάρων (Συνθήκες Καλλιέργειας- Ανανέωση- Θρυψινοποίηση)	37
2.1.4 Κατάψυξη κυττάρων.....	38
2.1.5 Απόψυξη κυττάρων.....	39
2.1.6 Καταμέτρηση πλήθους κυττάρων / ποσοστού βιωσιμότητας κυττάρων	39
2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ TMEM97 & PGRMC1	40
2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΜΕΣΩ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT	43

2.3.1 Δημιουργία λυμάτων	43
2.3.2 Ανάλυση Bradford	43
2.3.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot Analysis.....	44
2.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας (SRB Assay).....	48
2.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)	50
2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	52
2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	57
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ TMEM97 ΚΑΙ PGRMC1 ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ siRNA	58
.....	59
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB	60
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (CLONOGENIC ASSAY) 64	
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	73
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα εισβολής και εξάπλωσης σε άλλα μέρη του σώματος. Αποτελεί υποσύνολο των νεοπλασμάτων, δηλαδή πρόκειται για μία ομάδα κυττάρων που αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και σχηματίζουν μία μάζα (What Is Cancer? - National Cancer Institut). Μαζί με τις λοιμώξεις και τις καρδιοπάθειες, αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου του ανθρώπου. Η ανανέωση των ιστών προϋποθέτει την ύπαρξη περίπλοκων μηχανισμών ελέγχου για τον συντονισμό συμπεριφοράς κάθε ξεχωριστού κυττάρου με τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Το κύτταρο πρέπει να διαιρείται με ελεγχόμενο και καθορισμένο τρόπο και να σταματά την διαδικασία αυτή εφόσον δεν είναι αναγκαίο. Όταν ένα κύτταρο υποστεί μία γενετική τροποποίηση που του επιτρέπει να επιβιώνει και να διαιρείται ενώ δεν θα έπρεπε, θα συμβεί μία δυνητικά καταστροφική απώλεια του ελέγχου που θα οδηγήσει σε παραγωγή μεγάλου αριθμού νέων θυγατρικών κυττάρων. Σε αυτήν την περίπτωση, η οργάνωση του ιστού και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού, μπορεί να διαταραχθεί από έναν συνεχώς αυξανόμενο αριθμό κυττάρων, οδηγώντας τελικά στον καρκίνο. Ένας όγκος είναι καρκινικός μόνο εάν τα κύτταρά του έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς, στην περίπτωση αυτή ο όγκος χαρακτηρίζεται ως κακοήθης (Alberts et al., 2006).

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από δύο ιδιότητες. Αναλυτικότερα, τα καρκινικά κύτταρα και οι απόγονοί τους αναπαράγονται αψηφώντας τους φυσιολογικούς περιορισμούς και διεισδύουν και αποικίζουν τόπους που κανονικά αποτελούν την επικράτεια άλλων κυττάρων. Τα κύτταρα που έχουν την πρώτη όχι όμως και την δεύτερη ιδιότητα πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα και παραμένουν συναθροισμένα σε μια ενιαία μάζα και μπορεί να δημιουργήσουν έναν όγκο (ή νεόπλασμα, tumor). Ο όγκος αυτός που τελικά δημιουργείται μπορεί να είτε είτε καλοήθης, δηλαδή χειρουργικά εξαιρέσιμος χωρίς να έχει επιπτώσεις στην υγεία και χωρίς δυνατότητα εξάπλωσης σε παρακείμενου και μη ιστούς, είτε κακοήθης και μεταστατικός ο οποίος χαρακτηρίζεται από την αφύσικη ανάπτυξη των κυττάρων με την δυνατότητα εξάπλωσης και σε άλλες περιοχές του σώματος (Alberts et al., 2006).

Η παλαιότερη γραπτή αναφορά σχετικά με τον καρκίνο βρέθηκε το 1600 π.Χ. σε παπύρους της Αρχαίας Αιγύπτου και περιγράφει τον καρκίνο του μαστού. Ο Ιπποκράτης (περίπου το 460 π.Χ. - 370 π.Χ.) περιέγραψε διάφορα είδη καρκίνου, αναφέροντάς τα με την ελληνική λέξη “καρκίνος” που στα αρχαία ελληνικά χρησιμοποιούνταν για να δηλώσει τα καβούρια ή τις καραβίδες. Ο όρος αυτός πιθανότατα προέρχεται από την εμφάνιση της κομμένης επιφάνειας ενός συμπαγούς κακοήθους όγκου που ομοιάζει με το σχήμα του κάβουρα (Karpozilos et al., 2004).

Σύμφωνα με το εθνικό ινστιτούτο καρκίνου, ο καρκίνος είναι μία γενετική, πολυπαραγοντική ασθένεια που οφείλεται σε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης και

λειτουργίας γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να αφορούν λάθη που γίνονται κατά τη διαίρεση των κυττάρων, καταστροφή του DNA που μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να έχουν κληροδοτηθεί από τους γονείς, σε μικρό ποσοστό. Διαφέρει από άλλα γενετικά νοσήματα κατά το γεγονός ότι οι εμπλεκόμενες μεταλλάξεις είναι σωματικές (somatic mutations), δηλαδή συμβαίνουν σε διάσπαρτα μεμονωμένα κύτταρα του ώριμου σώματος και διαφέρουν από τις μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς (germ-line mutations), που μεταβιβάζονται μέσω των γαμετικών κυττάρων, από τα οποία αναπτύσσεται ολόκληρος ο πολυκύτταρος οργανισμός (What Is Cancer? - National Cancer Institute).

1.1.1 Χαρακτηριστικά κακοήθους όγκου

Ο καρκίνος είναι μια πολυδιάστατη, πολυπαραγοντική ασθένεια. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό κύτταρο, πρέπει να τροποποιηθούν τα γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Karpoulos et al., 2004). Τα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

A) Πρωτο-ογκογονίδια: Τα πρωτο-ογκογονίδια βρίσκονται σε φυσιολογικά κύτταρα και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που βοηθούν στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Με την απόκτηση μίας μετάλλαξης σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα, το πρωτο-ογκογονίδιο γίνεται παράγοντας επαγωγής όγκου, ογκογονίδιο.

B) Ογκοκατασταλτικά γονίδια: Οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, μειώνουν την ενεργότητα τους. Οι απενεργοποιήσεις είναι αποτέλεσμα μη νοσηματικών σημειακών μεταλλάξεων, ελλείψεων, ενθέσεων ή ακόμη και γενετικής αποσιώπησης. Απαιτούνται μεταλλαγές και στα δύο αλληλόμορφα, προκειμένου το κύτταρο να αποκτήσει επιλεκτικό πλεονέκτημα και να μετατραπεί σε καρκινικό. Ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι το p53, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 η οποία διεγείρει τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς σε περίπτωση βλάβης. Μετάλλαξη του γονιδίου αυτού οδηγεί σε καρκινογένεση (Knudson et al., 2002).

Γ) Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA: Μία τρίτη ομάδα καρκινικών γονιδίων, τα γονίδια σταθερότητας ή φροντιστές, επάγουν την ογκογένεση με εντελώς διαφορετικό τρόπο, όταν μεταλλάσσονται. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τα γονίδια επιδιόρθωσης του αταίριαστου ζευγαρώματος (MMR: mismatch repair genes), τα γονίδια επιδιόρθωσης μέσω αφαίρεσης νουκλεοτιδίου (NER: nucleotide - excision repair genes) και τα γονίδια επιδιόρθωσης μέσω αφαίρεσης βάσης (BER: base-excision repair genes). Τα παραπάνω γονίδια είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση μικρών λαθών που συμβαίνουν κατά τη φυσιολογική αντιγραφή του DNA ή κατά την έκθεση σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό πρέπει να απενεργοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα των γονιδίων σταθερότητας (Vogelstein et al., 2002).

Εν ολίγοις, ένας κακοήθης όγκος μπορεί να δημιουργηθεί είτε λόγω σχηματισμού νέων ογκογονιδίων, είτε λόγω υπερέκφρασης των ήδη υπαρχόντων ογκογονιδίων, είτε λόγω

μειωμένης έκφρασης ή απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Karpozilos et al., 2004).

1.1.2 Τα ορόσημα του καρκίνου

Σύμφωνα με τους Hanahan και Weinberg (2000), όλα τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν έξι χαρακτηριστικά γνωρίσματα (Εικόνα 1.1).

Αυτάρκεια στα αυξητικά σήματα. Τα καρκινικά κύτταρα δεν χρειάζονται διέγερση από εξωτερικά σήματα (με τη μορφή αυξητικών παραγόντων) για την έναρξη του πολλαπλασιασμού. Τα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος απαιτούν ορμόνες και άλλα μόρια που δρουν ως σήματα για να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν. Τα καρκινικά κύτταρα, ωστόσο, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται χωρίς αυτά τα εξωτερικά σήματα. Παράγουν από μόνα τους αυτά τα σήματα, ενεργοποιώντας μόνιμα τις οδούς σηματοδότησης που ανταποκρίνονται σε αυτά. Επιπλέον, η κυτταρική διαίρεση στα φυσιολογικά κύτταρα ελέγχεται αυστηρά. Στα καρκινικά κύτταρα, αυτές οι διαδικασίες απορυθμίζονται επειδή οι πρωτεΐνες που τις ελέγχουν μεταβάλλονται, οδηγώντας σε αυξημένη ανάπτυξη και κυτταρική διαίρεση εντός του όγκου.

Ανθεκτικότητα σε σήματα ανασταλτικά της κυτταρικής αύξησης. Για τον αυστηρό έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς εντός τους που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και διαίρεσή τους που αποτελούνται από πρωτεΐνες αναστολείς της ανάπτυξης όγκου. Τα γονίδια αυτών, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, λαμβάνουν πληροφορίες από το κύτταρο, ώστε να σταματήσουν την κυτταρική διαίρεση εάν υπάρχει κάποια βλάβη. Στον καρκίνο, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν υποστεί μετάλλαξη, έτσι ώστε να προωθούν την κυτταρική διαίρεση, ακόμη και όταν το κύτταρο έχει σοβαρές ανωμαλίες.

Αποφυγή της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (κυτταρική αυτοκτονία), μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα προγραμματίζονται να πεθάνουν σε περίπτωση που καταστραφούν. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να μεταβάλλουν τους μηχανισμούς που ανιχνεύουν βλάβες και ανωμαλίες του DNA, με αποτέλεσμα να παρακάμπτουν το στάδιο της απόπτωσης, ακόμα και όταν έχουν υποστεί σοβαρές ανωμαλίες.

Απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής. Τα φυσιολογικά κύτταρα μετά από έναν ορισμένο αριθμό διαιρέσεων περνάνε στην φάση της κυτταρικής γήρανσης. Τα καρκινικά κύτταρα ξεφεύγουν από αυτό το όριο και είναι ικανά για απεριόριστη ανάπτυξη και διαίρεση. Ο περιορισμός αυτός στα φυσιολογικά κύτταρα οφείλεται στα τελομερή. Τα τελομερή είναι τμήματα DNA που βρίσκονται στα άκρα κάθε χρωμοσώματος. Τα τελομερή, μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση συρρικνώνονται σταδιακά, μέχρις ότου ενεργοποιηθεί η κυτταρική γήρανση και σταματήσει η αντιγραφή. Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν το ένζυμο τελομεράση, που αποτρέπει την μείωση των τελομερών και με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα μπορούν να διαιρούνται απεριόριστα, χωρίς να ενεργοποιείται το στάδιο της γήρανσης.

Παρατεταμένη αγγειογένεση. Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία με την οποία σχηματίζονται νέα αιμοφόρα αγγεία. Στα φυσιολογικά κύτταρα η αγγειογένεση παρέχει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την ανάπτυξη

τους. Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την αγγειογένεση κοντά στην περιοχή του όγκου, εξασφαλίζοντας ότι τα κύτταρα αυτά θα λαμβάνουν συνεχώς οξυγόνο και άλλα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία.

Εισβολή ιστών και μετάσταση. Μία από τις πιο γνωστές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να φεύγουν από την θέση ή το όργανο στο οποίο αναπτύχθηκε ο πρωτογενής όγκος και να εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς, στους οποίους πολλαπλασιάζονται απεριόριστα και δημιουργούν νέους όγκους (Fouad & Aanei, 2017|Hanahan & Weinberg 2000).

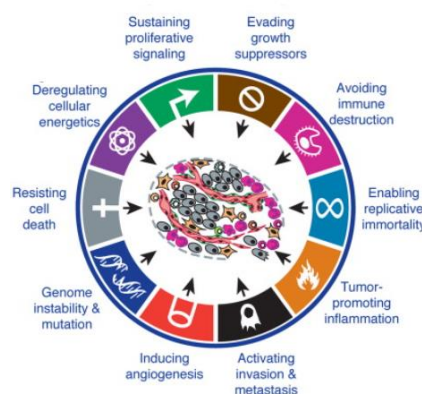
Το 2011, μια περαιτέρω έρευνα των Douglas Hanahan και Robert A. Weinberg πρόσθεσε τέσσερα ακόμα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων:

Επαναπρογραμματισμός του Μεταβολισμού της Ενέργειας. Τα καρκινικά κύτταρα τροποποιούν τον μεταβολισμό της γλυκόζης και κατ' επέκταση της παραγωγής ενέργειας, ενεργοποιώντας ένα νέο μονοπάτι στο οποίο επικρατεί ο αναερόβιος μεταβολισμός, αλλά γίνεται και παρουσία οξυγόνου.

Αποφυγή της ανοσιακής καταστροφής. Τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν την αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος, επιτρέποντάς τα να επιβιώνουν.

Γενομική αστάθεια και μεταλλάξεις. Η ογκογένεση ξεκινά από μικρές γενετικές μεταλλάξεις και στη συνέχεια μπορούν να μεταλλαχθούν με πολύ ταχύτερους ρυθμούς. Τα καρκινικά κύτταρα, καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, έχουν σοβαρές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και συσσωρευμένες μεταλλάξεις σε σημαντικά γονίδια για την επιβίωση του κυττάρου, παρόλα αυτά τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται.

Φλεγμονή. Η χρόνια τοπική φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση πολλών τύπων καρκίνου. Η φλεγμονή οδηγεί σε αγγειογένεση και αυξάνει τις πιθανότητες μετάστασης (Hanahan & Weinberg, 2011).



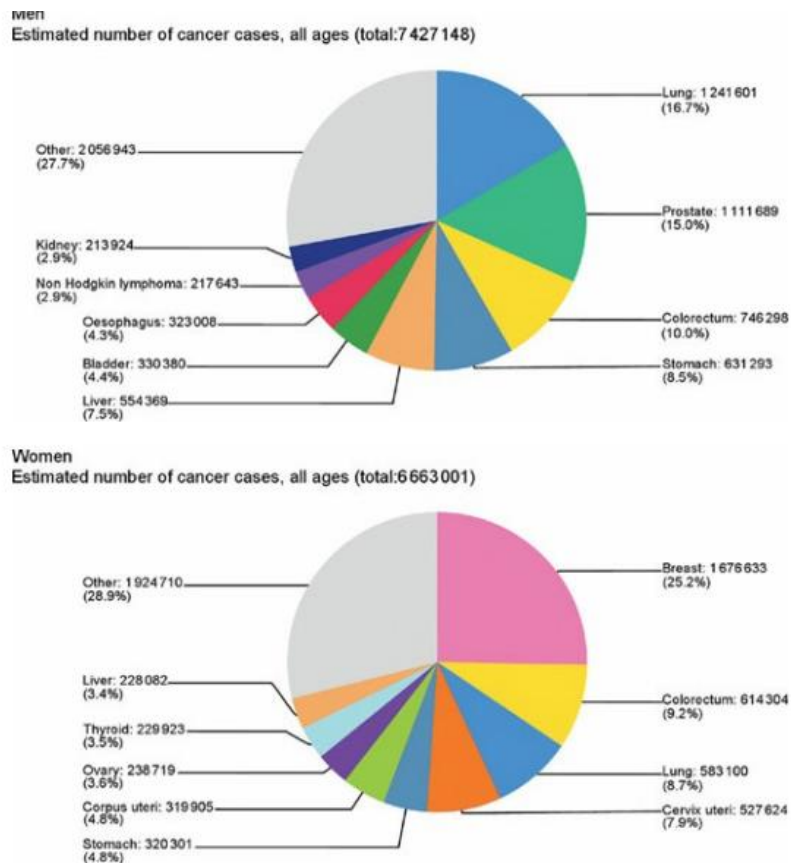
Εικόνα 1.1: Τα 10 ορόσημα του καρκίνου (Hanahan and Weinberg 2011).

1.1.3 Επιδημιολογία του καρκίνου

Υπάρχουν πάνω από 100 γνωστοί τύποι καρκίνου που προσβάλλουν τον άνθρωπο σύμφωνα με το NIH (National Institutes of Health). Η πιθανότητα επιβίωσης του ασθενούς εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου και την έκταση της νόσου από τη στιγμή της διάγνωσης και κατά την έναρξη της θεραπείας. Το 2015 έγινε αναφορά ότι περίπου 90,5 εκατομμύρια άνθρωποι έπασχαν από καρκίνο, ενώ περίπου 14,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου καταγράφονται κάθε χρόνο.

Οι πιο κοινές μορφές καρκίνου στους άνδρες είναι ο καρκίνος του πνεύμονα (16,7%), του προστάτη (15,0%), του παχέος εντέρου (10,0%), ο καρκίνος του στομάχου (8,5%) και του ήπατος (7,5%). Στις γυναίκες, οι συνηθέστεροι τύποι είναι ο καρκίνος του μαστού (25,2%), του παχέος εντέρου (9,2%), του πνεύμονα (8,7%) και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (7,9%). Στα παιδιά, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και οι όγκοι του εγκεφάλου είναι πιο συνηθισμένες μορφές καρκίνου (Εικόνα 1.2).

Μεταξύ των ανδρών, ο καρκίνος του πνεύμονα έχει την υψηλότερη επίπτωση (34,2 ανά 100 000) και ο καρκίνος του προστάτη έχει την δεύτερη υψηλότερη επίπτωση (31,1 ανά 100 000). Μεταξύ των γυναικών, ο καρκίνος του μαστού έχει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης (43,3 ανά 100 000) από οποιοδήποτε άλλο καρκίνο. Την επόμενη υψηλότερη επίπτωση εμφανίζει ο καρκίνος του παχέος εντέρου (14,3 ανά 100 000) (Stewart & Wild 2014).



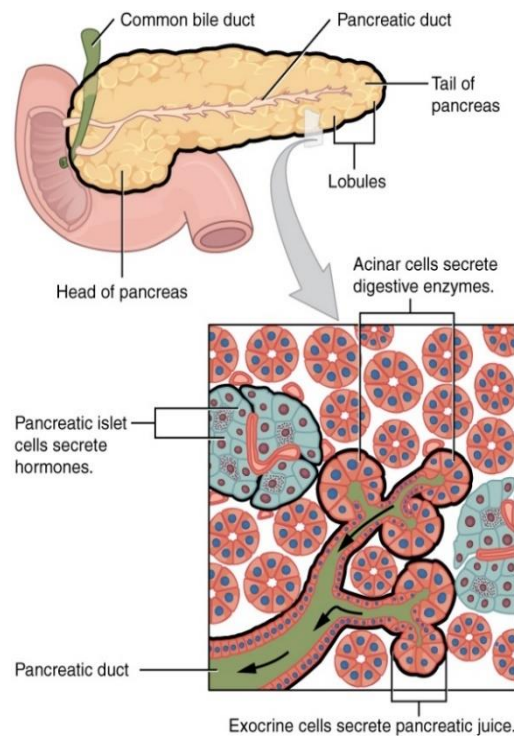
Εικόνα 1.2: Εκτιμήσεις ποσοστών εμφάνισης καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο σε άντρες και γυναίκες (Stewart, B. W., Wild, C. P. 2014).

1.2 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.2.1 Ανατομία του παγκρέατος

Το πάγκρεας αποτελεί το δεύτερο σε μέγεθος αδένά του πεπτικού συστήματος μετά το ήπαρ. Βρίσκεται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, πίσω από το στομάχι, και εκτείνεται από την αγκύλη του δωδεκαδάκτυλου μέχρι και τον σπλήνα. Έχει μήκος περίπου 15 cm και σχήμα πεπλατυσμένου αχλαδιού. Ο παγκρεατικός αδένας είναι μικτός αδένας, ενδοκρινής και εξωκρινής, και αποτελείται από τέσσερα τμήματα: την κεφαλή, που είναι το διογκωμένο τμήμα, τον αυχένα, που είναι το ενδιάμεσο τμήμα, ακολουθεί το σώμα που είναι το μακρύτερο τμήμα του αδένος και το στενότερο τμήμα που ονομάζεται ουρά και καταλήγει δίπλα στον σπλήνα. Η κεφαλή βρίσκεται μέσα στην αγκύλη του δωδεκαδάκτυλου και έχει πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια. Ο αυχένος είναι το τμήμα που βρίσκεται μπροστά από την άνω μεσεντέρια φλέβα, το σώμα εντοπίζεται στην αριστερή πλευρά του αυχένος, ενώ η ουρά προεκτείνεται στα αριστερά του σώματος, έως τον σπλήνα (Εικόνα 1.3) (Skandalakis, L.J. et al. 1993).

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, με κύρια λειτουργία την παραγωγή ορμονών όπως η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη και η αυξητική ορμόνη και αποτελούν το ενδοκρινές τμήμα, καθώς και τα εκκριτικά κύτταρα, που είναι υπεύθυνα για έκκριση παγκρεατικών ενζύμων (Karpińska & Czauderna, 2022).



Εικόνα 1.3: Ανατομία του παγκρέατος (Pancreas Functions, Location & Disease | Columbia Surgery)

1.2.2 Παθοφυσιολογία του καρκίνου του παγκρέατος

Ο καρκίνος του παγκρέατος εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα, όπως χημειοθεραπείες, ραδιοθεραπείες και μοριακές θεραπείες, ενώ χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση και διάγνωση μιας και ανιχνεύεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο, καθιστώντας τη θεραπεία αναποτελεσματική. Συγκεκριμένα, το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου είναι κάτω του 7%, με εξαίρεση αυτούς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση που αυξάνεται στο 15-25% (Kleeff et al., 2016|Goral V., 2015). Χαρακτηρίζεται ως μια θανατηφόρος νόσος καθώς αποτελεί μια από τις πιο επιθετικές και θανάσιμες κακοήθειες (Hu et al., 2021). Συγκεκριμένα αποτελεί τη πιο σοβαρή ασθένεια του παγκρέατος και περιλαμβάνει δύο είδη νεοπλασμάτων, αυτά που προέρχονται από κύτταρα εξωκρινούς μοίρας και τα νεοπλάσματα που προέρχονται από κύτταρα ενδοκρινούς μοίρας, γνωστά και ως νευροενδοκρινή νεοπλάσματα, καθώς και νεοπλάσματα νησιδίων του Langerhans (Ercan, Karlitepe, and Ozpolat 2017). Τόσο τα εξωκρινή όσο και τα ενδοκρινή κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία νεοπλασμάτων. Από κύτταρα με ενδοκρινή μοίρα προκύπτουν λιγότερο συχνόι όγκοι, με ποσοστό εμφάνισης 5%, σε αντίθεση με το 95%

που αφορά στα κύτταρα εξωκρινής μοίρας (Hajj and Goodman, 2015)| Karpińska & Czauderna, 2022).

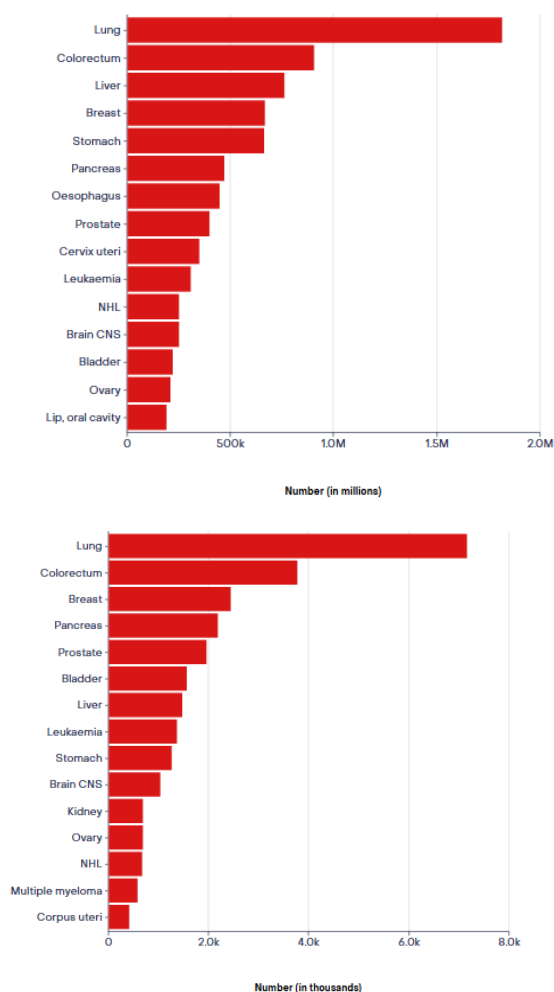
Οι όγκοι της εξωκρινούς μοίρας διακρίνονται σε καλοήθεις, όπως το αδένωμα, το λίπωμα, το κυσταδένωμα κ.α, και σε κακοήθεις όγκους από τους οποίους ο πιο κοινός είναι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) που αναπτύσσεται κυρίως στην κεφαλή του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί περίπου το 90% (Zhang et al., 2020) των περιπτώσεων του παγκρεατικού καρκίνου και αφορά τον εξωκρινή αδένω του παγκρέατος ο οποίος αποτελείται από τα κυψελιδικά και τα κύτταρα του πόρου. Συνήθως το εξωκρινές αδενοκαρκίνωμα προέρχεται από τα κύτταρα του πόρου και σε πιο σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προέλθει από τα κύτταρα που εκκρίνουν τα πεπτικά ένζυμα ή αλλιώς τα κυψελιδικά κύτταρα. Περισσότερες από το 60-70% των περιπτώσεων του αδενοκαρκινώματος (PDAC) εντοπίζονται στο κεφάλι του παγκρέατος και οι οποίες διαγιγνώσκονται πιο νωρίς από αδενοκαρκινώματα που προέρχονται από το σώμα και την ουρά του παγκρέατος και οι οποίες συνδέονται με πιο κακή πρόγνωση (Sarantis et al., 2020).

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αναπτύσσεται μέσα από μια σειρά σταδιακών μεταλλάξεων που επιδέχεται ο φυσιολογικός βλεννογόνος, η οποία οδηγεί σε συγκεκριμένες πρόδρομες βλάβες και τελικά σε κακοήθεια. Πρόδρομοι αυτής της κακοήθειας είναι η παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, τα ενδοπορικά βλεννώδη νεοπλάσματα και τα βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα, τα οποία έχουν μοναδικά κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά (McGuigan et al., 2018a).

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, λόγω της εξαιρετικά περίπλοκης και επιθετικής φύσης του, παρά τις όποιες θεραπείες που εφαρμόζονται, είναι από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνους, συνολικά, στον άνθρωπο. Τέλος, ιδιότητες όπως η πρόωμη διήθηση και η μετάσταση συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα έναντι των θεραπειών, γεγονός το οποίο οδηγεί στην κακή πρόγνωση αυτής της κακοήθειας (Ercan et al., 2017). Έτσι, η διερεύνηση της παθοφυσιολογίας, των πιθανών αιτιών καθώς και νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων αποτελεί πρόκληση για τους επιστήμονες.

1.2.3 Επιδημιολογία παγκρεατικού καρκίνου

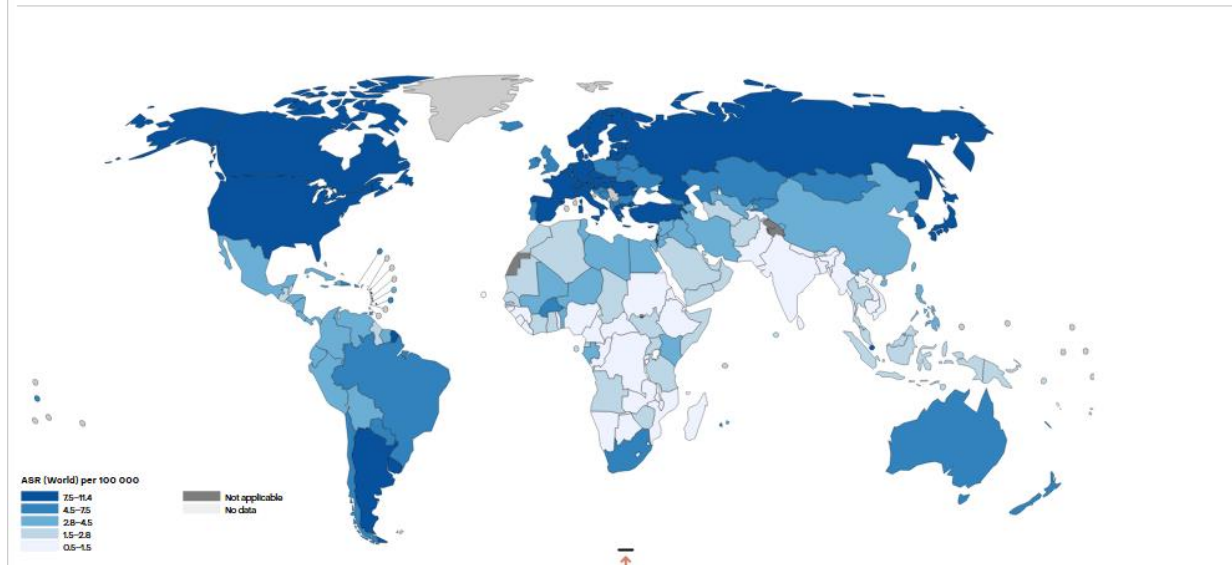
Σύμφωνα με την GLOBOCAN (2022) ο καρκίνος του παγκρέατος κατείχε το 2022 παγκοσμίως την 12η θέση, ενώ στην Ελλάδα την 6η θέση. Παγκοσμίως αποτελεί την 6η αιτία θανάτου από καρκίνο ενώ στην Ελλάδα την 4η. Παρατηρείται μία αύξηση όσον αφορά τους θανάτους σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης του, κάτι το οποίο υποδηλώνει την σοβαρότητα της νόσου και κυρίως την αδυναμία αντιμετώπισης της (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Ραβδογράμματα απεικόνισης της θνησιμότητας του παγκρεατικού καρκίνου σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο (πάνω) και στην Ελλάδα (κάτω) για το 2022 (*GLOBOCAN 2022: New Global Cancer Data | UICC*).

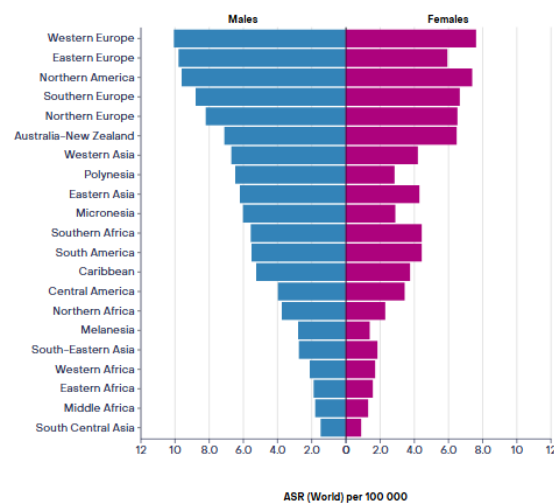
Όσον αφορά στη γεωγραφική κατανομή, οι περισσότερες περιπτώσεις καταγράφονται στην Ευρώπη και στη Νότια Αμερική, ενώ σε χαμηλότερο βαθμό παρατηρούνται στην Αφρική (Εικόνα 1.5). Οι επιδημιολογικές μελέτες παρουσιάζουν διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης της νόσου, καθώς και θνησιμότητας, μεταξύ των δύο φύλων. Οι άντρες έχουν ελαφρώς αυξημένες πιθανότητες τόσο να νοσήσουν από παγκρεατικό καρκίνο (Εικόνα 1.6) όσο και να αποβιώσουν από αυτόν σε σχέση με αυτές των γυναικών. Εκτιμάται ότι το έτος 2022 καταγράφηκαν 510.992 περιπτώσεις (4,7%) καρκίνου του παγκρέατος και 467.409 θάνατοι από καρκίνο του παγκρέατος, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 4.2%.

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Pancreas



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος σε παγκόσμιο επίπεδο και για τα δύο φύλα για το έτος 2022 σύμφωνα με την *GLOBOCAN(2022)*.

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Males and Females, in 2022
Pancreas
UN Regions



Εικόνα 1.6: Ραβδόγραμμα απεικόνισης της εμφάνισης του παγκρεατικού καρκίνου μεταξύ αντρών και γυναικών, σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2022 (*GLOBOCAN 2022*)

1.2.4 Παράγοντες Κινδύνου

Πολλοί περιβαλλοντικοί και μη περιβαλλοντικοί παράγοντες σχετίζονται με την ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου αφορούν σε συνήθειες και επιλογές του ατόμου. Το κάπνισμα είναι ο πιο κοινός γνωστός παράγοντας κινδύνου, υπεύθυνος για περίπου 20-25% όλων των όγκων του παγκρέατος (Raimondi, Maisonneuve and Lowenfels, 2009). Μελέτες σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς έδειξαν ότι οι

καπνιστές έχουν 72% αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, με το 16% όλων των διαγνώσεων να μπορούν να αποφευχθούν μέσω προληπτικών μέτρων κατά του καπνίσματος (Molina-Montes et al., 2020).

Το αλκοόλ αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου. Η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ (πάνω από τρία ποτά την ημέρα) έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση παγκρεατικού καρκίνου, ενώ οι χαμηλές ποσότητες δεν φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου. Ειδικότερα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος στους άνδρες, κάτι που μπορεί να εξηγήσει τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. (Rawla et al., 2019|Gupta et al., 2010).

Η διατροφή επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του παγκρεατικού καρκίνου. Δίαιτες πλούσιες σε φρούτα, λαχανικά και άλλα τρόφιμα φυτικής προέλευσης μειώνουν τον κίνδυνο, ενώ η κατανάλωση κρέατος και ζωικών προϊόντων τον αυξάνει. Η κατανάλωση κόκκινου κρέατος σε υψηλή θερμοκρασία και ετεροκυκλικών αμινών που σχηματίζονται κατά το μαγείρεμα μπορεί να προκαλέσουν εξωκρινή καρκίνο του παγκρέατος (Tsai & Chang, 2019| Stolzenberg-Solomon et al., 2007).

Η παχυσαρκία είναι ένας ισχυρός, αλλά τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου. Οι υπέρβαροι ασθενείς παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με φυσιολογικό βάρος. Η παχυσαρκία σε πρώιμη ενήλικη ζωή μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον κίνδυνο θνησιμότητας από καρκίνο του παγκρέατος αργότερα στη ζωή. Η παχυσαρκία δημιουργεί μια προ-φλεγμονώδη κατάσταση που επηρεάζει αρνητικά την ισορροπία προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών μορίων, οδηγώντας σε αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των ιστών και επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (M. Xu et al., 2018|Genkinger et al., 2015).

Η κοινωνικοοικονομική κατάσταση επίσης παίζει ρόλο στην εμφάνιση και τη θνησιμότητα του παγκρεατικού καρκίνου. Άτομα με χαμηλή ασφαλιστική κάλυψη έχουν λιγότερη ή καθόλου πρόσβαση σε ιατρική περίθαλψη, κάτι που καθυστερεί τη διάγνωση και τη θεραπεία της νόσου. Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με ιδιωτική ασφάλιση έχουν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με κοινωνικές ομάδες με χαμηλότερη οικονομική κατάσταση (Sun et al., 2020).

Παράγοντες κινδύνου που δεν επηρεάζονται από τις συνήθειες ενός ατόμου περιλαμβάνουν την ηλικία, το φύλο και την εθνικότητα. Οι πιθανότητες εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου αυξάνονται με την ηλικία, με τους άνδρες να παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά της νόσου. Επιπλέον, το μικροβίωμα του στόματος, του εντέρου και του παγκρέατος έχει συσχετιστεί με την πρόκληση προ-φλεγμονωδών καταστάσεων και κατ' επέκταση την εμφάνιση καρκίνου (Chen et al., 2016)

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί επίσης κρίσιμο παράγοντα κινδύνου. Οι ασθενείς με διαβήτη έχουν αυξημένο ρίσκο για τον καρκίνο του παγκρέατος. Ο διαβήτης που εμφανίζεται νωρίτερα από το αναμενόμενο μπορεί να είναι εκδήλωση του καρκίνου του παγκρέατος, ενώ μακροχρόνιος διαβήτης αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξή της νόσου (Huang et al., 2019).

Η κληρονομικότητα και το γενετικό υπόβαθρο παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Η κληρονομική παγκρεατίτιδα σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος, ενώ περίπου το 10% των περιπτώσεων σχετίζονται με κληρονομικά σύνδρομα ή οικογενή καρκίνο του παγκρέατος. Οι 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 (Landi, 2009). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS έχουν ταυτιστεί πλήρως με την πρόκληση καρκίνου του παγκρέατος. Αυτές οι μεταλλάξεις απορυθμίζουν την εγγενή δραστηριότητα της GTPάσης, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καταστολή της απόπτωσης (Morani et al., 2020).

Η χρόνια παγκρεατίτιδα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, καθώς η φλεγμονή οδηγεί σε ίνωση του παγκρέατος και απώλεια των νησίδων του Langerhans. Η χρόνια παγκρεατίτιδα μπορεί να προκαλέσει ανεπάρκεια της εξωκρινούς και ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, διαταράσσοντας το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα των κυττάρων και οδηγώντας σε καταστροφή του DNA και ενεργοποίηση ογκογονιδίων (Dhar, Kalghatgi and Saraf) .

Καταλυτικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου του καρκίνου και την απόκριση στις εκάστοτε θεραπευτικές προσπάθειες είναι τα ολοένα αυξανόμενα στοιχεία που τη συνδέουν με το μικροβίωμα. Πιο ειδικά, αρκετές πληθυσμιακές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι στοματικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στην περιοδοντίτιδα συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Michaud et al., 2007) . Αυτό μπορεί να οφείλεται σε συστηματικές φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις που προκαλούνται από συγκεκριμένα βακτήρια και μεταβολίτες αυτών (X. Zhang et al., 2020). Σε μια άλλη έρευνα το *Porphyromonas gingivalis*, βακτήριο το οποίο αποτελεί κυρίαρχο αίτιο της περιοδοντίτιδας, συσχετίστηκε με 59% υψηλότερο ρίσκο ανάπτυξης παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος διαδραματίζοντας ρόλο στην αιτιολογία του (Fan et al., 2018). Ένας από τους πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς που φαίνεται να εμπλέκεται, είναι η ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR (Toll Like Receptors), οι οποίοι ενεργοποιούνται από μικροοργανισμούς μεταβολίτες αυτών και φλεγμονώδεις παράγοντες. Ως αποτέλεσμα αυτών ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το NF-kB και το MAPK που ως γνωστών έχουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού (Li et al., 2020). Ωστόσο, τα δεδομένα που συσχετίζουν την μικροχλωρίδα με την ανάπτυξη PDAC είναι αρκετά περιορισμένα και θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω.

Επιπλέον πρόσφατα δεδομένα έχουν υποδείξει ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε ανθρώπινες παγκρεατικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένων της παγκρεατίτιδας και του παγκρεατικού καρκίνου (Akshintala et al., 2019). Για παράδειγμα, ευρήματα από πληθώρα μελετών σε ασθενείς με PDAC (Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma) υποδεικνύουν ότι η μόλυνση από το βακτήριο *Helicobacter pylori* σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης του καρκίνου αυτού του τύπου (Guo et al., 2016). Μπορεί να πυροδοτήσει ανοσολογική απόκριση που σχετίζεται με τον σχηματισμό όγκου (Memba et al. 2017).

1.2.5 Διάγνωση

Η έγκαιρη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου είναι σπάνια, καθιστώντας τον έναν από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου. Συνήθως, η διάγνωση γίνεται αφού έχουν ήδη λάβει χώρα μεταστάσεις και η νόσος βρίσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο, με μόνο το 10% των διαγνώσεων να αφορούν καρκίνους του παγκρέατος που δεν έχουν ακόμα υποστεί μετάσταση (Zhang, Sanagapalli, and Stoita 2018).

Οι περισσότεροι ασθενείς δεν εμφανίζουν διακριτά συμπτώματα που να είναι χαρακτηριστικά του παγκρεατικού καρκίνου στα πρώιμα στάδια της νόσου. Κατά την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου, το 70-80% των ασθενών παρουσιάζουν έντονο κοιλιακό πόνο, ο οποίος εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή του στομάχου και μερικές φορές επεκτείνεται προς την πλάτη. Άλλα κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν ίκτερο (σε περίπτωση που ο όγκος φράζει το σημείο εισόδου της χολής στο δωδεκαδάκτυλο), μειωμένη όρεξη, απώλεια βάρους και διάρροια, συμπτώματα που συμπίπτουν με αυτά άλλων κοινών ασθενειών. Ωστόσο, η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες πρώιμης διάγνωσης μέσω προληπτικών εξετάσεων.

Εκτός από τη συμπτωματολογία, υπάρχουν και απεικονιστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και επιβεβαίωση του παγκρεατικού καρκίνου. Αυτές περιλαμβάνουν το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS), το οποίο μπορεί να συνδυαστεί με παρακέντηση με λεπτή βελόνα για τη λήψη κυττάρων του όγκου για βιοψία (EUS-FNA), τη μαγνητική τομογραφία (MRI) και τη μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (MRCP), που εξειδικεύεται στην εξέταση του παγκρέατος, της χοληδόχου κύστης και των χοληφόρων πόρων. Μια άλλη κοινή μέθοδος είναι η αξονική τομογραφία (MDCT) (Unger et al., 2018).

Η χρήση καρκινικών βιοδεικτών αποτελεί επίσης μέθοδο διάγνωσης. Ορισμένοι από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου είναι τα αντιγόνα υδατανθράκων CA19-9, CA242, CA125 και το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA), με τον CA19-9 να είναι ο πιο εξειδικευμένος (Haglund et al. 1994). Έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων καρκινικών δεικτών αυξάνει την ευαισθησία της διάγνωσης. Ωστόσο, αυτοί οι δείκτες δεν είναι απόλυτα αξιόπιστοι, καθώς παρουσιάζουν αυξημένες τιμές και σε άλλες παγκρεατικές και ηπατικές ασθένειες, οδηγώντας σε πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Marrelli et al. 2009).

Συνεπώς, για την ορθή και έγκαιρη αξιολόγηση, είναι απαραίτητος ο συνδυασμός της εξέτασης καρκινικών δεικτών και της εφαρμογής απεικονιστικών μεθόδων.

1.2.6 Θεραπεία

Έρευνες έχουν δείξει ότι η έγκαιρη διάγνωση έχει θετική επίδραση στη μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών. Ωστόσο, δεδομένου ότι ο καρκίνος του παγκρέατος είναι μια πολύ επιθετική μορφή καρκίνου με κακή διάγνωση, οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται ήδη με μεταστάσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μέση επιβίωση των ασθενών να είναι περίπου έξι μήνες, ενώ λιγότερο από το 10% των ασθενών επιβιώνουν για πέντε έτη, κυρίως όσοι διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο (Takeda et al. 2017).

Οι διάφοροι τύποι παγκρεατικού καρκίνου ταξινομούνται βάσει του συστήματος σταδιοποίησης TNM (Tumor Node Metastasis), το οποίο αξιολογεί τον πρωτογενή όγκο, αναφορικά με την τοπική διήθηση του όγκου (στάδιο T), την ύπαρξη διηθημένων λεμφαδένων (στάδιο N) και την παρουσία μεταστάσεων (στάδιο M) (Brierley 2006). Ο καρκίνος του παγκρέατος ομαδοποιείται σε τέσσερα στάδια, με το τέταρτο να είναι το πιο προχωρημένο. Η κατηγοριοποίηση αυτή βοηθά στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου είναι μια από τις κύριες μεθόδους διαχείρισης και αντιμετώπισης του παγκρεατικού καρκίνου. Θεωρείται η βέλτιστη θεραπευτική προσέγγιση όταν ο όγκος είναι εξαιρέσιμος και χωρίς μεταστάσεις. Η επέμβαση, όταν είναι εφικτή, αυξάνει το προσδόκιμο ζωής στους 11-20 μήνες. Δεδομένης της καθυστερημένης διάγνωσης και της έντονης μεταστατικής φύσης του καρκίνου του παγκρέατος, η χειρουργική επέμβαση δεν είναι πάντα δυνατή. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός προεγχειρητικής θεραπείας και επέμβασης αυξάνει το προσδόκιμο επιβίωσης και βελτιώνει την ποιότητα ζωής των ασθενών. Η προεγχειρητική θεραπεία στοχεύει στον περιορισμό μικρομεταστάσεων και στη συρρίκνωση του όγκου, διευκολύνοντας τη διαδικασία της επέμβασης. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές, καθυστερώντας ή καθιστώντας μη εφικτή την εκτομή του όγκου. Η ενισχυτική θεραπεία μετά την εκτομή του όγκου βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών (Motoi and Unno n.d.).

Εκτός από την χειρουργική εκτομή του όγκου, η χημειοθεραπεία αποτελεί επίσης θεραπευτική προσέγγιση, ιδιαίτερα όταν ο καρκίνος του παγκρέατος έχει δημιουργήσει απομακρυσμένες εστίες. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο σχήμα φαρμάκων είναι η χορήγηση λευκοβορίνης σε συνδυασμό με 5-φλουορουρακίλη, ιρινοτεκάνη και οξαλιπλατίνη (FOLFIRINOX). Εάν ο ασθενής δεν μπορεί να δεχτεί συνδυασμό φαρμάκων, η πρώτη επιλογή είναι η γεμισιταβίνη (Chin et al. 2018). Η γεμισιταβίνη και η 5-φλουορουρακίλη είναι αποδοτικές για τον παγκρεατικό καρκίνο, με την γεμισιταβίνη να είναι πιο αποτελεσματική και να έχει λιγότερες παρενέργειες. Από το 1997, η γεμισιταβίνη θεωρείται θεραπεία πρώτης γραμμής. Έρευνες έδειξαν ότι αύξησε το χρόνο επιβίωσης κατά ένα μήνα σε σχέση με την 5-φλουορουρακίλη, φτάνοντας τους 5,6 μήνες. Το 18% των ασθενών επιβιώνουν για ένα έτος. Ο συνδυασμός άλλων φαρμάκων με τη γεμισιταβίνη δεν έδειξε βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών (Adamska, Domenichini, and Falasca).

Το 2011, μια έρευνα έδειξε ότι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου που λάμβαναν FOLFIRINOX είχαν μέσο όρο επιβίωσης 11,3 μήνες και καλύτερη ποιότητα ζωής σε σχέση με όσους λάμβαναν μονοθεραπεία με γεμισιταβίνη (Mohammed et al. 2014). Μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση αφορά το Nab-paclitaxel, ένα νανοσωματίδιο προσδεδεμένο σε αλβουμίνη με paclitaxel, που αναπτύχθηκε για να αποφευχθούν οι αντιδράσεις από τους διαλύτες των αντικαρκινικών παραγόντων. Κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι ο συνδυασμός paclitaxel και γεμισιταβίνης αύξησε τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη μονοθεραπεία με γεμισιταβίνη (Mohammed et al. 2014).

Τέλος, η ραδιοθεραπεία χρησιμοποιείται για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με ακτίνες X. Όσον αφορά την ανοσοθεραπεία, φαίνεται πως δεν είναι αποτελεσματική μέχρι σήμερα, καθώς ο καρκίνος του παγκρέατος δεν είναι ανοσογονικός τύπος καρκίνου και το μικροπεριβάλλον των όγκων δημιουργεί ανοσοκαταστολή, που δεν επιτρέπει την επιτυχημένη ανοσοθεραπεία (Springfeld et al. 2019).

Συμπερασματικά, η χειρουργική εκτομή, όταν είναι δυνατή, ο συνδυασμός της με προεγχειρητικές και ενισχυτικές θεραπείες, και η χρήση γεμισιταβίνης, FOLFIRINOX και Nab-paclitaxel αποτελούν τις βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, μιας και βελτιώνουν την ποιότητα ζωής και αυξάνουν την επιβίωση των ασθενών. Πλέον οι χειρουργικές επεμβάσεις που αφορούν στο πάγκρεας αποτελούν μία ασφαλή διαδικασία και εμφανίζουν επιτυχία σε ποσοστό 97%, με πιθανότητα θανάτου κατά τη διάρκεια της επέμβασης 3%. Παρόλα αυτά, η μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών είναι σπάνια. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος από το 1960 έως και σήμερα αφορά κάτω από το 10% των ασθενών (Ansari et al., 2014).

1.3 ΣΙΓΜΑ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι σίγμα υποδοχείς προτάθηκαν για πρώτη φορά το 1976 από τον Martin και τους συνεργάτες του στηριζόμενοι στη δράση του SKF-10,047 (N- αλλυλονομεταζοκίνη). Το όνομά τους προέρχεται στην πραγματικότητα από το πρώτο γράμμα "S" της βενζομορφάνης SKF-10,047 που πιστεύεται ότι είναι ο πρώτος προσδέτης των υποδοχέων αυτών. Ενώ αρχικά θεωρούνταν υποδοχέας οπιοειδών και στη συνέχεια θεωρούνταν θέσεις πρόσδεσης φαινοκυκλιδίνης, αργότερα αποδείχτηκε ότι πρόκειται για ειδική κατηγορία υποδοχέων. Οι σίγμα υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων, στις περιοχές αλληλεπίδρασης του δικτύου με τα μιτοχόνδρια και διαθέτουν ένα μοναδικό πρότυπο εκλεκτικότητας σε φάρμακα σε σχέση με άλλους γνωστούς υποδοχείς (Matsumoto et al., 2007).

Με δοκιμασία πρόσδεσης υποδοχέα σε διαφορετικούς ιστούς, ο σίγμα υποδοχέας αποδείχθηκε ότι αποτελείται από δύο υποτύπους, τους υποδοχείς σίγμα-1 και σίγμα-2. Οι δύο υπότυποι διακρίνονται μεταξύ τους με βάση τα μοριακά τους βάρη (ο σίγμα-1 έχει μοριακό βάρος 25 kD, ενώ οι υποδοχείς σίγμα-2 έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 18 έως 21,5 kD), την κατανομή ιστού, την αλληλουχία και τα μοτίβα εκλεκτικότητας φαρμάκου (Maurice & Su 2009).

Ο σίγμα υποδοχέας, σύμφωνα με προκλινικές μελέτες, εμπλέκεται σε πολλές ασθένειες, όπως την κατάθλιψη, τη νόσο Alzheimer, τον εθισμό στη μεθαμφεταμίνη ή την κοκαΐνη, την αμνησία, το εγκεφαλικό επεισόδιο και τον καρκίνο. Αντιπροσωπεύουν καρπούς για θεραπευτικές εξελίξεις στην καταπολέμηση αυτών των ανθρώπινων ασθενειών. Η ανακάλυψη της παρουσίας των υποδοχέων σίγμα-1 και σίγμα-2 σε πολλές κυτταρικές σειρές, ανθρώπων και τρωκτικών, άνοιξε το νέο πεδίο έρευνας του καρκίνου (Maurice & Su 2009).

Οι υποδοχείς σίγμα βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (σχηματισμός ιππόκαμπου στον εγκέφαλο), όπου υποστηρίζουν μια ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών. Η καρδιά περιέχει επίσης σημαντικά επίπεδα σίγμα υποδοχέων (πάνω από 80% σίγμα-1 υποδοχείς) (Matsumoto et al., 2007). Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την ύπαρξη των υποδοχέων σίγμα στους πνεύμονες, στο ήπαρ, τους νεφρούς, τον σπλήνα, το πάγκρεας, το πεπτικό σύστημα και στο ουροποιητικό σύστημα (Maurice & Su 2009).

Ο υποδοχέας σίγμα-1 κλωνοποιήθηκε το 1996 και είναι μια μοναδική φαρμακολογικά ρυθμιζόμενη μεμβρανική πρωτεΐνη συνοδός που αλλοστερικά ρυθμίζει τη δραστηριότητα

των πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται (Maurice & Su, 2009). Η γονιδιακή αποσιώπηση του υποδοχέα σίγμα-1 αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας σίγμα-2 προέρχεται από διαφορετικό γονίδιο από αυτόν του σίγμα-1. Ωστόσο, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον σίγμα-2 υποδοχέα παρέμενε άγνωστο μέχρι πρόσφατα, αποτελώντας σημαντικό εμπόδιο στη μελέτη της βιολογίας του και στην κατανόηση της λειτουργίας του, η οποία παραμένει περιορισμένη σε σχέση με εκείνη άλλων καλά χαρακτηρισμένων υποδοχέων (Alon et al., 2017).

Ο υποδοχέας σίγμα-2 αναγνωρίστηκε αρχικά το 1990 από μελέτες δέσμευσης ραδιοσυνδέτη ως θέση δέσμευσης με υψηλή συγγένεια για τη δι-ο-τολυλγουανιδίνη (DTG) και την αλοπεριδόλη, αλλά με χαμηλή συγγένεια για τις βενζομορφάνες. Αντίθετα, ο υποδοχέας σίγμα-1 εμφανίζει σύνδεση υψηλής συγγένειας για όλους αυτούς τους προσδέτες. Για πολλά χρόνια, οι υποδοχείς σίγμα περιγράφονταν φαρμακολογικά μέσω της πρόσδεσης των 3H-πενταζοκίνης και [3H]DTG. Η πενταζοκίνη έχει υψηλή συγγένεια για τον σίγμα-1 υποδοχέα και χαμηλή συγγένεια για τον σίγμα-2 υποδοχέα, ενώ το [3H]DTG είναι ισοδύναμο τόσο στους σίγμα-1 όσο και στους σίγμα-2 υποδοχείς (Georgiadis et al.).

Οι πρώτες μελέτες για την ταυτοποίηση των υποδοχέων από τους Xu και άλλους έδειξαν ότι η θέση πρόσδεσης του σίγμα-2 υποδοχέα βρίσκεται στο εσωτερικό της θέσης πρόσδεσης του υποδοχέα προγεστερόνης 1 (PGRMC1) (J. Xu et al. 2011). Η έρευνα αυτή βασίστηκε σε δύο βασικά στοιχεία: πρώτον, ένας σημασμένος σίγμα-2 προσδέτης, ο SW120, είχε την ικανότητα να προσδένεται μη αντιστρεπτά με τον υποδοχέα PGRMC1 στο ήπαρ αρουραίων και δεύτερον, ο σίγμα-2 προσδέτης SW120 συνεντοπίζονταν με τον PGRMC1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια σε κύτταρα HeLa. Με πειράματα που χρησιμοποιούσαν ραδιοσημασμένους προσδέτες σε κύτταρα με υπερέκφραση ή αποσιώπηση του γονιδίου *pgrmc1*, ενισχύθηκε η υπόθεση ότι ο PGRMC1 είναι ο υποδοχέας σίγμα-2 (Abatematteo et al. 2021).

Ωστόσο στη συνέχεια, το 2017 ταυτοποιήθηκε ως σίγμα-2 υποδοχέας η διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 (TMEM97, επίσης γνωστή ως MAC30). Ο Alon και οι συνεργάτες του συνέθεσαν έναν σίγμα-2 προσδέτη και το συνέδεσαν ομοιοπολικά με σφαιρίδια αгарόζης για να παρασκευάσουν μια ρητίνη χρωματογραφίας συγγένειας, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη σύλληψη σίγμα-2 υποδοχέων που εξήχθησαν από το ήπαρ μοσχαριού. Οι υποψήφιες πρωτεΐνες απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας. Η έκφραση της TMEM97 σε κύτταρα που στερούνται σίγμα-2 υποδοχέων αύξησε τη δέσμευση του [3H]DTG, ενώ η εξουδετέρωση της TMEM97 με siRNA μείωσε τη δέσμευση, επιβεβαιώνοντας ότι η TMEM97 είναι ο σίγμα-2 υποδοχέας. Η κλωνοποίηση του σίγμα-2 υποδοχέα επιτρέπει τη χρήση σύγχρονων βιολογικών μεθόδων για τη μελέτη των λειτουργιών του ως θεραπευτικού και διαγνωστικού στόχου (Alon et al., 2017).

1.3.1 PGRMC1 (Progesterone receptor membrane component 1)

Το PGRMC1 είναι μια πρωτεΐνη βάρους 25 kDa, που αποτελείται από 195 αμινοξέα και διασχίζει τη μεμβράνη μια φορά. Το γονίδιο *pgrmc1* εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1, συγκεκριμένα στην περιοχή 1p36.21. Είναι ευρέως κατανομημένη τόσο σε γαμέτες όσο και στα υπόλοιπα κύτταρα, με ενδοκυτταρική τοποθέτηση στην πλασματική

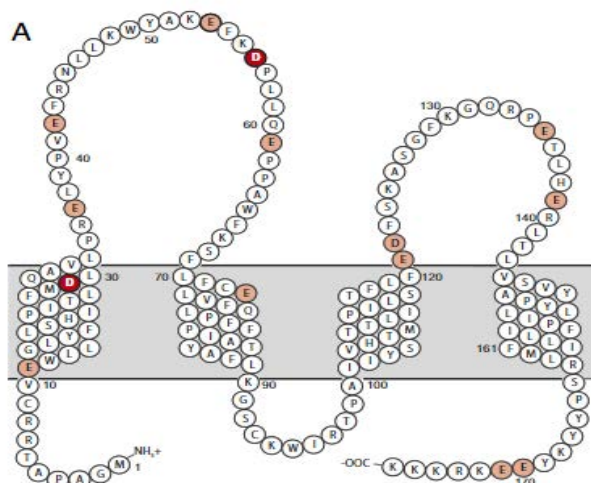
μεμβράνη, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό χώρο (James K., 2022). Το PGRMC1 έχει ένα σύντομο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1–20), μια διαμεμβρανική περιοχή (αμινοξέα 21–69), και ένα C-τελικό άκρο που έχει μια περιοχή σύνδεσης αίμης (αμινοξέα 70–130) και αρκετές πιθανές θέσεις σύνδεσης κινάσης (Peluso et al., 2008). Μεταγενέστερες μελέτες αμφισβήτησαν την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων των παραπάνω πειραμάτων και οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση του [3H]-DTG στους σίγμα-2 υποδοχείς PGRMC1 δεν επηρεάζεται, δηλώνοντας ότι ο υποδοχέας της προγεστερόνης δεν ανήκει στους σίγμα-2 υποδοχείς (Chu et al. 2015).

Ο PGRMC1 έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός ρυθμιστής της σύνθεσης και της μεταφοράς της χοληστερόλης. Η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και της στερολικής σύνθεσης, γεγονός που έχει επιπτώσεις στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης και στη σύνθεση ορμονών. καθιστώντας τον κρίσιμο για την καρκινογένεση και την ανθεκτικότητα σε θεραπείες (Rao et al., 2008). Το PGRMC1 ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων προγεστερόνης μεμβράνης (PGRMC) που αναγνωρίστηκε. Ανιχνεύθηκε στη μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύει την προγεστερόνη P4. Το PGRMC1 συνδέεται με την προγεστερόνη P4 με υψηλή συγγένεια είναι απαραίτητο για τις αντιαποπτωτικές και αντιμιτωτικές δράσεις της P4 σε διάφορες σειρές καρκινικών κυττάρων (Meyer et al., 1996).

Η πρόσφατη ταυτοποίηση του TMEM97 ως γονιδίου του σίγμα-2 υποδοχέα τεκμηρίωσε αυτές τις αναφορές. Ωστόσο, οι Riad και οι συνεργάτες του ανέφεραν πρόσφατα ότι ο TMEM97 συνδέεται με την πρωτεΐνη PGRMC1 και σχηματίζει σύμπλοκο και τον υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDLR). Αυτό το τριμερές σύμπλοκο παίζει ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας, την ομοιοστάση της χοληστερόλης και τη διαχείριση τοξικών πρωτεϊνών όπως το β-αμυλοειδές και η α-συνουκλεΐνη, καταδεικνύοντας ότι η PGRMC1 συνδέεται φυσικά με το TMEM97 και επιβεβαιώνοντας ότι ο σίγμα-2 υποδοχέας αντιπροσωπεύει μια θέση πρόσδεσης στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο της PGRMC1 (Riad et al., 2018| Lizama et al., 2023).

1.3.2 TMEM97 (Transmembrane protein 97)

Με σκοπό την ταυτοποίηση των θέσεων του σίγμα-2 υποδοχέα που συνδέονται με τους προσδέτες, ο Alon και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν πειράματα στα οποία προκάλεσαν μεταλλάξεις σε όλα τα κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος (Glu) και ασπαραγινικού οξέος (Asp). Υπέθεσαν ότι κάποιο από αυτά τα κατάλοιπα συνδέεται με τη βασική αμίνη που υπάρχει σε όλους τους σίγμα-2 προσδέτες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μετάλλαξη δύο συντηρημένων καταλοίπων ασπαραγινικού οξέος, D29N και D56N, κατήργησε την πρόσδεση του 3H DTG. Επιπλέον, μέσω άλλων πειραμάτων, πρότειναν μια υποθετική δομή του σίγμα-2 υποδοχέα, σύμφωνα με την οποία ο TMEM97 αποτελείται από τέσσερις μεμβρανικές περιοχές και τρεις μικρές περιοχές β-κλώνων, με τα δύο κατάλοιπα που συνιστούν τις θέσεις πρόσδεσης των σίγμα-2 προσδετών να βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο (Εικόνα 1.8) (Alon et al. 2017).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση του TMEM97 στη μεμβράνη με τις 4 μεμβρανικές περιοχές. Τα όξινα κατάλοιπα που επιλέχθηκαν για μεταλλαξογένεση είναι χρωματισμένα με απαλό κόκκινο, με τα Asp29 και Asp56 να τονίζονται με σκούρο κόκκινο (Alon et al. 2017).

Η TMEM97 είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα λυσοσώματα. Η ανάλυση αλληλουχίας TMEM97 δείχνει ότι το C-άκρο περιέχει την προβλεπόμενη αλληλουχία διατήρησης του ενδοπλασματικού δικτύου "KRKKK". Το γονίδιο TMEM97, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q11.2 στον άνθρωπο, κωδικοποιεί αυτή τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη με πολλαπλές διαμεμβρανικές δομές, η οποία αποτελείται από 176 αμινοξέα. Έχει επιβεβαιωθεί ότι το TMEM97 δεσμεύει προσδέτες του υποδοχέα σίγμα-2, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο του ως υποδοχέα σίγμα-2 (Alon et al., 2017). Η πρωτεΐνη TMEM97 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, ιδιαίτερα στα καρκινικά κύτταρα. Περιέχει τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες που εκτείνονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών. Η έκφραση του TMEM97 ρυθμίζεται από σήματα που επηρεάζουν τη χοληστερόλη, όπως η εξάντληση στερολών και τα επίπεδα της SREBP. Η TMEM97 εμπλέκεται σε διαδικασίες μεταφοράς χοληστερόλης, όπως η πρόσληψη λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) μέσω της δημιουργίας συμπλόκων με την PGRMC1 και τον υποδοχέα LDL (LDLR), καθώς και η μεταφορά χοληστερόλης από το λυσοσώμα, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη NPC1. Η κατανόηση των μοριακών λειτουργιών του TMEM97 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον μεταβολισμό της χοληστερόλης είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη στρατηγικών διάγνωσης και θεραπείας του καρκίνου και των διαταραχών της χοληστερόλης (Zeng et al., 2007).

Η έκφραση του TMEM97 σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς έχει μελετηθεί με διάφορες μεθόδους, όπως η δοκιμασία πρόσδεσης σ2R και η ανοσοϊστοχημεία για τη μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων, καθώς και μεθόδους όπως northern-blot, ποσοτική RT-PCR, μικροσυστοιχία DNA ή RNAseq για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA. Μελέτες έχουν δείξει ότι το TMEM97 εκφράζεται σε μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών και καρκινικών ανθρώπινων ιστών. Αυξημένα επίπεδα TMEM97 έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του οισοφάγου, του πνεύμονα, των ωοθηκών και του προστάτη, ενώ μειωμένα επίπεδα έχουν βρεθεί στα μηνιγγιώματα, τον καρκίνο του παγκρέατος και του νεφρού (Kayed et al.,

2004| Murphy et al., 1993). Ειδικά στον καρκίνο του παγκρέατος, το TMEM97 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Η υπερέκφρασή του σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος συγκριτικά με φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς σχετίζεται με την κακοήθεια και την επιθετικότητα του καρκίνου (Alon, A., et al. 2017). Επιπλέον, το TMEM97 εμπλέκεται στο γλοιοβλάστωμα, έναν εξαιρετικά επιθετικό όγκο εγκεφάλου, όπου μπορεί να ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Wheeler et al., 2000).

Η πρωτεΐνη TMEM97, μέσω της λειτουργίας της ως υποδοχέας sigma-2, αλληλεπιδρά με προσδέτες που επηρεάζουν τον κυτταρικό θάνατο και τις οδούς επιβίωσης, καθιστώντας την έναν πιθανό στόχο για την πρόκληση απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, ρυθμίζει τη χοληστερόλη, η οποία είναι απαραίτητη για τον γρήγορο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων που απαιτούν νέα σύνθεση μεμβράνης (Shukla et al., 2018). Το TMEM97 μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για την έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση του καρκίνου, καθώς και ως στόχος για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (Tappia et al., 2023). Οι ενώσεις που μπορούν να δεσμεύουν και να ρυθμίζουν τη δραστηριότητά του μπορεί να παρέχουν νέες θεραπευτικές επιλογές, ιδιαίτερα για τον καρκίνο του παγκρέατος (Ostenfeld et al., 2008). Η έρευνα συνεχίζει να διερευνά τους μηχανισμούς του TMEM97 και τις δυνατότητές του για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών για τον καρκίνο, καθιστώντας το έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών και διαφόρων τύπων καρκίνου (Colabufo et al., 2006).

1.3.3 Αγωνιστές/ ανταγωνιστές σίγμα-2 υποδοχέων

Οι σίγμα-2 υποδοχείς έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του παγκρέατος, τον καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του μαστού, το μελάνωμα, τον καρκίνο του ουροποιητικού και τον καρκίνο των ωοθηκών (Skuzza 2003). Τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν τους υποδοχείς σίγμα-2, επιτρέποντας πιθανές θεραπείες. Οι προσδέτες του sigma-2 υποδοχέα συνδέονται με νανοσωματίδια και πεπτίδια για θεραπεία των καρκινικών κυττάρων χωρίς την στόχευση άλλων ιστών. Η επιτυχία με αυτές τις μεθόδους περιορίστηκε σε μελέτες in vitro (Ahmed et al., 2012). Επιπρόσθετα, η χρήση των υποδοχέων sigma-2 για την στόχευση των καρκινικών κυττάρων επιτρέπει την συνεργική θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένοι αναστολείς των υποδοχέων sigma-2 παρεμποδίζουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία και άλλοι αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων(π.χ. της δοξορουμπικίνης, της αντνικοσινικίνης) (Huang et al., 2014).

Αγωνιστής είναι μια χημική ουσία που δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα και τον ενεργοποιεί για να παράγει μια βιολογική απόκριση (DG Lambert, 2004). Ενώ ένας αγωνιστής προκαλεί μια δράση, ένας ανταγωνιστής μπλοκάρει ή επιβραδύνει μια βιολογική απόκριση με την δέσμευσή του σε έναν υποδοχέα. Στη φαρμακολογία, οι ανταγωνιστές έχουν συγγένεια αλλά όχι αποτελεσματικότητα για τους συγγενείς υποδοχείς τους και η δέσμευσή τους θα διακόψει την αλληλεπίδραση και θα αναστείλει τη λειτουργία ενός αγωνιστή (Wyllie & Chen 2009).

Οι ανταγωνιστές διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες. Οι συναγωνιστικοί ανταγωνιστές-αντιστρεπτοί δεσμεύονται αντιστρεπτά σε υποδοχείς στην ίδια θέση πρόσδεσης του ενδογενούς προσδέτη ή αγωνιστή, αλλά χωρίς ενεργοποίηση του υποδοχέα. Αγωνιστές και ανταγωνιστές "ανταγωνίζονται" για την ίδια θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα. Μόλις συνδεθεί ένας ανταγωνιστής θα εμποδίσει τη σύνδεση του αγωνιστή. Το επίπεδο δραστηρότητας του υποδοχέα θα προσδιορίζεται από τη σχετική συγγένεια κάθε μορίου για τη θέση και τις συγκεντρώσεις τους.

Οι συναγωνιστικοί ανταγωνιστές-μη αντιστρεπτοί, όπου ο ανταγωνιστής δεσμεύεται στην ενεργό θέση του υποδοχέα μη αντιστρεπτά. Σε αντίθεση με τους αντιστρεπτούς ανταγωνιστές, που εξαρτώνται από την ποσότητα του αγωνιστή για την επίτευξη μέγιστης απόκρισης, χωρίς να επηρεάζεται το μέγεθος αυτής, οι μη αντιστρεπτοί συναγωνιστικοί ανταγωνιστές μειώνουν το μέγεθος της μέγιστης απόκρισης ανεξάρτητα από την ποσότητα του αγωνιστή.

Οι μη συναγωνιστικοί ανταγωνιστές συνδέονται σε μία αλλοστερική θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα και αναστέλλεται η απόκριση. Απαιτείται η ενεργοποίηση του υποδοχέα από έναν αγωνιστή πριν την πρόσδεσή τους σε αυτόν (Wyllie & Chen 2009).

Ο βαθμός συγγένειας ενός ανταγωνιστή για τη θέση δέσμευσης (K_i), δηλαδή η ικανότητά του να δεσμεύεται με έναν υποδοχέα, θα καθορίσει τη διάρκεια της αναστολής της δραστηρότητας αγωνιστή. Ανάλογα με τον βαθμό συγγένειας που εμφανίζουν οι προσδέτες με τους υποδοχείς διαχωρίζονται σε εκλεκτικούς για τον σίγμα-1 ή τον σίγμα-2 και μη εκλεκτικούς, όταν έχουν ίδιο βαθμό συγγένειας και με τους δύο υποδοχείς.

Ενώσεις με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους σίγμα υποδοχείς είναι ο BD1008 (3,4-διχλωρο υποκατεστημένο στον αρωματικό δακτύλιο) που ανήκει στις φαινυλαιθυλενοδιαμίνες, οι φαινοξυαλκυλαμίνες και η DTG (1,3-διτολγλουανιδίνη) (Golan, 2012|Lipton, 2004).

Αμφότεροι οι υποδοχείς σίγμα-1 και σίγμα-2 εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και στον κυτταρικό θάνατο. Οι αγωνιστές του υποδοχέα σίγμα-1 προάγουν την κυτταρική επιβίωση, ενώ οι ανταγωνιστές των υποδοχέων σίγμα-1 οδηγούν στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Οι προσδέτες του υποδοχέα σίγμα-2 είναι και μπορούν να δράσουν είτε ως αγωνιστές είτε ως ανταγωνιστές. Δεν είναι πλήρως κατανοητό πώς συμβαίνει η δέσμευση στον υποδοχέα σίγμα-2 (Skuz, 2003). Κάποια παραδείγματα από προσδέτες των sigma-2 υποδοχέων είναι ο PB-28 (1-κυκλοεξυλ-4- [3- (5-μεθοξυ-1,2,3,4-τετραϋδρονφθαλιν-1-υλ) προπυλ] πιπεραζίνη), ο F281, οι CB-64D και CB-184 (φαινυλομορφάνεςβενζυλιδίνης), η Σιραμεσίνη (ανάλογο ινδόλης), που είναι αγωνιστές και η Ιβογκαΐνη (Ibogaine- ανάλογο ινδόλης), οι Αρυλοπροπυλαμίνες και οι BIMU-1, SW107, SW116, SW120 (ανάλογα του τροπανίου). Οι αγωνιστές του σίγμα-2 υποδοχέα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και προάγουν μια αποπτωτική οδό, μη εξαρτώμενη της κασπάσης-3, στην οποία συμμετέχει το κεραμίδιο (λιπίδιο που ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και θάνατο), ενώ οι ανταγωνιστές προάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Matsumoto et al., 2007).

1.3.4 Σιραμεσίνη

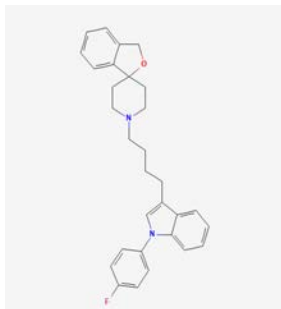
Η σιραμεσίνη (ή Lu 28-179) (Εικόνα 1.9) είναι ένας αγωνιστής υποδοχέα σίγμα, με εκλεκτικότητα για τον υπότυπο σίγμα-2. Σε μελέτες σε ζώα, η σιραμεσίνη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές επιδράσεις (Sánchez & Papp 2000). Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δραστηριότητας των σίγμα-2 υποδοχέων στην κοκαΐνη και έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί θάνατο των καρκινικών κυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, μέσω ενός ανεξάρτητου από κασπάση μηχανισμού (Skuzza, 2006).

Το 2005, ο Ostensfeld και η ομάδα του ανακάλυψαν ότι η σιραμεσίνη προκαλεί αποπτωτικό θάνατο ανεξάρτητο της κασπάσης, ξεκινώντας με τη συμπύκνωση της χρωματίνης και ακολουθούμενη από τη διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης, σε εγκαθιδρυμένες καρκινικές σειρές του μαστού (MCF7) και την καρκινική σειρά HeLa. Παρατήρησαν ότι η σιραμεσίνη προωθεί την απελευθέρωση καθεψινών στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, προκάλεσε αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των λυσοσωμάτων, οδηγώντας τελικά στη λύση των κυττάρων, όπου συμμετέχουν και οι ελεύθερες ρίζες ROS, που παράγονται σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα. (Ostensfeld, Fehrenbacher, Høyer-Hansen, et al. 2005)

Το 2013, ο Cesen και η ομάδα του έδειξαν ότι η σιραμεσίνη προκαλεί αποσταθεροποίηση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και, συνεπώς, λύση των μιτοχονδρίων, οδηγώντας σε θάνατο καρκινικών κυττάρων σε πληθώρα καρκινικών σειρών όπως HeLa, MCF-7, U-87MG, HaCat. Πιο συγκεκριμένα, η σιραμεσίνη προκαλεί ταχεία απώλεια του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων. Δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ROS μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ATP, η αποσταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί στην απελευθέρωση των ROS και του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και τελικά κυτταρικό θάνατο. Συμπερασματικά, θεωρούν ότι η σιραμεσίνη δεν προκαλεί άμεσα την παραγωγή των ROS, αλλά αυτή προκύπτει λόγω της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης. (Hafner et al. 2013)

Τα αποτελέσματα αυτά αντιτίθενται στα ευρήματα του Jaattela και της ομάδας του, τα οποία υποστηρίζουν ότι στις καρκινικές σειρές MCF-7 και U2OS (ανθρώπινο οστεοσάρκωμα), η σιραμεσίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω της αποσταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης, που προκαλείται από την αύξηση του λυσοσωμικού pH λόγω της συσσώρευσης της σιραμεσίνης στα λυσοσώματα. (Ostensfeld, Fehrenbacher, Høyer-Hansen, et al. 2005)

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο σίγμα-2 αγωνιστής σιραμεσίνη προκαλεί θάνατο σε ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού μέσω φερόπτωσης, εξαιτίας της διαταραχής στη μεταφορά σιδήρου, που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS (Ma et al. 2016).



Εικόνα 1.9: Οι χημικές δομές του αναστολέα Σιραμεσίνη η Siramesine η Lu 28–179 (10-[4-[1-(4-fluorophenyl)-1H-indol-3-yl]-1-butyl]-spiro[isobenzofuran-1(3H),40-piperidine]) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Ostenfeld, Fehrenbacher, Hoyer-Hansen, et al. 2005).

1.3.5 Αποσιώπηση των υποδοχέων PGRMC1 και TMEM97 με την τεχνολογία του siRNA

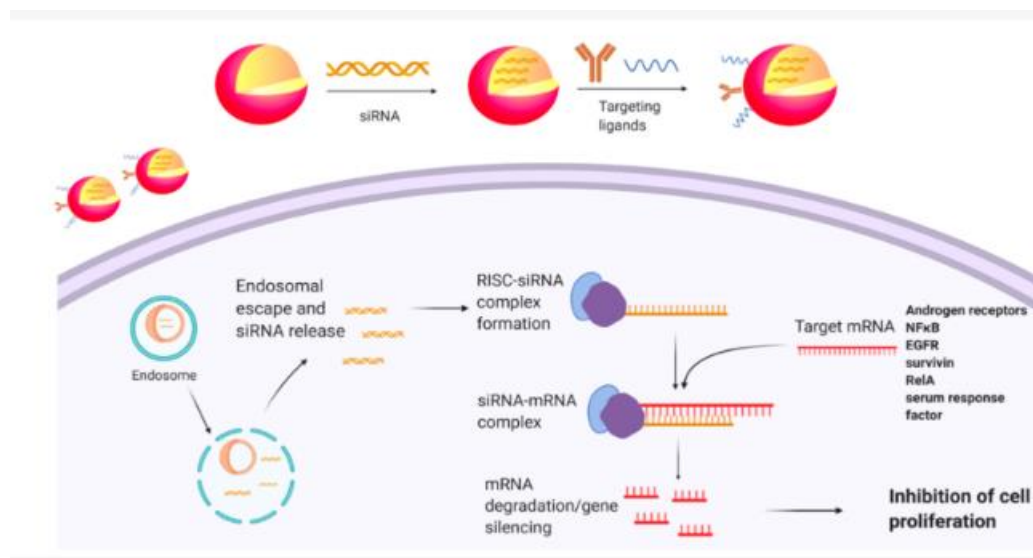
Ένας τρόπος να επιτευχθεί η γονιδιακή αποσιώπηση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο είναι μέσω μιας ενδογενούς κυτταρικής διεργασίας που ονομάζεται παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi) (W. Xu et al., 2019). Το πρώτο βήμα στη διαδικασία του RNAi, περιλαμβάνει την επεξεργασία και διάσπαση ενός μακρύτερου δίκλωνου RNA σε μικρότερα RNA (21-25 νουκλεοτιδικά ζεύγη), γνωστά ως μικρά παρεμβατικά RNA (small interfering RNA, siRNA) τα οποία φέρουν μια προεξοχή 2 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε κλώνου (Dana et al., 2017). Το ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία ονομάζεται Dicer (Bernstein et al., 2001). Αφού σχηματιστούν τα siRNA, δεσμεύονται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, που ονομάζεται RISC (RNA-induced silencing complex) (Song et al., 2004). Το RISC απορρίπτει τη μια έλικα του δίκλωνου siRNA μέσω της δράσης της καταλυτικής πρωτεΐνης RISC, μέλους της οικογένειας Argonaut 2 (AGO2), και στη συνέχεια το siRNA εντός του συμπλέγματος, καθοδηγεί το RISC στο mRNA στόχο, το οποίο είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία siRNA που μεταφέρει το σύμπλοκο. Αφού, εντοπιστεί το mRNA-στόχος προσδένεται στο RISC και καταστρέφεται, καθώς διασπάται σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δεν μπορούν πλέον να μεταφραστούν σε λειτουργικό πολυπεπτίδιο. 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 για πρώτη φορά το 1998 από τους ερευνητές Fire και Melo, στο νηματοιειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, οι οποίοι αργότερα τιμήθηκαν με βραβείο Nobel (Fire et al., 1998). Η ανακάλυψη αυτής της ενδογενούς διεργασίας άνοιξε το δρόμο για τη μετέπειτα ανάπτυξη και χρήση εξωγενών συνθετικών siRNA συμπληρωματικών ως προς την αλληλουχία ενός mRNA στόχου, με σκοπό τη μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων ενδιαφέροντος και συνεπώς την αναστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν. 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, στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που μειώνει τον κίνδυνο πιθανών αλλοιώσεων του γονιδιώματος (de Fougereolles et al., 2007).. Επιπλέον, με την επιλογή κατάλληλα σχεδιασμένων siRNA, μπορεί να επιτευχθεί αποσιώπηση

οποιασδήποτε πρωτεΐνης στόχου που μπορεί να εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις,, διευρύνοντας έτσι το φάσμα των θεραπευτικών επιλογών (de Fougérolles et al., 2007).

Συνεπώς η τεχνολογία του siRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την αποσιώπηση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη καρκινογένεση (Εικόνα 1.10) (Bahreyni & Luo, 2020). Εν κατακλείδι, αξιοποιώντας τους παραπάνω μηχανισμούς, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, έγινε χρήση ειδικά σχεδιασμένων siRNAs με σκοπό τη αποσιώπηση των mRNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες - υποδοχείς ενδιαφέροντος, τους TMEM97 και PGRMC1. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι να διερευνηθεί τόσο, εάν αυτή η μετα-μεταγραφική τροποποίηση μπορεί να επιφέρει μεταβολές στην πολλαπλασιαστική ικανότητα του ex vivo παγκρεατικού καρκινικού κυτταρικού πληθυσμού Attached, όσο και η ειδικότητας της Σιραμεσίνης ως προς τη δράση της ως αγωνιστής των σίγμα-2 υποδοχέων.



Εικόνα 1.10: Απεικόνιση του μηχανισμού της παρεμβολής του RNA (Bahreyni & Luo, 2020)

ΣΚΟΠΟΣ

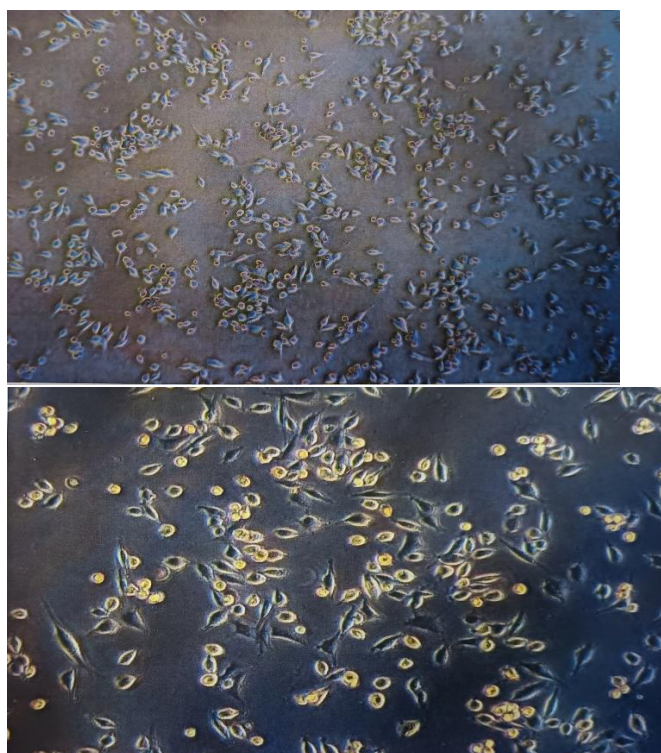
Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης TMEM97 στην καρκινογένεση του καρκίνου του παγκρέατος, καθώς και του υποδοχέα PGRMC1, που αναφέρεται ως συνυποδοχέας της TMEM97. Επίσης, στόχο της μελέτης αποτελεί ο ρόλος των σίγμα- 2 υποδοχέων ως σύμπλοκο στην καρκινογένεση του παγκρεατικού καρκίνου. Τέλος, στόχος της εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου των σίγμα-2 υποδοχέων στην δραστικότητα της Σιραμεσίνης που θεωρείται σίγμα-2 προσδέτης-αγωνιστής, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι δρα ανεξάρτητα της ύπαρξης των υποδοχέων (Sereti et al., 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Κυτταρικές σειρές:

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο ex vivo πρωτογενής κυτταρικός πληθυσμός Attached, ο οποίος απομονώθηκε απευθείας από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος, έπειτα από χειρουργική εκτομή και εγκαθιδρύθηκε για πρώτη φορά από το Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Τα συγκεκριμένα κύτταρα βρίσκονται πιο κοντά στην κλινική εικόνα, καθώς προέρχονται ex vivo απευθείας από ασθενή.



Εικόνα 2.1: Καρκινική κυτταρική σειρά Attached

2.1.2 Αναλώσιμα

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των Attached είναι τα εξής

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 (Gibco, κωδικός: 31870-025)
- Εμβρυϊκός βόειος ορός σε περιεκτικότητα 5% (Fetal Bovine Serum- FBS) (Biowest, κωδικός S181B-500)
- 1% L-γλουταμίνη (Gibco , κωδικός: 2165253)

- Ισοτονικό διάλυμα PBS 1x (Gibco, κωδικός: 32546321)
- 1% Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco, κωδικός: 2145465)
- Trypsin 10x (Gibco με κωδικό 25200056)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide 99.8%) (Thermo Fisher Scientific, κωδικός: 0N013586)

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες είναι:

- Φλάσκες T25 και T75 (25cm² και 75 cm² επιφάνεια αντίστοιχα) (Corning, κωδικός: 6547865)
- Πιπέτες των 5 και 10 ml (Corning Costar Incorporated, κωδικός: 4051)
- Πιάτο 6 θέσεων (six wells) (Corning, κωδικός 5647861)
- Φιαλίδια (Falcons) -[Corning, κωδικός: 430921]
- Φιαλίδια των 1,5 ml (Eppendorfs) –(Thermo Scientific, κωδικός: 3456)
- Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials)-(Corning, κωδικός: 430487)
- Πιάτο 96 θέσεων- 96well plate (Corning Costar cell culture, κωδικός:4156756)

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων είναι:

- Χρωστική Trypan Blue 0.4% (w/v) (Gibco, κωδικός: 6578658)
- TCA (Trichloroacetic acid,) AppliChem, κωδικός: A1431)
- SRB- Sulforhodamine (SIGMA, κωδικός: S9012)
- 1% Acetic acid (Fluka, κωδικός: 45731)

Για την πραγματοποίηση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blott χρησιμοποιήθηκαν:

- Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, κωδικός: 262536)
- Tris Buffer 0,5M, pH= 6,8 (PanRean-AppliChem, κωδικός: A1086,1000)
- Tris Buffer 1,5M, pH=8,8 (Pan Rean AppliChem, κωδικός: A1086,1000)
- SDS 10% (Sigma Aldrich , κωδικός :BCBV7969
- SDS 20% (Sodium Dodecyl Sulfate) (PanReac AppliChem, κωδικός: L4509-500G)
- APS 10%(Ammonium Persulfate)(Serva, κωδικός:3375.01)
- TEMED (της εταιρείας Sigma, κωδικός:BCBV7969)
- Γλυκερόλη (PanReac AppliChem, κωδικός: 1Y012739)
- Marker (Lonza, ProSieve™ QuadColor™ Protein-Marker, κωδικός: 00193837)

- B-μερκαπταιθανόλη (Merck, κωδικός: 3627125)
- 30% w/v ακρυλαμίδη της SERVA (κωδικός: 10687.01)
- Μεθανόλη (Sigma Aldrich, κωδικός:7446378)
- Glycine 144g (Sigma Aldrich, κωδικός 525365)
- Ponceau S (Applichem, κωδικόςA1405,0100)
- NaCl 0,9% (ΒΙΟΣΕΡ, κωδικος:5336356)
- Tween20 (Applichem, κωδικός:4974,0100)
- Μεμβράνη PVDF (Millipore, Bedford, MA)

Αντισώματα:

- Anti-PGRMC-1, Rabbit monoclonal antibody, (Cell Signaling, κωδικός: 13856)
- Anti-TMEM97, Rabbit polyclonal antibody, (ATLAS (HPA076689)
- anti-actin β , monoclonal mouse, (Cell Signaling, κωδικός: 3700)
- Anti-rabbit IgG (Cell Signaling, κωδικός:7074)
- Anti-mouse IgG (SIGMA, κωδικός: 9044)

2.1.3 Καλλιέργεια κυττάρων (Συνθήκες Καλλιέργειας- Ανανέωση- Θρυψινοποίηση)

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία (37 °C), συγκέντρωση CO₂ (5%) και υγρασία (95%). Οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες (Hood).

Το θρεπτικό υλικό που προστίθεται στην φλάσκα και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι το RPMI, στο οποίο προστίθεται 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, 1% L-Γλουταμίνη και 5% FBS. Το FBS είναι το κλάσμα αίματος που έχει ληφθεί από έμβρυο βοοειδών, το οποίο απομένει μετά τη φυσική πήξη του αίματος, ακολουθούμενο από φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ περιέχει αυξητικούς παράγοντες βοηθώντας στην ανάπτυξη των κυττάρων. Η Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη προστίθενται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ώστε να αποφευχθούν μολύνσεις των κυτταροκαλλιεργειών από μύκητες ή βακτήρια, ενώ η L-γλουταμίνη είναι ένα αμινοξύ που είναι απαραίτητο ως εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα, εξασφαλίζοντας ένα φυσιολογικό περιβάλλον, ώστε να διατηρήσουν τις βασικές μεταβολικές τους λειτουργίες. 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.

Όταν η πυκνότητα της κυτταροκαλλιέργειας αγγίζει το 80% πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (passaging). Αρχικά αφαιρείται όλο το θρεπτικό υλικό με την βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας. Ακολουθεί πλύση της φλάσκας με την προσθήκη 2-3 ml ισοτονικού διαλύματος PBS 1x. Στη συνέχεια, αφού αφαιρεθεί η ποσότητα του PBS 1x προστίθενται 1-2 ml θρυψίνης 1x για την αποκόλληση των κυττάρων. Η θρυψίνη που χρησιμοποιείται προέρχεται από την θρυψίνη 10x ύστερα από αραίωση με PBS 1x για να προκύψει θρυψίνη 1x. Η θρυψίνη συγκεκριμένα, είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, που οδηγεί στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε κύτταρα που είναι προσκολλημένα στη φλάσκα ώστε να αποκολληθούν από αυτή. Έπειτα, από την πλύση, ακολουθεί επώση για 2 λεπτά στον κλίβανο (37° C, 5% CO₂). Στη συνέχεια η φλάσκα ελέγχεται σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axionvert 40 CFL της εταιρίας Zeiss) για την αποκόλληση των κυττάρων η οποία υποβοηθάτε με ελαφρύ χτύπημα αν χρειαστεί. Εφόσον τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί πλήρως, πραγματοποιείται απενεργοποίηση της θρυψίνης με την προσθήκη θρεπτικού υλικού RPMI στην φλάσκα, το οποίο περιέχει FBS που απενεργοποιεί την δράση της θρυψίνης. Το εναιώρημα αναδεύεται συνεχώς, καλύπτοντας όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Τέλος με βάση το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, προστίθεται η ανάλογη ποσότητα του εναιωρήματος που συλλέχθηκε από την ανάδευση 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. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται μία με δύο φορές την εβδομάδα, ανάλογα με την πληρότητα της φλάσκας και το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

2.1.4 Κατάψυξη κυττάρων

Για μελλοντική χρήση των κυττάρων είναι αναγκαία η αποθήκευσή τους, ώστε να εξασφαλιστεί η διατήρηση των κυττάρων και να αποφευχθεί η κυτταρική γήρανση. Για την κατάψυξη των κυττάρων χρησιμοποιείται το freezing medium, που αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%). Το DMSO είναι ένας κρυο-προστατευτικός παράγοντας, ο οποίος βοηθά στην ψύξη των κυττάρων με βραδύ ρυθμό ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία κρυστάλλων πάγου στα κύτταρα, κάτι που προκαλεί τον θάνατό τους.

Η διαδικασία της κατάψυξης είναι παρόμοια με αυτή της ανακαλλιέργειας που αναφέρθηκε παραπάνω. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα και προστίθεται PBS 1x, ενώ αφού αφαιρεθεί προστίθεται θρυψίνη 1x. Μόλις τα κύτταρα αποκολληθούν πλήρως προστίθεται RPMI για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Ακολουθεί μεταφορά του υλικού από την φλάσκα σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκέντρηση αυτού για 10 λεπτά στις 1200 στροφές. Με το πέρας της φυγοκέντρησης τα κύτταρα βρίσκονται με την μορφή ιζήματος (pellet) προσκολλημένα στον πάτο του σωλήνα ενώ το θρεπτικό υλικό βρίσκεται στην επιφάνεια ως υπερκείμενο. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο προστίθεται ποσότητα freezing medium ανάλογα με τον αριθμό κυττάρων που περιέχονται στον σωλήνα (1 ml freezing medium ανά 4x 10⁶ κύτταρα). Μετά από ανάδευση των κυττάρων με το freezing medium τοποθετείται 1 ml εναιωρήματος σε κάθε cryovial και τέλος τα cryovials αποθηκεύονται στους -80° C.

2.1.5 Απόψυξη κυττάρων

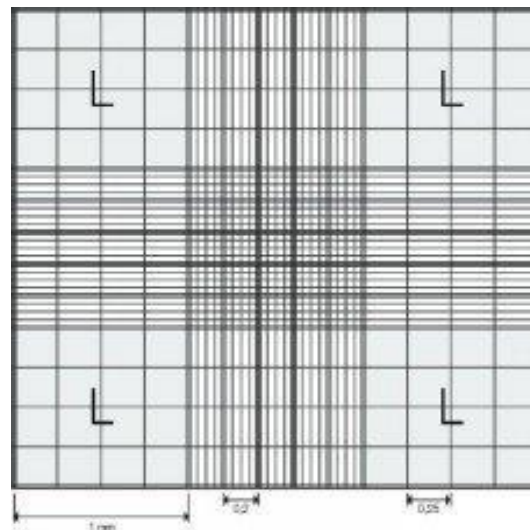
Η απόψυξη των κυττάρων σε αντίθεση με την ψύξη πραγματοποιείται με ταχύ ρυθμό. Τα cryonials, μόλις απομακρυνθούν από την κατάψυξη τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37° C και γίνεται γρήγορη ανάδευση τους, ώστε να ξεπαγώσει το περιεχόμενο. Όταν παρατηρηθεί πλήρης απόψυξη ακολουθεί μεταφορά του υλικού σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, προσθήκη θρεπτικού υλικού και φυγοκέντρωση στις 900 στροφές για 10 λεπτά. Με την λήξη της φυγοκέντρωσης απομακρύνεται το υπερκείμενο που περιέχει DMSO (το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου), ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό και μεταφορά σε φλάσκα. Η φλάσκα αποθηκεύεται στον επωαστικό κλίβανο (37° C) και παρατηρείται μετά από 24 ώρες για επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί πλήρως και είναι ικανά να αναπτυχθούν.

2.1.6 Καταμέτρηση πλήθους κυττάρων / ποσοστού βιωσιμότητας κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων είναι απαραίτητη διαδικασία πριν από την διεξαγωγή του κάθε πειράματος. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται μία αντικειμενοφόρος γυάλινη πλάκα (Neubauer Improved), η οποία περιλαμβάνει μια κεντρική περιοχή που χρησιμεύει ως θάλαμος μέτρησης. Αυτή η περιοχή χωρίζεται επιπλέον σε 2 θαλάμους μέτρησης, με τον κάθε θάλαμο να αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm.

Η διαδικασία της καταμέτρησης είναι ίδια με αυτή της ανακαλλιέργειας μέχρι και το στάδιο της απενεργοποίησης της τρυψίνης με θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί μεταφορά 90 μl υλικού σε φιαλίδιο erpendorf και 10 μl χρωστικής Trypan Blue 0.4% (w/v). Έπειτα τοποθετείται πάνω από την πλάκα μια γυάλινη,καλυπτρίδα και μεταφέρονται 20 μl από το erpendorf με την βοήθεια πιπέτας στο αιμοκυτταρόμετρο εφάπτοντας την πιπέτα στην άκρη της καλυπτρίδας. Ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 5x. Η Neubauer improved περιέχει δύο πανομοιότυπες περιοχές στο άνω και κάτω τμήμα της και η καταμέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιαδήποτε από τις δύο περιοχές. Η κάθε περιοχή διαθέτει μικρότερα τμήματα όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 2.2). Κατά την καταμέτρηση αρχικά μετρώνται τα κύτταρα στα τέσσερα τμήματα (L) και το αποτέλεσμα που προκύπτει διαιρείται με το τέσσερα και πολλαπλασιάζεται με το 1000 (10^4). Ο αριθμός που προκύπτει αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυττάρων ανά ml.

Τα παραπάνω πρωτόκολλα αποτελούν μία τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture



Εικόνα 2.2: Τα τμήματα της Neubauer improved (Phelan, 2007).

2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ TMEM97 & PGRMC1

Με την πειραματική μέθοδο αποσιώπησης siRNA, επιχειρήθηκε η αποσιώπηση του mRNA των TMEM97 και PGRMC1, ώστε να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες της επίδρασης της σίγησης αυτής, στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached.

Η αποσιώπηση του mRNA επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης κατάλληλου siRNA (FlexiTube siRNA-1nm, Hs PGRMC1-7 SI02637859, target seq.: AACAGTACAGTCGCTAGTCAA) και (FlexiTube siRNA-1nm, Hs TMEM97-1 SI03198314, target seq.: CTAGGTTATAAGGAAGTGGTA), καθώς και τη χρήση μιας αλληλουχίας scramble (ή αλλιώς 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 (Εικόνα 2.3). 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 Attached που δε φέρουν καμία τροποποίηση (Untreated). Για το σκοπό της επιμόλυνσης των κυττάρων με τις παραπάνω αλληλουχίες, χρησιμοποιείται η λιποαφεκταμίνη (Lipofectamine 2000 RNAiMAX-Invitrogen by Thermo Fischer Scientific), 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^η

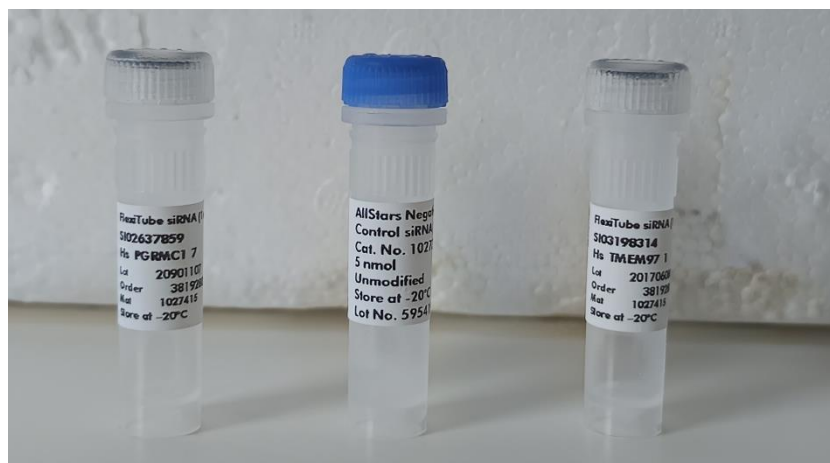
Τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached συλλέγονται με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και στρώνονται σε πιάτα 6 θέσεων (six well plates) με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί πυκνότητα περίπου 60% σε κάθε πηγαδάκι (το ποσοστό διαφέρει ανάλογα με τη κυτταρική σειρά που μελετάται). Στη προκειμένη περίπτωση στρώθηκαν περίπου 200.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 2 ml.

Έπειτα τα πιάτα 6 θέσεων τοποθετούνται στο κλίβανο (θερμοκρασία 37 °C, 5% CO₂ 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^η

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 Scramble siRNA. Έστερα 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 τα μείγματα που περιέχουν το siRNA όσο και αυτό που περιέχει το Scramble siRNA, αποτελούνται από λιποαφεκταμίνη (Lipofectamine 2000). Τα μείγματα περιέχουν επίσης ένα μέσο μειωμένου ορού που χρησιμοποιείται κατά τη επιμόλυνση γενετικών μορίων σε κύτταρα θηλαστικών, γνωστό ως OptiMem (Opti-Mem™ [Gibco™, Catalog number: 31985062] (Rashid & Coombs, 2019).



Εικόνα 2.3: Τα φιαλίδια που περιέχουν siRNA και το negative control siRNA που χρησιμοποιήθηκαν

Το συγκεκριμένο πείραμα απαιτεί τη δημιουργία τριών 6-well plate στα οποία θα προετοιμαστούν οι εξής αναλογίες:

- i. siRNA TMEM97 (eppendorf 1): 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl siRNA

- ii. siRNA PGRMC1 (Eppendorf 2): 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl siRNA
- iii. siRNA double (Eppendorf 3): 500μl τελικός όγκος = 480 μl Opti-Mem + 10 μl siRNA PGRMC1 + 10 μl siRNA TMEM97
- iv. Scramble siRNA (Eppendorf 4): 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl Scramble siRNA
- v. Eppendorf 5: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl Lipofectamine
- vi. Eppendorf 6: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl Lipofectamine
- vii. Eppendorf 7: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl Lipofectamine
- viii. Eppendorf 8: 500μl τελικός όγκος = 490 μl Opti-Mem + 10 μl Lipofectamine

Επόμενη κίνηση είναι η ανάμειξη του περιεχομένου των Eppendorf 1-4 με αυτό των 5-8 με τελικό όγκο στο καθένα 1ml. Τα Eppendorfs 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 πηγαδάκια με τα δείγματα ελέγχου, χωρίς καμία προσθήκη siRNA (Untreated) προστίθενται 250μl Opti-Mem + 1750μl θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών)
- ii. Στα πηγαδάκια με το siRNA προστίθενται 250μl από τα Eppendorf με τα siRNA + 1750μl θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών)
- iii. Στα πηγαδάκια με το negative control siRNA προστίθενται 250μl από το Eppendorf με το negative control + 1750μl θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS και 1% L-glutamine/ χωρίς χρήση αντιβιοτικών)

Τέλος τα 6-well plates τοποθετούνται για επώαση στον κλίβανο (θερμοκρασία 37 °C, 5% CO₂ και 95% επίπεδα υγρασίας) για το χρονικό διάστημα που απαιτεί το πείραμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν 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 και η δημιουργία αποικιών.

2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΜΕΣΩ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT

2.3.1 Δημιουργία λυμάτων

Η δημιουργία λυμάτων είναι μια διαδικασία που ακολουθείται, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα που συλλέχθηκαν με την διαδικασία της ανακαλλιέργειας, με σκοπό να ηλεκτροφορηθούν οι πρωτεΐνες που μελετώνται στη συγκεκριμένη εργασία και να επιβεβαιωθεί η σίγηση των υποδοχέων. Αρχικά, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων ενδιαφέροντος, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Το εναιώρημα συλλέγεται σε φιαλίδιο των 15 ml και ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων του ιζήματος. Στη συνέχεια, το υλικό φυγοκεντρείται για πέντε λεπτά στις 1200 στροφές και αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το ίζημα επαναιωρείται με προσθήκη PBS 1x για έκπλυση των κυττάρων. Στη συνέχεια, το υλικό φυγοκεντρείται για δεύτερη φορά στις ίδιες συνθήκες και ακολουθεί εκ νέου έκπλυση των κυττάρων με PBS 1x, αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο. Τέλος φυγοκεντρείται ξανά το υλικό και απομακρύνεται το υπερκείμενο έτσι ώστε στο σωλήνα να υπάρχουν μόνο τα κύτταρα (ίζημα), τα οποία αποθηκεύονται στην κατάψυξη (-80°C).

Στη συνέχεια ακολουθεί η λύση των κυττάρων για την εξαγωγή των πρωτεϊνών από τα αποθηκευμένα κύτταρα. Απαραίτητη για την λύση των κυττάρων είναι η παρασκευή Lysis Buffer (ειδικό διάλυμα) που χρησιμοποιείται για τη λύση κυττάρων και ιστών. Αυτό προκύπτει από την ανάπτυξη δύο διαλυμάτων, του RIPA 1X [RIPA Buffer, Cell signaling #9806S] που χρησιμοποιείται για τη λύση κυττάρων και ιστών και ενός διαλύματος που προάγει την αναστολή φωσφατασών και πρωτεασών, το PI, (Phosphate/Protease Inhibitors- Cell signaling #5872S).

Τα κύτταρα που είναι διαλυμένα στο Lysis Buffer βρίσκονται μέσα σε πάγο, ώστε να δράσουν τα ένζυμα που εμπεριέχονται στο διάλυμα. Για κάθε ένα εκατομμύριο κύτταρα προστίθενται 60μl Lysis Buffer. Ακολούθως, το υλικό μεταφέρεται σε σωληνάκια erppendorf τοποθετημένα σε πάγο. Το Lysis Buffer δρα για 30 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυττάρων και κάθε πέντε λεπτά τα erppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε συσκευή Vortex Mixer για περίπου 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια τα erppendorfs φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά στις 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erppenderf και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το υπερκείμενο να είναι εντελώς διαυγές, ώστε να περιέχονται μόνο οι πρωτεΐνες των λυμένων κυττάρων.

2.3.2 Ανάλυση Bradford

Η ανάλυση Bradford είναι μία μέθοδος εύρεσης της ποσότητας πρωτεϊνών που περιέχεται σε κάθε δείγμα. Για να επιτευχθεί αυτό απαραίτητη είναι η κατασκευή μιας

πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, όπως η αλβουμίνη ορού βοειδών (BSA) που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία. Για τις ανάγκες της ανάλυσης εφαρμόστηκε η δοκιμασία πρωτεΐνης Pierce BCA Protein Assay Kit της Thermo Scientific (23227), που περιέχει τα εξής συστατικά:

- Working reagent (WR) που αποτελείται από το αντιδραστήριο A (reagent A) και το αντιδραστήριο B (reagentB)

Μόλις παρασκευαστεί το WR (πράσινο διάλυμα) διατηρείται σε σκοτεινό μέρος μέχρι να χρησιμοποιηθεί

Έπειτα, για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις της αλβουμίνης. Για τη διαδικασία, χρησιμοποιούνται πιάτα 96 θέσεων (96-well plates), όπου σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 5μl από κάθε δείγμα 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 στα 540nm (single wave) σε φωτόμετρο της Bio-Tek Instruments (Microplate reader, EL311S). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται σε λογισμικό Microsoft Excel, όπου κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από τις διαδοχικές αραιώσεις της αλβουμίνης. Χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη και την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων.

2.3.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot Analysis

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη αποσιώπηση του του mRNA που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Western Blot στα δείγματα που παρασκευάστηκαν έπειτα τη διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Με την τεχνική της Western Blot παρατηρήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών/υποδοχέων πριν και μετά τη αποσιώπηση των αντίστοιχων mRNA στα κύτταρα Attached.

2.3.3.1 Προετοιμασία συσκευής ηλεκτροφόρησης και πυκτώματος πολυακρυλαμίδης:

Για τις ανάγκες της διαδικασίας απαραίτητη είναι η ηλεκτροφόρηση των υπο μελέτη πρωτεϊνών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης, αποτελείται από μία βάση και δύο τζαμάκια ανάμεσα από τα οποία προστίθεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η πηκτή

πολυακρυλαμίδης είναι μίγμα ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου που πολυμεριζόμενο σχηματίζει ένα δίκτυο με πόρους ορισμένης διαμέτρου. Ο πολυμερισμός επιταχύνεται από την παρουσία TEMED και απαιτεί την παρουσία υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) για την έναρξη του πολυμερισμού. Το TEMED καταλύει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών από το APS, οι οποίες κατευθύνουν τον πολυμερισμό. Η διάμετρος των πόρων καθορίζεται από την αναλογία δις-ακρυλαμίδης και ακρυλαμίδης. Πηκτή με μικρούς πόρους οδηγεί σε πιο αργή μετακίνηση των πρωτεϊνών, ενώ πηκτή με μεγαλύτερους πόρους οδηγεί σε ταχύτερη μετακίνηση των πρωτεϊνών. Η πυκνότητα της πηκτής επιλέγεται ανάλογα με το μοριακό βάρος των μελετούμενων πρωτεϊνών. Η πηκτή είναι διφασική. Αποτελείται από το άνω τμήμα (stacking gel) με πυκνότητα 5% στο οποίο πακετάρονται οι πρωτεΐνες και από το κάτω τμήμα (resolving gel) στο οποίο διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες και το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε πυκνότητα 12% στο συγκεκριμένο πείραμα, διότι οι πρωτεΐνες που μελετώνται έχουν μικρά μοριακά βάρη (ACTIN 42 kDa, PGRMC1 25 kDa, TMEM97 18-21.5 kDa). Το resolving gel (12%), που θα τοποθετηθεί πρώτο αποτελείται από τα εξής υλικά στις παρακάτω ποσότητες :

- DDH₂O 3,4ml
- 30% ακρυλαμίδη 4ml
- Tris buffer (1.5M TrisCl pH 8.8-TrisBase 181,5g σε 1L dH₂O) 2,5ml
- SDS 10% 0,1ml
- APS 50μl
- TEMED 5μl

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος ώστε να πολυμεριστεί η πηκτή. Αφού παρασκευαστεί, το resolving gel τοποθετείται ανάμεσα στα τζαμάκια ενώ παράλληλα παρασκευάζεται το stacking gel το οποίο προστίθεται πάνω από το resolving και στη συνέχεια τοποθετούνται ειδικά χτενάκια, για την παρακσευή πηγαδιών στα οποία φορτώνονται τα δείγματα ενδιαφέροντος . Το stacking gel (5%) αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- DDH₂O 5,7 ml
- 30% ακρυλαμίδη 1,7ml
- Tris Buffer ρυθμιστικό διάλυμα (TrisCl 0,5M pH 6.8-TrisBase 121 g σε 1L dH₂O) 2,5 ml
- SDS (ανιονικό απορρυπαντικό για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών) 10% 0,1 ml
- APS 50 μl
- TEMED 10μl

2.2.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση:

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία που βασίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών λόγω της ικανότητας τους να μετακινούνται κατά μήκος του ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Σημαντικός παράγοντας αποτελεί το SDS που προστέθηκε στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και 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.

Τα δείγματα που έχουν ληφθεί από την λύση των κυττάρων φορτώνονται στα πηγαδάκια, αφού υπολογιστούν οι σωστές ποσότητες σύμφωνα με την ανάλυση Bradford και πρότυπης καμπύλης που πραγματοποιήθηκε. Αρχικά τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα PBS 1x στα eppendorfs και στη συνέχεια οι ποσότητες των δειγμάτων και ποσότητα loading buffer (1/3 της συνολικής ποσότητας) ώστε να προκύψει τελικός όγκος 21μl για φόρτωμα στα πηγαδάκια. Στο συγκεκριμένο πείραμα προστίθενται 7 μl loading buffer.

Το loading buffer αποτελείται από τα εξής συστατικά που είναι απαραίτητα για την ηλεκτροφόρηση:

- 400μl γλυκερίνης
- 100μl Tris Cl 0,5 M
- 100μl μπλε βρωμοφαινόλης 0,2%
- 100μl SDS 20%
- 100μl Β-μερκαπταιθανόλη

Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους στη πηκτή. Η Β-μερκαπταιθανόλη είναι τοξική και τοποθετείται τελευταία από τα υπόλοιπα συστατικά μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) είναι απορρυπαντικό, το οποίο προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε θερμοκρασία 95°C, γι' αυτό προηγείται βρασμός των eppendorfs στους 95°C για 5 λεπτά πριν το φόρτωμα των δειγμάτων. Τα δείγματα μετά τον βρασμό μεταφέρονται σε πάγο όπου και διατηρούνται μέχρι το φόρτωμα. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε συσκευή για ανάδευση spin 10 δευτερολέπτων. Ακολούθως φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια με την βοήθεια πιπέτας, ενώ στις άκρες της πηκτής φορτώνονται οι μάρτυρες (markers) (3-4μl) που περιέχουν πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους επιτρέποντάς τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά στα 100V μέχρις ότου το μέτωπο των δειγμάτων να ξεπεράσει το σημείο ένωσης του stacking με το resolving gel (15-20 λεπτά). Οι πρωτεΐνες στοιχίζονται στο stacking gel και διαχωρίζονται στο resolving gel. Στη συνέχεια τα volt αυξάνονται στα 200 μέχρι τον κατάλληλο διαχωρισμό των ζωνών των markers, ώστε

να γίνει σωστά ο προσδιορισμός των επιθυμητών πρωτεϊνών (40 λεπτά).

Το Transfer Buffer 10x παρασκευάζεται από Glycine 144g και Trizma 30,3g διαλυμένα σε 1LdH₂O.

Το gel cassette sandwich αποτελείται από τα εξής:

- Δύο σφουγγαράκια με Transfer Buffer 1xστη βάση του “σαντουιτς”
- Η πηκτή τοποθετημένη σε στεγνό χαρτί Whatmann πάνω από τα σφουγγαράκια
- Η μεμβράνη PVDF, η οποία προηγουμένως έχει τοποθετηθεί για 1 λεπτό σε μεθανόλη για ενεργοποίηση, και τοποθετείται πάνω από την πηκτή
- Ένα χαρτί Whatmann εμποτισμένο με Transfer Buffer 1x πάνω από την μεμβράνη
- Ένα σφουγγαράκι με Transfer Buffer στην κορυφή

Το gel cassette sandwich κλείνει και μεταφέρεται σε ειδική συσκευή (BioRad PowerPac 300 Powersupply) για τη μεταφορά των πρωτεϊνών (blot), η οποία ρυθμίζεται στα 400mA σταθερά για 75 λεπτά. Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ακολουθεί χρώση της μεμβράνης, με την χρωστική Ponceau (0,1gPonceauSσε 100mlΟξικό Οξύ) για τον έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για μία ώρα με το διάλυμα blocking buffer το οποίο αποτελείται από 5% TTBS (95% Tween-20 Tris-Buffered Saline 1x και 5% FBS) που παρασκευάζεται από 450ml NaCl 0,9%, 50ml TrisCl 1M, 500μl Tween20 και από 25ml FBS (500ml) υπό ήπια ανάδευση. Το blocking buffer χρησιμοποιείται, ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του διαλύματος. Στη συνέχεια, ακολουθεί overnight επώαση με κατάλληλο πρώτο αντίσωμα υπό ήπια ανάδευση. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα που αναφέρθηκαν στην ενότητα υλικά και μέθοδοι και είναι ειδικά για τους υποδοχείς PGRMC1, TMEM97 καθώς και η ακτίνη(housekeeping gene). Την επόμενη μέρα αφαιρείται το αντίσωμα και πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις της μεμβράνης με TTBS 1x (450ml NaCl 0,9%, 50ml TrisCl 1M, 500μl Tween20) υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, τοποθετείται το δεύτερο αντίσωμα, αραιωμένο σε TTBS 5% για επώαση (1 ώρα) με τη μεμβράνη και ακολουθούν τρεις εκπλύσεις της μεμβράνης (από 5 λεπτά) με TTBS 1x υπό ανάδευση.

Τέλος, με σκοπό την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της πειραμάτων, 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 ποσοτικοποίηση της απεικόνισης των αποτελεσμάτων σε σχέση με την ακτίνη, 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) στην προεκειμένη πειραματική διαδικασία και ορίζει το ισοφόρτωμα των δειγμάτων (προϋπόθεση εί το ισοφόρτωμα τον δειγμάτων).

2.4 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας (SRB Assay)

Με τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας ελέγχθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, η επίδραση της αποσιώπησης των υποδοχέων στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων Attached, καθώς και η εξειδίκευση του σ2 αγωνιστή Σιραμεσίνη, απουσία αυτών. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της χρωστικής sulforhodamine B (SRB). Πιο συγκεκριμένα, η SRB χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας, βασισμένη στη μέτρηση του κυτταρικού περιεχομένου σε πρωτεΐνες (Skehan et al., 1990). Η χρωστική έχει την ικανότητα να προσδένεται σε πρωτεΐνες των κυττάρων, που έχουν μονιμοποιηθεί με τριχλωροακετοξικό οξύ TCA. Είναι 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 και γίνεται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 540 nm.

Το SRB assay πραγματοποιείται σε πιάτα 96 θέσεων(96-well plates). Η διαδικασία που ακολουθεί περιγράφεται ως εξής:

Day 1: Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού RPMI στα κύτταρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας. Για να ξεκινήσει το πείραμα απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να έχουν καλύψει το 70-80 % της φλάσκας.

Day 2: Κατά την δεύτερη μέρα του πειράματος πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη, με τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων, που προαναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Ένα μέρος του εναιωρήματος αφήνεται στη φλάσκα για τη συνέχιση της καλλιέργειας και το υπόλοιπο συλλέγεται σε σωληνάριο (falcon) για τις ανάγκες του πειράματος. Γίνεται καλή ανάδευση αυτού και ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο. Σκοπός είναι να προσδιοριστεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στο εναιώρημα ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα των κυττάρων που χρειάζονται για να επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων σε κάθε πηγάδι του πιάτου 96 θέσεων. Στην προεκειμένη περίπτωση χρειάστηκαν 5000 κύτταρα ανά πηγάδι. Συνολικά χρειάζονται πηγάδια τόσα ώστε να έχουμε:

- κύτταρα με σίγηση των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1 ξεχωριστά αλλά και με το συνδυασμό αυτών
- κύτταρα χωρίς σίγηση που επωάζονται με διαφορετικές συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης

- κύτταρα με τη scramble αλληλουχία (μη ειδική αλληλουχία siRNA. Negative Control) που επωάζονται με διαφορετικές συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης
- κύτταρα με σίγηση που επωάζονται με διαφορετικές συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης
- κύτταρα ελέγχου 1. χωρίς σίγηση υποδοχέων 2. με την αλληλουχία scramble στα οποία δεν προστίθεται Σιραμεσίνη, ώστε να υπάρχει σύγκριση του ρυθμού ανάπτυξης μεταξύ κυττάρων με αποσιώπηση, Σιραμεσίνη, τον συνδυασμό τους με τα κύτταρα ελέγχου.
- κύτταρα ελέγχου που αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή μηδέν (Tzero), χωρίς την προσθήκη Σιραμεσίνης και τα οποία μονιμοποιούνται την ημέρα που προστίθενται η ουσία, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση της, από την ημέρα έκθεσης των κυττάρων έως τη λήξη του πειράματος.

Αφού συλλεχθεί ο τελικός αριθμός κυττάρων που χρειάζονται γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου υπολογίζοντας για κάθε πηγαδάκι να αντιστοιχεί σε 100μl. Γίνεται καλή ανάδευση ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένα στο εναιώρημα και από αυτό μεταφέρονται 100 μl σε κάθε πηγάδι του πιάτου. Τα 96-well plates τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο υπό τις ίδιες συνθήκες που γίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων.

Day 3: Την τρίτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση της Σιραμεσίνης σε κάθε ξεχωριστή κατηγορία κυττάρων. Αρχικά παρασκευάζονται οι διαφορετικές αραιώσεις των φαρμάκων. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η επίδραση 4 διαφορετικών αραιώσεων του φαρμάκου Σιραμεσίνης (100μM, 10μM, 1μM, 0.1μM) από αρχική συγκέντρωση Σιραμεσίνης 10 mM. Σε κάθε πηγάδι προστίθενται 100 μl από κάθε αραιώση, με τον τελικό όγκος μετά την προσθήκη της ουσίας να ανέρχεται στα 200μl σε κάθε πηγάδι. Στα δείγματα ελέγχου προστίθενται 100μl RPMI. Τέλος, το πιάτο 96 θέσεων τοποθετείται ξανά στον επωαστικό κλίβανο (37°C).

Στο δεύτερο πιάτο που περιέχει τα κύτταρα Tzero (Tz cells) προστίθενται 100μl RPMI, ακολουθεί η προσθήκη 100μl 50% TCA (Trichloroacetic acid), το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C και τέλος τα πιάτα εκπλενούνται 3-4 φορές με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Το πιάτο στεγνώνει στον αέρα και αποθηκεύεται για περαιτέρω επεξεργασία.

Day 4: Την τέταρτη ημέρα ακολουθεί παρατήρηση του πρώτου πιάτου που επωάζεται στον κλίβανο.

Day 5: Κατά την πέμπτη και τελευταία μέρα του πειράματος πραγματοποιείται η μονιμοποίηση των κυττάρων του πρώτου πιάτου ομοίως με το δεύτερο, προσθήκη δηλαδή 100 μl TCA (4°C για μία ώρα) και έκπλυση του plate 4-5 φορές με απιονισμένο νερό. Αφού στεγνώσει το plate στον αέρα ακολουθεί χρώση των δυο πιάτων με την προσθήκη 50 μl χρωστικής Sulforhodamine B (Σουλφοροδαμίνη Β) (SRB) 0.4 % (w/v) σε 1% οξικό οξύ, η οποία εισχωρεί στα κύτταρα και προσδένεται στις πρωτεΐνες. Τα πιάτα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί η έκπλυσή τους (4-5 φορές) με 1% οξικό οξύ, ώστε να απομακρυνθεί όση χρωστική δεν έχει δεσμευτεί από τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Στη συνέχεια τα πιάτα στεγνώνουν στον αέρα. Τέλος προστίθενται σε αυτά 150 μl 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 °C και μετά το πέρας των δέκα λεπτών αναδεύονται ήπια στην μπαλαρίνα για 10 λεπτά στις 30 στροφές. Τέλος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα

540 nm σε φωτόμετρο microplate reader Biotek microelisa (Biotek, El-311), αυτοματοποιημένο για πιάτο 96 θέσεων Elisa . Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις μεταφέρονται στο λογισμικό Microsoft Excel με σκοπό τον υπολογισμό των εξής παραμέτρων:

GI50 (Growth Inhibition of 50 %): Αναφέρεται στη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% μείωση της αύξησης της καθαρής πρωτεΐνης, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου $[100 \times (T - T_0)/(T_c - T_0) = 50]$

TGI (Total Growth Inhibition): Αναφέρεται στη συγκέντρωση της ουσίας που οδηγεί σε ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων $[100 \times (T - T_0)/T_0 = -50]$

LC50 (Lethal Concentration of 50%) Αναφέρεται στη συγκέντρωση του αναστολέα που οδηγεί σε 50% μείωση της πρωτεΐνης σε σχέση με αυτή πριν τη χορήγηση της ουσίας $[100 \times (T - T_0)/(T_c - T_0) = 0.]$

Όπου: T= η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού έπειτα από χορήγηση του φαρμάκου
T₀= η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού τη στιγμή προσθήκης του φαρμάκου
T_c= η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού δείγματος ελέγχου control μετά από 48 ώρες.

2.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)

Η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών είναι μια *in vitro* διαδικασία κατά την οποία αξιολογείται η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επιβιώνουν και να αναπαράγονται σχηματίζοντας αποικίες από μεμονωμένα κύτταρα. Η αποικία ορίζεται από τουλάχιστον 50 κύτταρα. Αυτή η ανάλυση περιγράφηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 (Puck & 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).

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία μελετάται η επίπτωση της διαδικασίας αποσιώπησης του mRNA των PGRMC1 και TMEM97, στην ικανότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων Attached να δημιουργούν αποικίες, καθώς και η επίδραση που έχει η Σιραμεσίνη στην ικανότητα των επιμολυσμένων με τα παραπάνω siRNA κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες. Πρωτίστως, συλλέγονται κύτταρα ύστερα από την διαδικασία της θρυψινοποίησης που περιγράφηκε παραπάνω και υπολογίζεται

ο αριθμός των κυττάρων που χρειάζεται το συγκεκριμένο πείραμα. Ο αριθμός των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν σε κάθε πηγαδάκι εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά. Στο συγκεκριμένο πείραμα, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε η παγκρεατική καρκινική σειρά κυττάρων Attached, χρειάζεται ως αρχικός πληθυσμός κυττάρων ανά πηγαδάκι τα 400 κύτταρα.

Πιο αναλυτικά, σε πιάτα 6 θέσεων (six wells) στρώνεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων στα οποία έχει υποστεί αποσιώπηση το mRNA των PGRMC1 και TMEM97. Επιπλέον, στρώνονται σε πιάτα 6 θέσεων κύτταρα που έχουν υποστεί διπλή αποσιώπηση PGRMC1 και TMEM97, καθώς και πιάτα με κύτταρα που δεν έχουν υποστεί οποιαδήποτε αποσιώπηση και αποτελούν τα untreated και πιάτα με κύτταρα που έχουν επωαστεί με scramble siRNA (negative control). Σε όλα τα πηγαδάκια προστίθεται θρεπτικό μέσο RPMI σε τελικό όγκο 1ml. Την επόμενη μέρα προστίθεται άλλο 1 ml το οποίο περιέχει την εκάστοτε συγκέντρωση Σιραμεσίνης, καθώς και από 1 ml καλλιεργητικού μέσου για τα negative control και τα untreated. Οι συγκεντρώσεις της Σιραμεσίνης που χρησιμοποιούνται είναι 0,1μM , 1μM και 10μM.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% CO₂ και 95% επίπεδα υγρασίας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που ανέρχεται στις δύο εβδομάδες. Τα πιάτα επωάζονται για μία εβδομάδα στον κλίβανο και στη συνέχεια γίνεται ανανέωση του θρεπτικού με πλήρη απομάκρυνση του παλιού και προσθήκη νέου και στα δείγματα ελέγχου και στα κύτταρα με τις διάφορες συγκεντρώσεις της σιραμεσίνης. 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), 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.
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 1ml Trizma base σε συγκέντρωση 10mM, Τα πιάτα με το Trizma Base επωάζονται για 10 λεπτά στον κλίβανο στους 37 °C.
6. Μετά το πέρας των δέκα λεπτών αναδεύονται ήπια στην μπαλαρίνα για 10 λεπτά στις 50 στροφές.
7. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540 nm σε φωτόμετρο

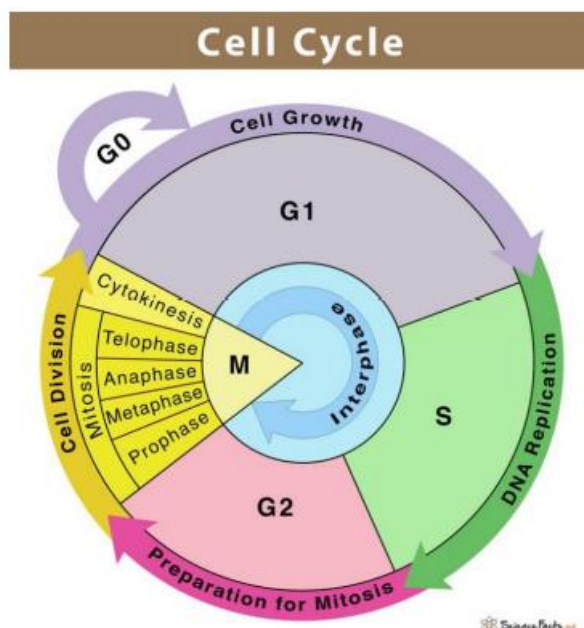
Τέλος απαραίτητη είναι η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel και συγκεκριμένα, με τη δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία.

2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

2.6.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Η αναπαραγωγή των κυττάρων συμβαίνει μέσω της διαίρεσης, όπου 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 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 (Εικόνα 2.4). 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-κυττοκίνηση. 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 2.4 : Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου (Cell Cycle: Definition, Phases, and Diagram n.d.)

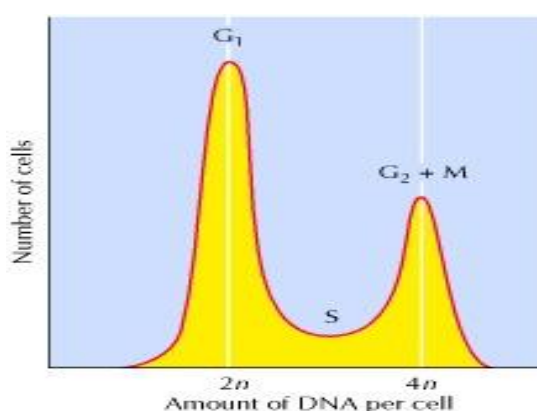
2.6.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Μονοπαραμετρική ανάλυση κυτταρικού κύκλου με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium iodide, PI)

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και την εξέταση των αλλαγών που επιφέρει σε αυτόν η κάθε υπό εξέταση ουσία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής σε συνδυασμό με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής, Propidium iodide (PI). Η λειτουργία της φθορίζουσας χρωστικής γενωμικού DNA, Propidium iodide (PI), βασίζεται στην ικανότητα αυτής να προσδένεται στο ολικό κυτταρικό DNA, ενώ η μελέτη γίνεται με τη χρήση ιστογραμμάτων μιας παραμέτρου στην οποία απεικονίζεται η ποσότητα του γενωμικού DNA κατά τις διαφορετικές φάσεις στον κυτταρικό κύκλο, σε συνάρτηση με τον αριθμό των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση ανωμαλιών στον κυτταρικό κύκλο που επέρχονται ύστερα από τη δράση των υπό εξέταση ουσιών, όπως επίσης γίνεται και μια πρότυπη αναφορά σε μέρος του κυτταρικού πληθυσμού που υφίστανται αποπτωτικό θάνατο (Balan et al. 2007| Riccardi and Nicoletti 2006).

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 90 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 (Εικόνα 2.5). 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 2.5: 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 G2/M έχει ήδη διπλασιαστεί ενώ στην G1 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 Attached, που έχει επιμολυνθεί με τα siRNA επιλογής σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, δηλαδή αυτά που έχουν επιμολυνθεί με

scramble siRNA και εκείνα που δεν έχουν τροποποιηθεί καθόλου (untreated). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Αρχικά πραγματοποιείται στρώσιμο κυττάρων Attached τα οποία έχουν συλλεχθεί με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης σε πιάτα 6 θέσεων. Πρόκειται συγκεκριμένα για κύτταρα που επιμολύνονται με τα siRNA επιλογής(PGRMC1 και TMEM97) τόσο μεμονωμένα όσο και με το συνδυασμό αυτών, καθώς και για αυτά που επιμολύνονται με scramble siRNA και κύτταρα χωρίς καμία επεξεργασία (untreated)., Επιπλέον, στο συγκεκριμένο πείραμα συλλέχθηκαν τόσο κύτταρα χωρίς σίγηση όσο και κύτταρα με αποσίωση των επιθυμητών mRNA που επώασθηκαν εξίσου με 5 και 10μM Σιραμεσίνης. Έτσι σε κάθε πηγαδάκι στρώνονται περίπου 200.000 κύτταρα όπου γίνονται οι απαραίτητες διεργασίες. Στη συνέχεια επωάζονται σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% CO₂ και 95% επίπεδα υγρασίας για 48 ώρες.

Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος 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 (2-3 min)
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, καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1400 στροφές για 10 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου, 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 για μονιμοποίηση των κυττάρων και ανάδευση στο vortex.
9. Τέλος αποθήκευση των κυττάρων στους -20oC.

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), που λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα, ιωδιούχο προπίδιο- PI (Propidium Iodide) (Sigma, code: BCCB3059), το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα μονιμοποιημένων κυττάρων, και RNAase (DNAase free), το οποίο χρησιμοποιείται για να καταστρέψει το RNA, ώστε να μην υπάρχει ενδεχόμενο να προσδεθεί το PI σε αυτό. 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.

2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

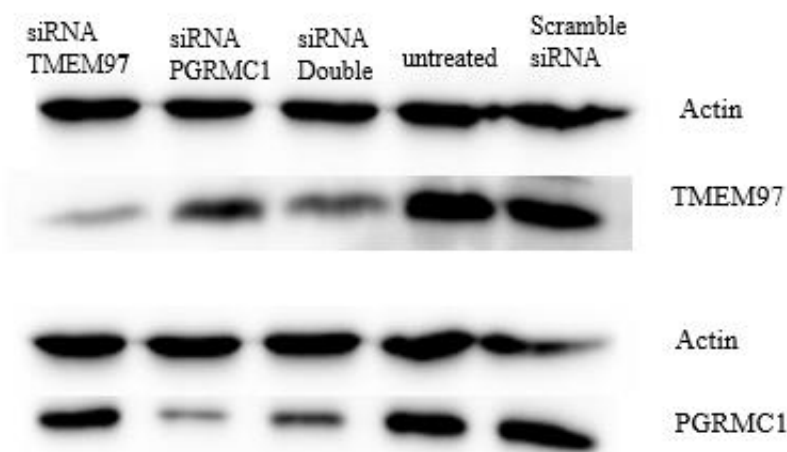
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel και συγκεκριμένα, με τη δοκιμασία T-test. Μέσω του T-test υπολογίσαμε τη στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία. Η στατιστική σύγκριση γινόταν κάθε φορά για κάθε 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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

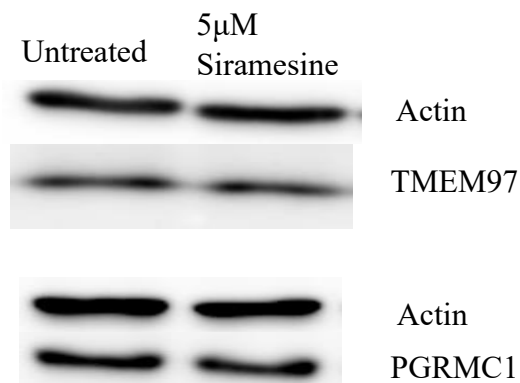
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ TMEM97 ΚΑΙ PGRMC1 ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ siRNA

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήσαμε να ελέγξουμε, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών PGRMC1 και TMEM97, ύστερα από αποσιώπηση του mRNA αυτών με siRNA, είτε μεμονωμένα, είτε συνδυαστικά (Double) στην κυτταρική σειρά Attached, έπειτα από επώαση 72 ωρών, ώστε να μελετηθεί ο ρόλος των υποδοχέων στον παγκρεατικό καρκίνο και στη συνέχεια να μελετηθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της δράσης της Σιραμεσίνης και των σίγμα-2 υποδοχέων που έχουν υποστεί αποσιώπηση. Για την επιβεβαίωση του ισοφορτώματος μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήσαμε την ακτίνη που εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. 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. Αναφορικά με την έκφραση της πρωτεΐνης TMEM97, σύμφωνα με την Εικόνα 3.1 και το πυκνομετρικό γράφημα 3.1, παρατηρούμε εμφανώς μειωμένη έκφραση μετά από επώαση με siRNA για 72 ώρες με ποσοστό 23 % σε σχέση με την έκφρασή της χωρίς επιμόλυνση με siRNA (Untreated) που είναι 80%, το ίδιο παρατηρείται και στην έκφραση της πρωτεΐνης PGRMC1, της οποίας η έκφραση μετά από επιμόλυνση με siRNA είναι της τάξεως του 24% σε σχέση με το ποσοστό χωρίς επιμόλυνση που ήταν 75%. Στην ταυτόχρονη αποσιώπηση και των δύο πρωτεϊνών, σύμφωνα με την ίδια εικόνα και το γράφημα 3.1, η έκφραση φαίνεται να είναι μειωμένη σε σχέση με τα δείγματα χωρίς επιμόλυνση με siRNA, αλλά αυξημένη σε σχέση με την αποσιώπηση της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά (με ποσοστό γύρω στο 40%), παρουσιάζει δηλαδή μια ενδιάμεση έκφραση.



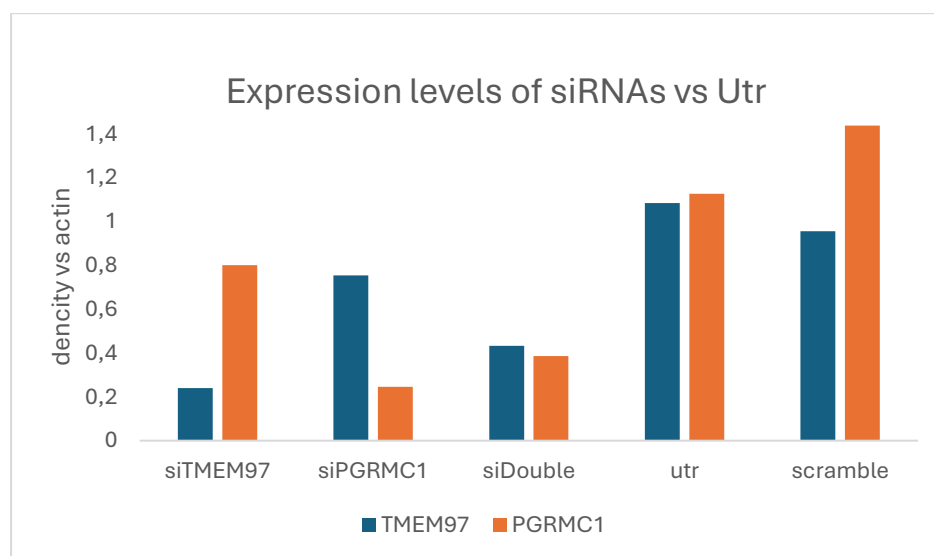
Εικόνα 3.1: Έκφραση των πρωτεϊνών TMEM97, PGRMC1 και Double σε κύτταρα Attached, τα οποία επιμολύνθηκαν με siRNA των TMEM97 και PGRMC1 και με Scramble siRNA, καθώς και σε κύτταρα που έχουν επωαστεί μόνο με θρεπτικό μέσο (Untreated) για 72 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Στην Εικόνα 3.2 φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 απουσία Σιραμεσίνης (Untreated), καθώς και παρουσία 5μM Σιραμεσίνης, μετά από επώαση για 48 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος των δειγμάτων, ενώ στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 3.2) απεικονίζεται η πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων TMEM97 και PGRMC1 σε σχέση με την ακτίνη.

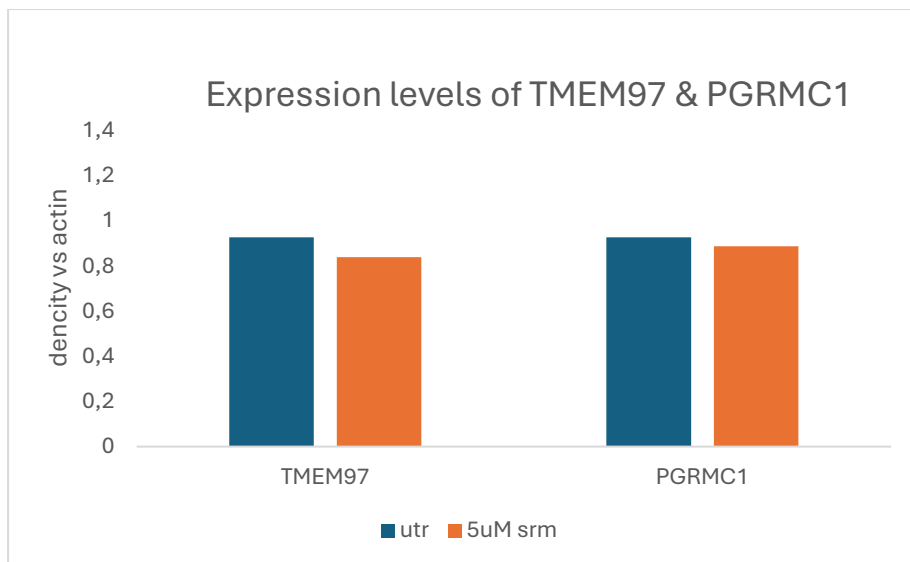


Εικόνα 3.2: Έκφραση των πρωτεϊνών TMEM97, PGRMC1 σε κύτταρα Attached, απουσία (Untreated) και παρουσία 5μM Σιραμεσίνης μετά από 48 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Σύμφωνα με την Εικόνα 3.2 και το Γράφημα 3.2, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TMEM97 φαίνεται να είναι παρόμοια στα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί επώαση με τη Σιραμεσίνη (93%), σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των κυττάρων Attached τα οποία επώαστηκαν με 5μM Σιραμεσίνης για 48 ώρες (84%), το ίδιο ισχύει και για τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PGRMC1, απουσία (93%) και παρουσία Σιραμεσίνης (89%).



Γράφημα 3.1: Πυκνομετρία των επιπέδων έκφρασης των επιμολυσμένων με siRNA TMEM97 (siTMEM97), PGRMC1 (siPGRMC1), με siRNA αρνητικού ελέγχου (Scramble) και με siRNA συνδυαστικής αποσιώπησης των υποδοχέων (siDouble), καθώς και μη επιμολυσμένων με siRNA κυττάρων (Untreated-Utr) για 72 ώρες σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached σε σχέση με την ακτίνη (πρωτεΐνη αναφοράς). Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα TMEM97 και με πορτοκαλί του PGRMC1.



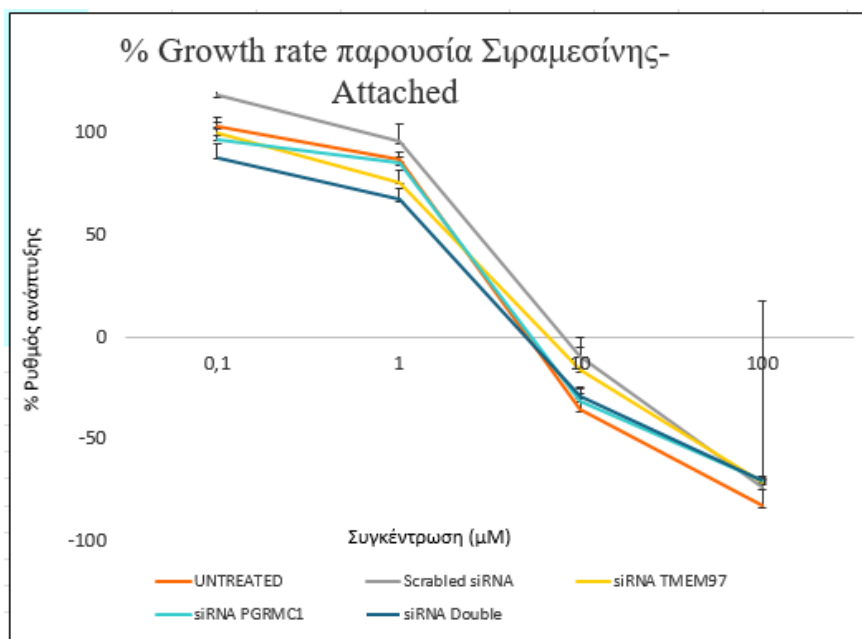
Γράφημα 3.2: Πυκνομετρία των επιπέδων έκφρασης TMEM97 & PGRMC1 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached σε σχέση με την ακτίνη (πρωτεΐνη αναφοράς), απουσία Σιραμεσίνης (Untreated-Utr)(μπλε) και παρουσία 5μM Σιραμεσίνης (5uM SRM)(πορτοκαλί).

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ IN VITRO ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB

3.2.1 In vitro κυτταροτοξικότητα της Σιραμεσίνης σε Attached κύτταρα με φυσιολογικά επίπεδα υποδογέων TMEM97 και PGRMC1 και σε κύτταρα με αποσιωπημένους υποδογείς

Με τη μέθοδο της κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική δράση της Σιραμεσίνης στην παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά Attached σε συγκεντρώσεις 100/10/1/0,1μM. Από τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής υπολογίσθηκαν οι παράμετροι GI50, TGI και LC50 (βλέπε ενότητα 2.4) με βάση τον ρυθμό αύξησης των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τον αναστολέα.

Στο παρακάτω γράφημα (γράφημα 3.3) φαίνεται η επίδραση της σιραμεσίνης, για κάθε διαφορετική συγκέντρωση που εξετάστηκε, ως προς τον ρυθμό αύξησης των κυττάρων της παγκρεατικής καρκινικής σειράς Attached στην εκάστοτε περίπτωση. Το γράφημα αυτό αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων από τρία ανεξάρτητα πειράματα in vitro κυτταροτοξικότητας.



Γράφημα 3.3: Αναπαράσταση του % ρυθμού αύξησης του πληθυσμού που δεν έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA απουσία Σιραμεσίνης (Untreated)(πορτοκαλί), σε σύγκριση με τον πληθυσμό που έχει υποστεί αποσιώπηση με Scramble siRNA (siRNA αρνητικού ελέγχου)(γκρι), πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA για τον υποδοχέα TMEM97(κίτρινο), για τον PGRMC1 (γαλάζιο) και για τους δύο υποδοχείς μαζί (Double siRNA)(μπλε), υπό επώαση με συγκεντρώσεις 100μM, 10μM, 1μM και 0.1μM. Σιραμεσίνης για 48h, της κυτταρικής σειράς Attached (Άξονας X: Η συγκέντρωση Σιραμεσίνης, Y: % Ρυθμός Ανάπτυξης των κυττάρων). Στο γράφημα απεικονίζονται και οι τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.3, στο οποίο απεικονίζεται το ποσοστό (%) του ρυθμού αύξησης των κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί με siRNA, έπειτα από χορήγηση Σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 0,1μM, 1μM, 10μM και 100μM σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς επιμόλυνση (untreated), παρατηρήθηκε πως ο ρυθμός αύξησης της κυτταρικής σειράς Attached φαίνεται να παρουσιάζει αρκετές διαφορές μεταξύ των διάφορων συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, στην συγκέντρωση 0.1μM ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση με siRNA είναι περίπου 100%. το ίδιο ισχύει και για τις περιπτώσεις των κυττάρων που αποτελούν αρνητικό δείγμα ελέγχου (scramble control siRNA) και τα κύτταρα που έχουν υποστεί σίγηση στους υποδοχείς TMEM97 και PGRMC1, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα untreated. Στα κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση και των δύο πρωτεϊνών (TMEM97 και PGRMC1) παρατηρήθηκε ποσοστό 88.2%. Παρόμοια φαίνεται να είναι και τα ποσοστά ρυθμού αύξησης και στην συγκέντρωση 1μM σε όλες τις περιπτώσεις.

Όσον αφορά στην συγκέντρωση 10μM, ο ρυθμός ανάπτυξης όλων των δειγμάτων εμφανίζει αρνητικές τιμές και συγκεκριμένα στα untreated κύτταρα ο ρυθμός ανάπτυξης είναι -35,4%, στα επιμολυσμένα με scramble siRNA κύτταρα -9.1%, σε αυτά με αποσιώπηση TMEM97 το ποσοστό είναι -16%, με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα untreated ($p < 0.05$), ενώ στα κύτταρα με αποσιώπηση PGRMC1 και με διπλή αποσιώπηση τα ποσοστά ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων είναι παρόμοια (-31% και -29% αντίστοιχα), χωρίς η διαφορά με τα untreated να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ στην συγκέντρωση 100μM παρατηρήθηκε περαιτέρω

μείωση των ποσοστών ρυθμού ανάπτυξης σε όλα τα δείγματα με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ -70% (Double και PGRMC1 siRNA) και -82.5% (untreated), με siRNA TMEM97 και Scramble να έχουν ποσοστό -71 έως -73%, με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα untreated ($p < 0.05$).

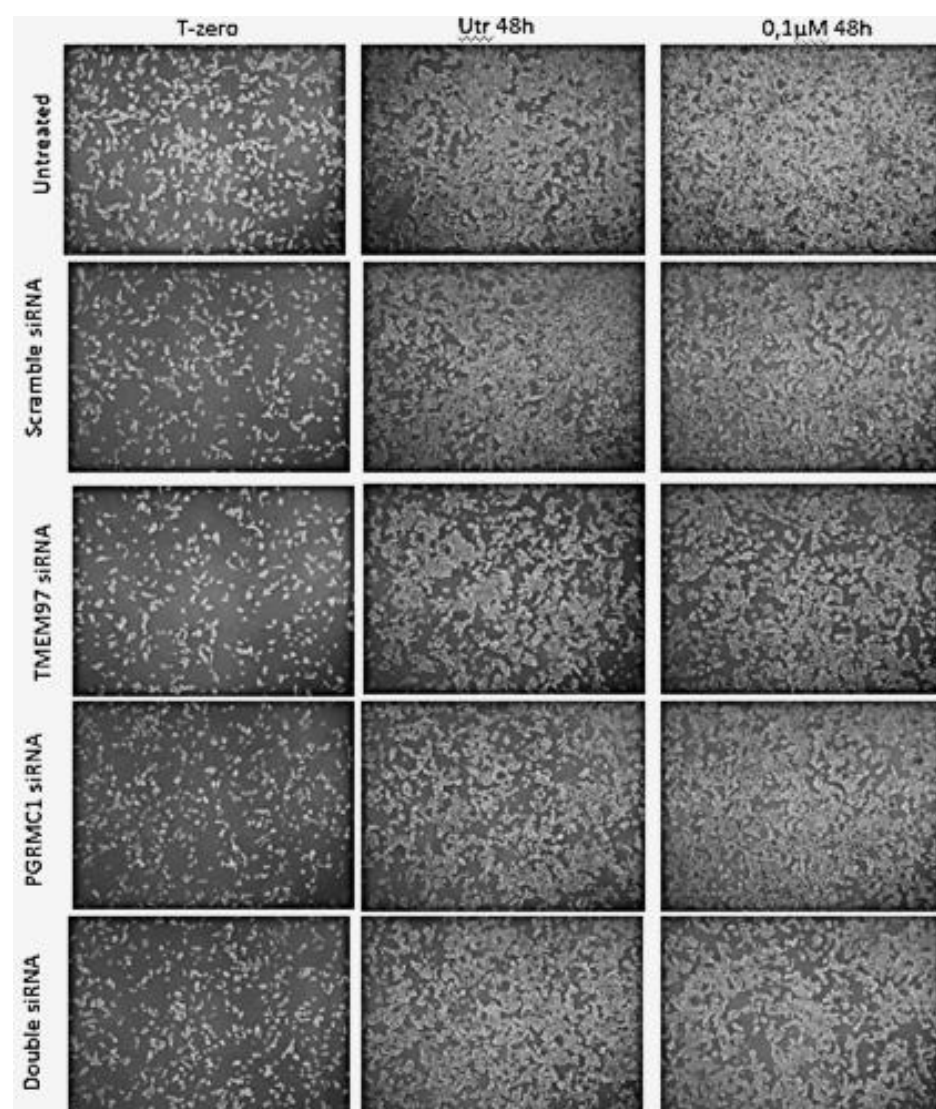
Παρατηρήθηκε δηλαδή ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της ουσίας, τόσο μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων. Από τις τιμές των ρυθμών αύξησης υπολογίστηκαν οι παρακάτω παράμετροι (GI50, TGI, LC50). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα αποτελούν τη μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας (Πίνακας 3.1)

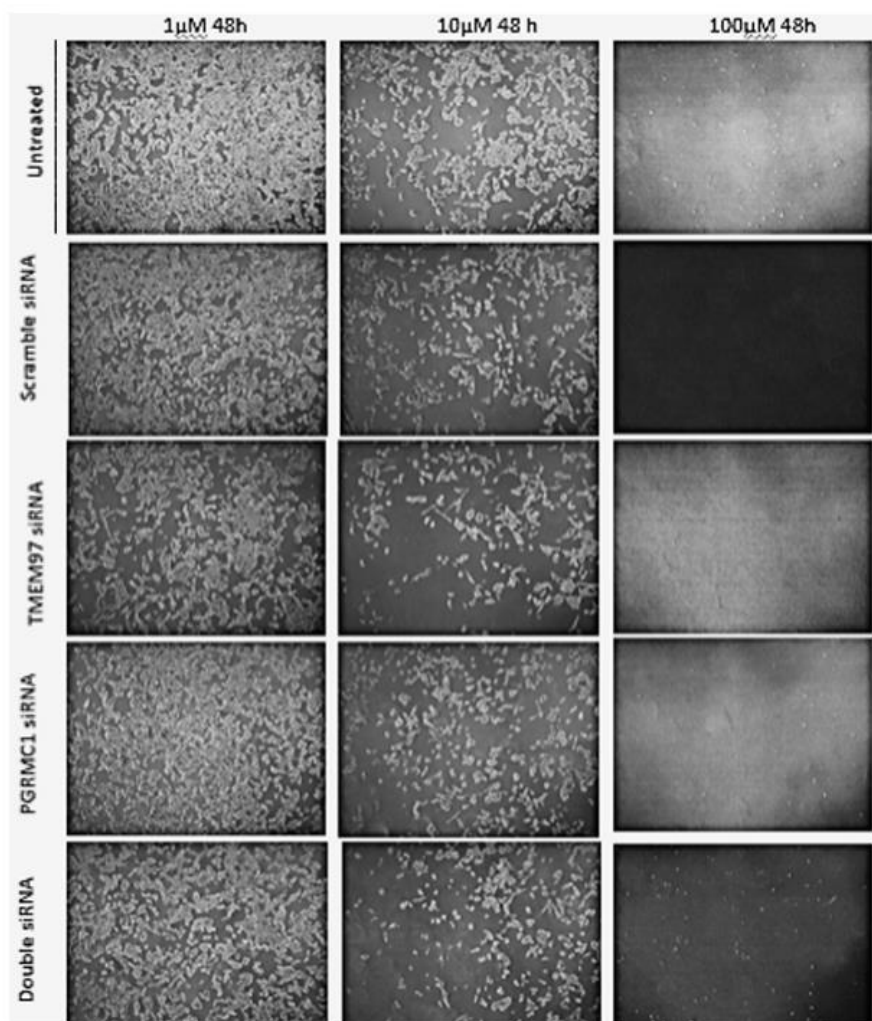
Πίνακας 3.1: Κυτταροτοξική δράση της Σιραμεσίνης στην παγκρεατική καρκινική σειρά Attached

	Untreated	Scramble siRNA	siRNA TMEM97	siRNA PGRMC1	siRNA Double
GI50	3.705 μ M	4.95 μ M	3.536 μ M	3.71 μ M	2.639 μ M
TGI	7.421 μ M	9.29 μ M	8.462 μ M	7.60 μ M	7.303 μ M
LC50	36.77 μ M	66.1 μ M	64.86 μ M	53.4 μ M	56.37 μ M

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.1, η συγκέντρωση της Σιραμεσίνης που προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση (GI50) είναι 3.7 μ M, η συγκέντρωση που προκαλεί ολική αναστολή στην ανάπτυξη (TGI) είναι 7.42 μ M. Όσον αφορά στην συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων (LC50), αυτή είναι 36.77 μ M. Αναλυτικότερα, αναφορικά με την τιμή GI50, δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που έχουν υποστεί αποσιώπηση και σε σχέση με τα untreated, το ίδιο ισχύει και με τις τιμές της συγκέντρωσης που προκαλεί ολική αναστολή στην ανάπτυξη TGI. Αναφορικά με την συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων (LC50) παρατηρήθηκε πως σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από αυτή των untreated και συγκεκριμένα η συγκέντρωση Σιραμεσίνης που απαιτείται για να προκληθεί 50% θάνατος στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με siRNA TMEM97 είναι 64.86 μ M, σε αυτά με siRNA PGRMC1 είναι 53.4 μ M, στα κύτταρα με διπλή αποσιώπηση είναι 56.37 μ M και στα κύτταρα με Scramble siRNA 66.1 μ M.

Παρακάτω, προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες τραβηγμένες από ανάστροφο μικροσκόπιο (Εικόνα 3.3), έπειτα από χρώση με SRB των κυττάρων Attached, του πληθυσμού που δεν έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA απουσία Σιραμεσίνης (untreated-utr), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση, την στιγμή που ξεκίνησε η επώαση των κυττάρων με Σιραμεσίνη (T-zero), καθώς και στον πληθυσμό που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA και επωαστεί 48 ώρες με Σιραμεσίνη σε συγκεντρώσεις 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M και 0.1 μ M.



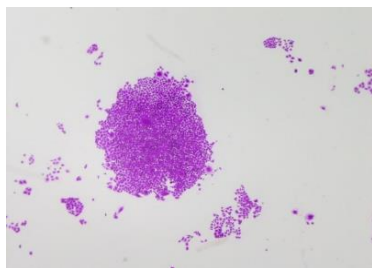


Εικόνα 3.3: Εικόνες που προέκυψαν από τη μέθοδο SRB, του πληθυσμού που δεν έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA απουσία Σιραμεσίνης (untreated-utr), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με Scramble siRNA (siRNA αρνητικού ελέγχου), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA για τον υποδοχέα TMEM97, για τον PGRMC1 και για τους δύο υποδοχείς μαζί (Double siRNA), του πληθυσμού τη στιγμή που ξεκίνησε η επώαση των κυττάρων με Σιραμεσίνη (T-zero), καθώς και στον πληθυσμό που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA και επωαστεί 48 ώρες με Σιραμεσίνη σε συγκεντρώσεις 100μM, 10μM, 1μM και 0.1μM. για 48h.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (CLONOGENIC ASSAY)

3.4.1 Η επίδραση της αποσιώπησης των υποδογέων TMEM97 & PGRMC1 και της Σιραμεσίνης στην ικανότητα δημιουργίας κλώνων των Attached κυττάρων (CLONOGENIC ASSAY)

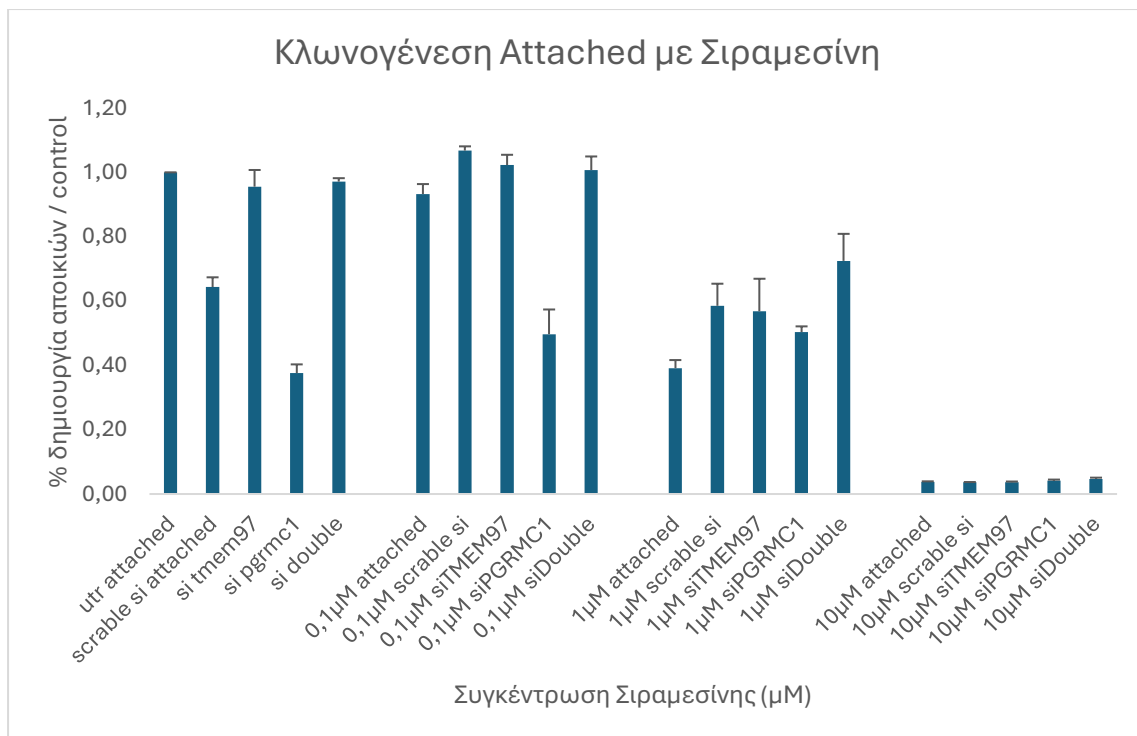
Η μέθοδος του ελέγχου δημιουργίας κλώνων πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό της ικανότητας μεμονωμένων κυττάρων και άρα των πιο ισχυρών να δημιουργούν αποικίες. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5, ο όρος αποικία αναφέρεται σε μία ομάδα άνω των 50 κυττάρων.



Εικόνα 3.4: Μορφολογία μίας αποικίας κυττάρων, εικόνα τραβηγμένη από ανάστροφο μικροσκόπιο. Κάθε αποικία αποτελείται από τουλάχιστον 50 κύτταρα.

Στη συγκεκριμένη πειραματική μέθοδο, ελέγχθηκε η επίδραση της αποσιώπησης των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1, καθώς των διαφορετικών συγκεντρώσεων Σιραμεσίνης σε κύτταρα με φυσιολογικά επίπεδα υποδοχέων και σε κύτταρα που έχουν υποστεί σίγηση των αντίστοιχων υποδοχέων στην δημιουργία κλώνων, που αποτελεί βάση της κλωνογένεσης. Όπως περιεγράφηκε στην Ενότητα 2.5, τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το κατάλληλο siRNA συγκρίθηκαν σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έχουν επιμολυνθεί με siRNA (untreated), μετά το πέρας των 2 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο αυτή παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5 και στο Γράφημα 3.4 αντίστοιχα. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αποτελούν το μέσο όρο αυτών.

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. Με την στατιστική ανάλυση, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό δημιουργίας αποικιών μεταξύ των επιμολυσμένων με siRNA κυττάρων και των μη επιμολυσμένων κυττάρων siRNA (untreated).



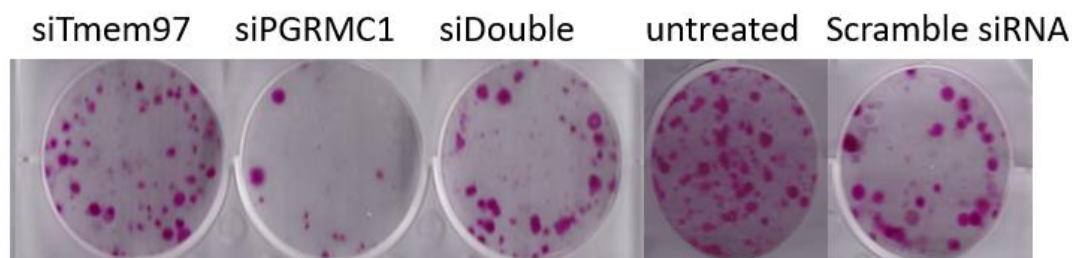
Γράφημα 3.4: Αναπαράσταση του % δημιουργίας αποικιών του πληθυσμού που δεν έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA απουσία Σιραμεσίνης (untreated-utr), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με Scramble siRNA (siRNA αρνητικού ελέγχου-siScramble), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA για τον υποδοχέα TMEM97, για τον PGRMC1 και για τους δύο υποδοχείς μαζί (siDouble), καθώς και στον πληθυσμό που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA και επωαστεί 48 ώρες με Σιραμεσίνη σε συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10μM της κυτταρικής σειράς Attached [Άξονας X: Η συγκέντρωση της Σιραμεσίνης, Y: Ποσοστό δημιουργίας αποικιών σε σχέση με τα Untreated (Control)].

Στο παραπάνω γράφημα (Γράφημα 3.4) φαίνεται το ποσοστό της δημιουργίας αποικιών σε κύτταρα Attached, στα οποία δεν έχει συμβεί επιμόλυνση με siRNA (untreated) απουσία Σιραμεσίνης, σε σχέση με κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με siRNA και με αυτά που έχουν συγχρόνως επιμολυνθεί με siRNA και επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης. Όλα τα ποσοστά που φαίνονται στο γράφημα συγκρίνονται με την ικανότητα των κυττάρων untreated να δημιουργούν αποικίες που ισούται με 100%. Σύμφωνα με το γράφημα, στα κύτταρα τα οποία έχουν επιμολυνθεί με siRNA και έχει συμβεί αποσιώπηση της πρωτεΐνης TMEM97, το ποσοστό δημιουργίας κλώνων είναι 96%, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά με τα untreated, ενώ σε αυτά που έχει συμβεί αποσιώπηση της PGRMC1 το ποσοστό είναι της τάξης του 38% και εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τα untreated ($p < 0.001$), το ίδιο ισχύει και με τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με scramble siRNA με ποσοστό 64%. Στα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί αποσιώπηση και των δύο πρωτεϊνών το ποσοστό είναι της τάξεως του 97%. Είναι εμφανές ότι η αποσιώπηση του υποδοχέα PGRMC1 προκαλεί μείωση της κλωνογένεσης, ενώ του TMEM97 δεν προκαλεί. Όσον αφορά στα ποσοστά δημιουργίας αποικιών των κυττάρων έχουν επωαστεί με Σιραμεσίνη παρατηρήθηκε ότι σε συγκέντρωση 0.1μM Σιραμεσίνης στα δείγματα που δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες

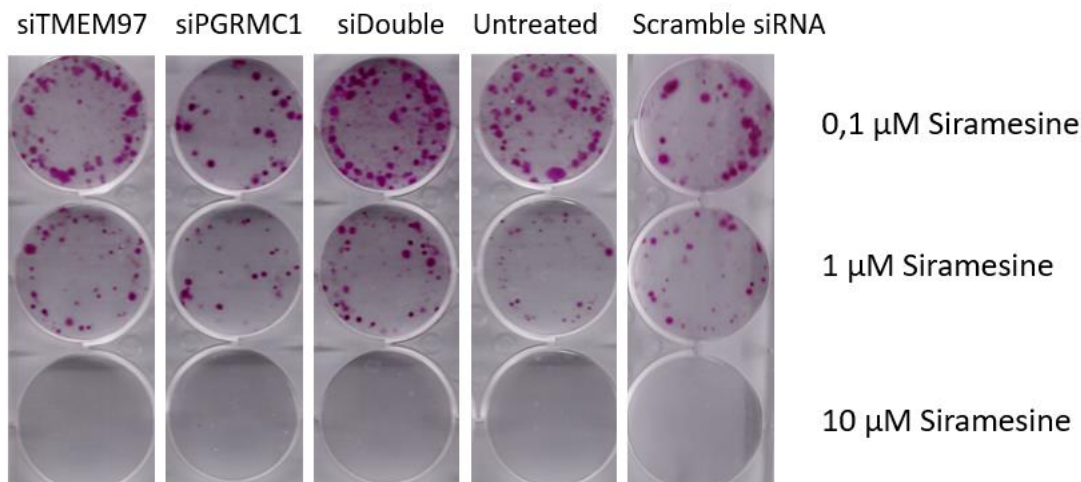
είναι 93%, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα δείγματα τα οποία δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση και επώαση με Σιραμεσίνη (untreated). Στα δείγματα που έχουν υποστεί αποσιώπηση της πρωτεΐνης TMEM97 και έχουν επωαστεί με 0.1μM Σιραμεσίνης το ποσοστό δημιουργίας αποικιών είναι της τάξης του 100%, χωρίς να έχει μειωθεί σε σχέση με τα untreated, το ίδιο ισχύει και με τα δείγματα στα οποία έχει συμβεί αποσιώπηση και των δύο πρωτεϊνών, καθώς και στα δείγματα που έχουν επιμολυνθεί με scramble siRNA, ενώ στα δείγματα με siRNA PGRMC1 το ποσοστό είναι 50%, με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα untreated ($p<0.001$). Στη συγκέντρωση 1μM στα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί αποσιώπηση η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες είναι 39% με $p<0.001$ σε σχέση με τα untreated, στα κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση της πρωτεΐνης TMEM97 και της PGRMC1 είναι 57% και 50% αντίστοιχα, στα κύτταρα με scramble siRNA το ποσοστό δημιουργίας αποικιών είναι 59%, όλα με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ($p<0.001$), ενώ με διπλή αποσιώπηση το ποσοστό είναι της τάξεως του 72%. Στη συγκέντρωση 10μM Σιραμεσίνης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ικανότητας δημιουργίας αποικιών σε όλα τα δείγματα με ποσοστό 0.04-0.05% ($p<0.001$) σε σχέση με τα δείγματα στα οποία δεν έχει συμβεί αποσιώπηση και επώαση με Σιραμεσίνη (untreated).

Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το παραπάνω διάγραμμα, στην εικόνα 3.5Α απεικονίζονται οι αποικίες των κυττάρων Attached, στα οποία έχει συμβεί αποσιώπηση του mRNA των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 με siRNA, καθώς και των κυττάρων που δεν έχουν επιμολυνθεί με siRNA και αυτών που έχουν επιμολυνθεί με scramble siRNA (negative control), χωρίς την παρουσία Σιραμεσίνης. Στα επιμολυσμένα κύτταρα με siRNA οι αποικίες έχουν εμφανώς μικρότερο μέγεθος σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν έχουν επιμολυνθεί (untreated). Στην Εικόνα 3.5 Β. απεικονίζονται οι ίδιες αποικίες, αυτή τη φορά παρουσία τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων Σιραμεσίνης (0,1μM, 1μM και 10μM). Είναι εμφανές ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας τόσο μειώνεται και ο αριθμός των αποικιών σε όλες τις περιπτώσεις σε σχέση με τα control απουσία Σιραμεσίνης στα οποία ο αριθμός των αποικιών είναι εμφανώς μεγαλύτερος.

A.



B.



Εικόνα 3.5: Α. Απεικόνιση αποικιών του πληθυσμού που δεν έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA (untreated), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με Scramble siRNA (siRNA αρνητικού ελέγχου), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA για τον υποδοχέα TMEM97 (siTMEM97), για τον PGRMC1 (siPGRMC1) και για τους δύο υποδοχείς μαζί (Double siRNA) σε στερεοσκόπιο. Β. Απεικόνιση αποικιών του πληθυσμού που δεν έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA παρουσία Σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10 μM (untreated), του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με Scramble siRNA (siRNA αρνητικού ελέγχου) παρουσία Σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10 μM , του πληθυσμού που έχει υποστεί αποσιώπηση με siRNA για τον υποδοχέα TMEM97 (siTMEM97), για τον PGRMC1 (siPGRMC1) και για τους δύο υποδοχείς μαζί (Double siRNA) παρουσία Σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 0.1, 1 και 10 μM για 48 ώρες σε στερεοσκόπιο.

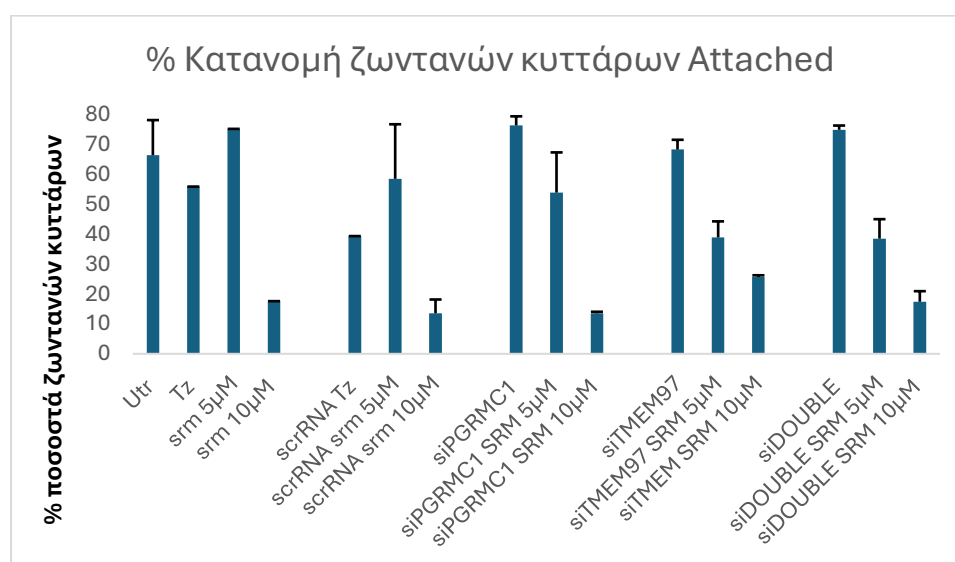
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

3.5.1. Η επίδραση της αποσιώπησης των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1 και της Σιραμεσίνης στον κυτταρικό κύκλο σε κύτταρα Attached

Η μέθοδος η οποία προαναφέρθηκε στην ενότητα 2.6.2 πραγματοποιήθηκε με σκοπό να προσδιοριστεί αν τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached, ύστερα από τη αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες TMEM97 και PGRMC1 και επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης, παρουσιάζουν αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί κάποια τροποποίηση ή εκείνα που έχουν επιμολυνθεί με Scramble siRNA.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 3.5) απεικονίζεται το πλήθος των ζωντανών κυττάρων, έπειτα από επώαση με siRNA για 72 ώρες και στη συνέχεια επώαση με Σιραμεσίνη για 48 ακόμη ώρες σε σύγκριση με το πλήθος των ζωντανών κυττάρων χωρίς καμία τροποποίηση και απουσία Σιραμεσίνης (Untreated). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στα Untreated κύτταρα είναι της τάξεως του 66.4%, ενώ στον χρόνο μηδέν (Tz), την στιγμή δηλαδή που ξεκίνησε η επώαση με Σιραμεσίνη τα ζωντανά ήταν περίπου 60% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων. Μετά από επώαση με 5 μM Σιραμεσίνης, χωρίς αποσιώπηση με siRNA, τα ζωντανά κύτταρα ήταν 75.2%, ενώ με 10 μM 17.6%. Όσον αφορά στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με Scramble siRNA, παρατηρήθηκε ότι τα ζωντανά

κύτταρα, απουσία Σιραμεσίνης ήταν της τάξεως του 39%, ενώ μετά από επώαση με 5μM Σιραμεσίνης στο 58.5%, ωστόσο και σε αυτήν την περίπτωση επώαση με 10μM Σιραμεσίνης με το ποσοστό των ζωντανών έφτασε να είναι 13.5%. Ακολούθως, στα κύτταρα που έχουν υποστεί επιμόλυνση με siPGRMC1, απουσία Σιραμεσίνης, παρατηρείται ότι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων είναι της τάξεως του 76.3%, ενώ παρουσία Σιραμεσίνης 5μM μειώνεται στο 54% και παρουσία 10μM μειώνεται περαιτέρω στο 13.5%. Παρόμοια ποσοστά παρατηρούνται και στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με siRNA TMEM97 με ποσοστό, απουσία Σιραμεσίνης, 68.3%, παρουσία 5μM 39% και 10μM Σιραμεσίνης 25.7%, ενώ στα κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση και των δύο υποδοχέων (TMEM97 και PGRMC1) το ποσοστό ζωντανών κυττάρων, απουσία Σιραμεσίνης είναι 75%, παρουσία 5μM μειώνεται στο 38.5% και με 10μM Σιραμεσίνης στο 17.4%. Επομένως, στα κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της Σιραμεσίνης, τόσο μειώνεται το πλήθος των ζωντανών κυττάρων.



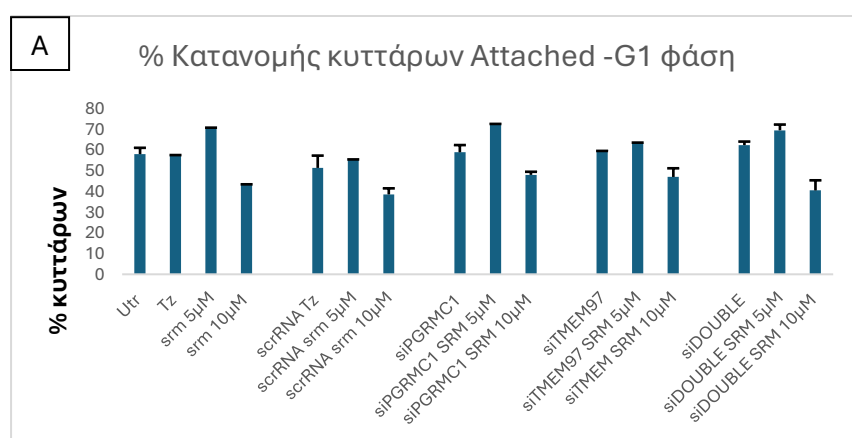
Γράφημα 3.5: Ραβδόγραμμα που προέκυψε ύστερα από ανάλυση της κυτταρομετρίας και απεικονίζει την κατανομή των ζωντανών κυττάρων συνολικά, σε κύτταρα ελέγχου χωρίς επιμόλυνση με siRNA (utr, untreated) και σε κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με siRNA scrambled (αρνητικό δείγμα ελέγχου), siRNA στον υποδοχέα PGRMC1 (siPGRMC1), με SiRNA στον υποδοχέα TMEM97 (siTMEM97) και siRNA Double, καθώς και σε κύτταρα που έχουν επωαστεί για 48 ώρες με 5 και 10μM. [(Tz: η στιγμή μηδέν όταν ξεκίνησε η επώαση με Σιραμεσίνη, SRM 5μM και 10μM: Κύτταρα που έχουν επωαστεί 48ώρες με Σιραμεσίνη, χωρίς αποσιώπηση, scrRNA SRM 5μM και 10μM: siRNA Scrambled(αρνητικό δείγμα ελέγχου) ύστερα από 48 ώρες επώασης με την Σιραμεσίνη, siTMEM97 και siPGRMC1 SRM 5μM και 10μM: siRNA στον TMEM97 και στον PGRMC1 αντίστοιχα, ύστερα από 48 ώρες επώασης με την Σιραμεσίνη, siDOUBLE 5μM και 10μM SRM: siRNA του συνδιασμού των υποδοχέων TMEM97 & PGRMC1 ύστερα από 48 ώρες επώασης με την Σιραμεσίνη)]

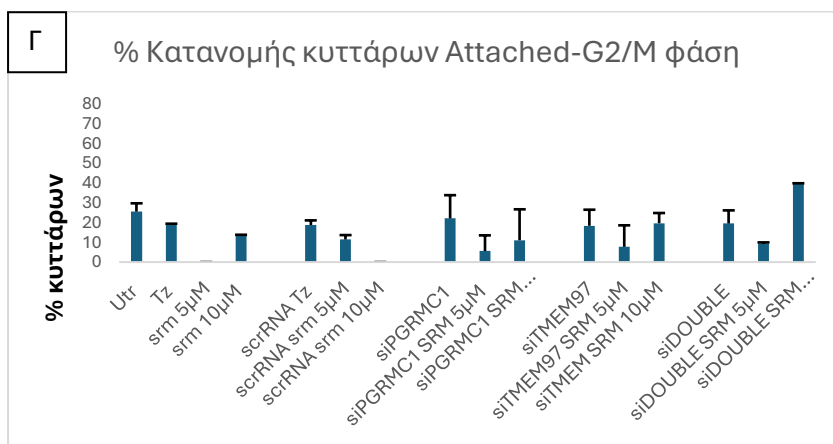
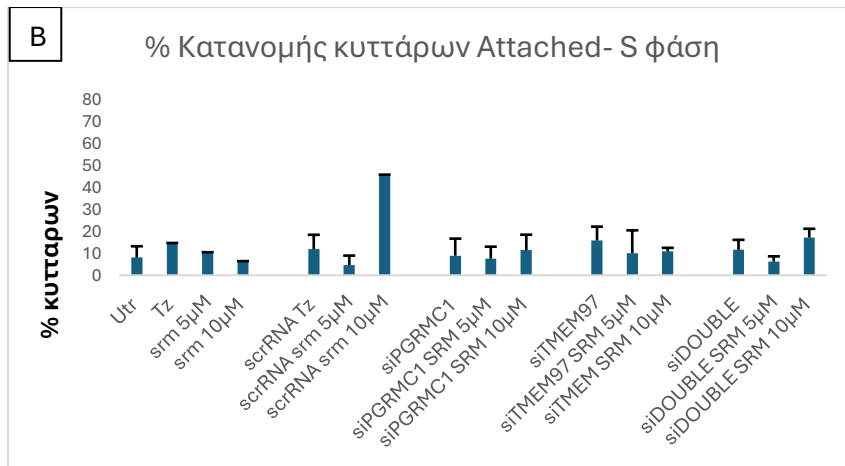
Στα επόμενα γραφήματα απεικονίζεται το πλήθος των ζωντανών κυττάρων που βρίσκονται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, S και G2/M φάσεις), έπειτα από επώαση με siRNA για 72 ώρες και στη συνέχεια επώαση με Σιραμεσίνη για 48 ακόμη ώρες σε σύγκριση με το πλήθος των κυττάρων χωρίς καμία τροποποίηση και απουσία Σιραμεσίνης (Untreated).

Πιο ειδικά, αναφορικά με το γράφημα 3.6 (Α.) που αναφέρεται συγκεκριμένα στον αριθμό των κυττάρων που είναι κατανεμημένα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου,

βλέπουμε ότι το ποσοστό των κυττάρων ελέγχου χωρίς επώαση με Σιραμεσίνη στις 48 ώρες (untreated, utr), καθώς και των κυττάρων που δεν έχουν επωαστεί με Σιραμεσίνη τη στιγμή μηδέν (Tz) στην φάση G1 (Γράφημα 3.6 Α.), είναι 58% και στις δύο περιπτώσεις, μετά από επώαση με 5μM Σιραμεσίνης είναι 71% ενώ με 10μM μειώνεται στο 43%. Στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με Scramble siRNA το πλήθος των κυττάρων στην G1 φάση είναι της τάξεως του 51.3%. Το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και έχουν επιμολυνθεί με siRNA TMEM97, είναι περίπου 60%, το ίδιο ισχύει και στα κύτταρα με siRNA PGRMC1, στα κύτταρα με διπλή αποσιώπηση (siDouble), στην G1 φάση βρίσκεται το 62% . Μετά από επώαση με 5μM Σιραμεσίνης, το ποσοστό των κυττάρων με Scramble siRNA που βρίσκονται στην G1 είναι 55%, με siTMEM97 είναι 63.5%, με siPGRMC1 72% και με siDouble σχεδόν 70%. Όσον αφορά στην συγκέντρωση 10μM τα κύτταρα με Scramble siRNA στην G1 μειώνονται με ποσοστό 38%, με siTMEM97 και με siPGRMC1 μειώνονται στο 50%, με siDouble το ποσοστό είναι της τάξεως του 40%.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.6 (Β.) που αναφέρεται συγκεκριμένα στον αριθμό των κυττάρων που είναι κατανεμημένα στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα ποσοστά είναι παρόμοια και εμφανώς μειωμένα. Κυμαίνονται μεταξύ 5-15%, με εξαίρεση το πλήθος των κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί με Scramble siRNA και επωαστεί με 10μM Σιραμεσίνης, που φαίνεται ότι σχεδόν τα μισά κύτταρα βρίσκονται στην φάση S (46%). Στην φάση G2/M, όπως φαίνεται από το γράφημα 3.6 (Γ.), το πλήθος των κυττάρων και εδώ φαίνεται να είναι μειωμένο, με τα untreated να είναι σε ποσοστό 25,5%, στις υπόλοιπες περιπτώσεις να είναι μικρότερα από 22%, με τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με συγκέντρωση 5μM Σιραμεσίνης να έχουν τα χαμηλότερα ποσοστά (0-11%). Εξαίρεση αποτελεί το πλήθος των κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί με Double siRNA, με ποσοστό περίπου 40%.

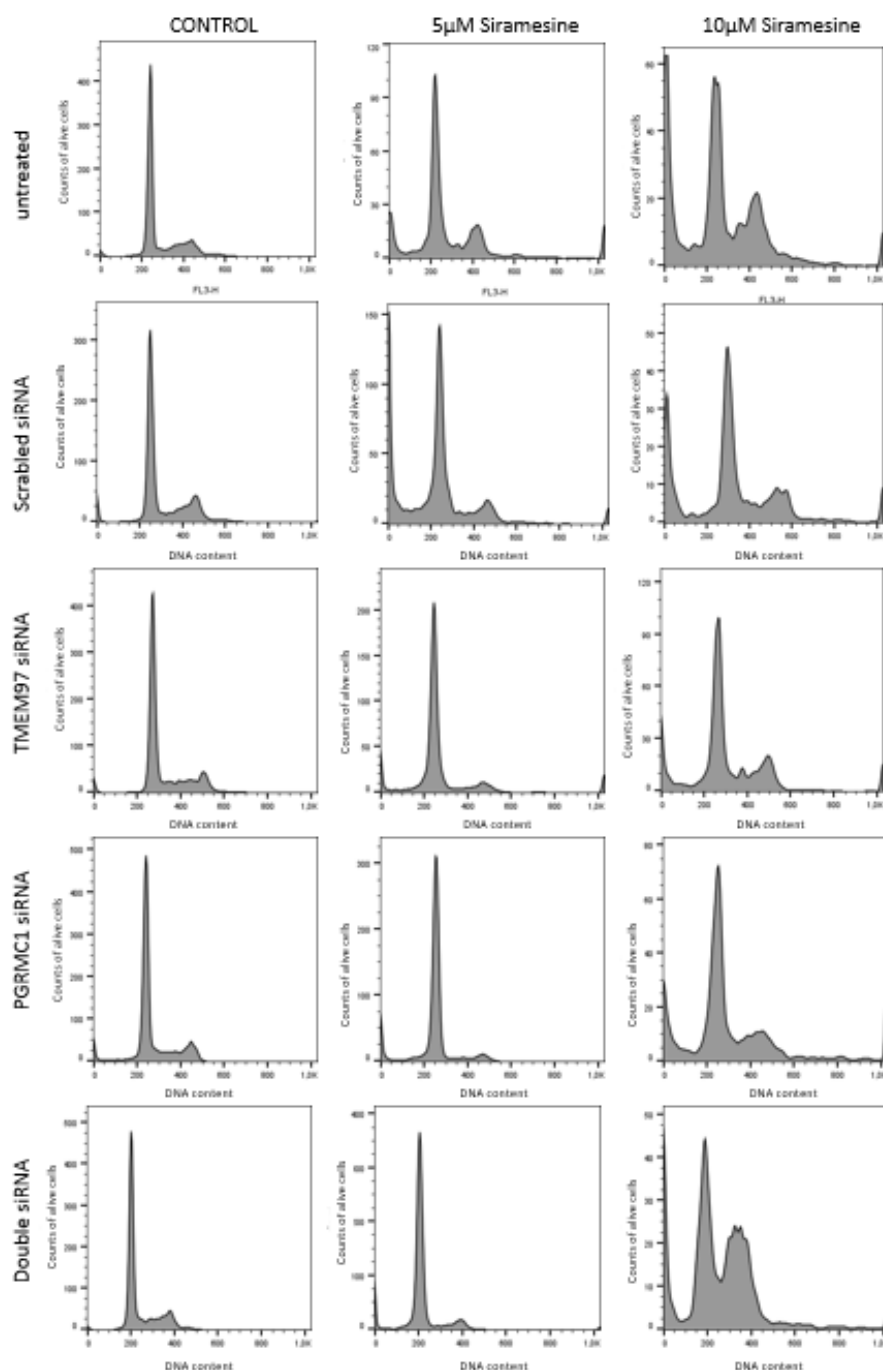




Γράφημα 3.6: Ραβδογράμματα που απεικονίζουν την κατανομή στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου από τα κύτταρα ελέγχου χωρίς επιμόλυνση με siRNA (utr, untreated) και τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με siRNA scrambled (αρνητικό δείγμα ελέγχου), siRNA στον υποδοχέα PGRMC1 (siPGRMC1), με siRNA στον υποδοχέα TMEM97 (siTMEM97) και siRNA Double, καθώς και από τα κύτταρα που έχουν επωαστεί για 48 ώρες με 5 και 10µM Σιραμεσίνη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής. (A: κατανομή κυττάρων στην φάση G1, B: στην φάση S και Γ: στην φάση G2/M) [Tz: η στιγμή μηδέν όταν ξεκίνησε η επώαση με Σιραμεσίνη, SRM 5µM και 10µM: Κύτταρα που έχουν επωαστεί 48ώρες με Σιραμεσίνη, χωρίς αποσιώπηση, scrRNA SRM 5µM και 10µM: siRNA Scrambled(αρνητικό δείγμα ελέγχου) ύστερα από 48 ώρες επώασης με την Σιραμεσίνη, siTMEM97 και siPGRMC1 SRM 5µM και 10µM: siRNA στον TMEM97 και στον PGRMC1 αντίστοιχα, ύστερα από 48 ώρες επώασης με την Σιραμεσίνη, siDOUBLE 5µM και 10µM SRM: siRNA του συνδιασμού των υποδοχέων TMEM97 & PGRMC1 ύστερα από 48 ώρες επώασης με την Σιραμεσίνη)]

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω ραβδογραμμάτων, τα αποτελέσματα αναφορικά με την κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου αναπαρίσταται και σε ιστογράμματα (Εικόνα 3.6), που αποτελούν οπτική απεικόνιση των παραπάνω γραφημάτων και παρουσιάζεται η κατανομή των κυττάρων στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, δηλαδή για τα κύτταρα Attached μετά από 72 ώρες επώασης με siRNA (Scramble και siRNA για την TMEM97 και PGRMC1 και του συνδιασμού τους) και επιπλέον 48 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης (5 & 10 µM). Όπως αναλύθηκε και στην ενότητα 6 του κεφαλαίου 2, 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. Στην αρχή του ιστογράμματος στα αριστερά της G1 φάσης αναπαρίστανται τα νεκρά κύτταρα.



Εικόνα 3.6: Ιστογράμματα που απεικονίζουν την κατανομή στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου από τα κύτταρα ελέγχου χωρίς επιμόλυνση με siRNA (utr, untreated) και τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με siRNA scrambled (αρνητικό δείγμα ελέγχου), siRNA στον υποδοχέα PGRMC1 (siPGRMC1), με siRNA στον υποδοχέα TMEM97 (siTMEM97) και siRNA Double, καθώς και από τα κύτταρα που έχουν επωαστεί για 48 ώρες με 5 και 10μM Σιραμεσίνη, μετά από ανάλυση μέσω του προγράμματος ModFit Έκδοση 5. (Άξονας X: περιεχόμενο DNA. Άξονας Y: αριθμός των κυττάρων).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του παγκρέατος απασχολεί εκτενώς την επιστημονική κοινότητα λόγω της όλο και αυξανόμενης εμφάνισής του και της υψηλής θνησιμότητάς του, εξ' αιτίας της μη έγκαιρης διάγνωσης και της εξαιρετικά έντονης μεταστατικής του ιδιότητας. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών είναι 6 μήνες, ενώ ποσοστό μικρότερο του 10% των ασθενών επιβιώνει έως και τα 5 έτη (Roy and Saikia 2016).

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην μελέτη του ρόλου της αποσιώπησης της πρωτεΐνης TMEM97 στην ανάπτυξη παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή έχει χαρακτηριστεί ως σίγμα-2 υποδοχέας (Alon et al., 2017) και στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε προσπάθεια εύρεσης της επίδρασης που έχει η αποσιώπησή της, καθώς και η αποσιώπηση μίας άλλης πρωτεΐνης, της PGRMC1, που σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι σχηματίζει σύμπλοκο με τον TMEM97 και δρα ως σύμπλοκο με αυτήν (Riad et al., 2018), στην καρκινογένεση του καρκίνου του παγκρέατος, μέσα από μια σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν (Lizama et al., 2023).

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης των πρωτεϊνών με μία ενδογενή κυτταρική διεργασία που ονομάζεται παρεμβολή του RNA (RNA interference, RNAi) όπου μέσω επιμόλυνσης με ένα ειδικό siRNA για το mRNA της εκάστοτε πρωτεΐνης, επιτεύχθηκε η αποσιώπηση αυτών στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα Attached. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν έναν πρωτογενή κυτταρικό πληθυσμό, ο οποίος απομονώθηκε απευθείας από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος, έπειτα από χειρουργική εκτομή και εγκαθιδρύθηκε για πρώτη φορά από το Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Η επιτυχία της αποσιώπησης της πρωτεΐνης TMEM97 ελέγχθηκε μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η επιμόλυνση με siRNA οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης TMEM97, μετά από 72 ώρες επώασης σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της στα κύτταρα χωρίς επιμόλυνση με siRNA. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι το silencing μέσω siRNA είναι αποτελεσματικό στη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης TMEM97. Στη συνέχεια των πειραμάτων, τα επιμολυσμένα με siRNA κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την δυνατότητα τους να δημιουργούν αποικίες (clonogenic assay). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων κλωνογένεσης, η αποσιώπηση της TMEM97 από μόνη της δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση στη δημιουργία αποικιών. Ακολούθως, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε μία διαδικασία που ονομάζεται κυτταρομετρία ροής ώστε να ελεγχθεί ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζει η αποσιώπηση του υποδοχέα τον κυτταρικό κύκλο. Όσον αφορά στην επίδραση της αποσιώπησης του υποδοχέα TMEM97 στον κυτταρικό κύκλο, παρατηρείται ότι τα κύτταρα με siRNA TMEM97 έχουν παρόμοια τάση με αυτή των untreated κυττάρων, με τα κύτταρα που έχουν αποσιωπηθεί να δείχνουν ελαφρώς μικρότερο ποσοστό στην G1 φάση σε σχέση με τα Untreated. Μέχρι τώρα η διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με την αποσιώπηση του TMEM97 στους διάφορους τύπους καρκίνου είναι περιορισμένη, χωρίς καμία αναφορά σε παγκρεατικό καρκίνο, ωστόσο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η πρωτεΐνη TMEM97 εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Πιο αναλυτικά, μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2022 με σκοπό την κατανόηση του ρόλου της

TMEM97 στην προώθηση της καρκινογένεσης και της εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, έδειξε ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC), η TMEM97 βρέθηκε να είναι υπερεκφρασμένη και η αυξημένη έκφρασή της συνδέεται με την ενεργοποίηση της οδού GSK-3β/β-catenin, αυξάνοντας τα επίπεδα της β-κατενίνης, μιας πρωτεΐνης που ενεργοποιεί γονίδια προώθησης της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού, ενισχύοντας η TMEM97 με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τη μετανάστευση και τη μετάσταση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναστολή της TMEM97 ή η παρέμβαση στη σηματοδοτική οδό GSK-3β/β-catenin θα μπορούσε να αποτελέσει μια νέα θεραπευτική στρατηγική για την καταστολή του καρκίνου του παχέος εντέρου (Mao et al., 2022). Την ίδια χρονιά πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό να εξεταστεί ο ρόλος της πρωτεΐνης TMEM97 (MAC30) στον καρκίνο του ρινοφάρυγγα και πώς η αναστολή της επηρεάζει την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω της εμπλοκής της και πάλι στο μονοπάτι Akt/GSK-3β/β-catenin και έδειξε ότι η αναστολή της MAC30 οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, αύξηση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και μείωση της μετανάστευσης και της διεισδυτικότητας των καρκινικών κυττάρων (Zhang et al., 2022), κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Όσον αφορά στον υποδοχέα PGRMC1, όπως και στην περίπτωση του TMEM97, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησής του, μέσω siRNA και στη συνέχεια, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot, διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα ήταν εμφανώς μειωμένα μετά από επιμόλυνση με siRNA και επώαση για 72 ώρες, σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα, χωρίς να έχει υποστεί αποσιώπηση. Σε ό,τι αφορά στην δυνατότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες (clonogenic assay), σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων κλωνογένεσης, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης PGRMC1 με siRNA δείχνει να έχει σημαντική επίδραση στη μείωση της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν αποικίες, καθώς το ποσοστό δημιουργίας κλώνων μειώνεται κατά πολύ σε σχέση με αυτό των Untreated, που δεν έχουν επιμολυνθεί με siRNA ($p < 0.001$). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της επίδρασης της αποσιώπησης στον κυτταρικό κύκλο, παρατηρείται ότι και στην περίπτωση του υποδοχέα PGRMC1 τα κύτταρα με siRNA έχουν παρόμοια τάση με αυτή των Untreated κυττάρων, με ελαφρώς μικρότερο ποσοστό στην G1 φάση σε σχέση με τα Untreated. Επομένως, δεν φαίνεται να επηρεάζει ούτε η αποσιώπηση του υποδοχέα PGRMC1 τον κυτταρικό κύκλο. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία διάφορες μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τον ρόλο της αποσιώπησης του υποδοχέα PGRMC1 στον καρκίνο, αλλά χωρίς καμία αναφορά στον παγκρεατικό καρκίνο. Ενδεικτικά μία πρόσφατη μελέτη που έλαβε χώρα το 2023 από την ερευνητική ομάδα του Zhao Y., με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση της πρωτεΐνης PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) στην ανάπτυξη του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (Triple-Negative Breast Cancer, TNBC), ενός ιδιαίτερα επιθετικού τύπου καρκίνου του μαστού, έδειξε ότι η PGRMC1 προωθεί την ανάπτυξη των κυττάρων του TNBC μέσω της καταστολής της φερόπτωσης, ενώ με μείωση των επιπέδων ή αναστολή της PGRMC1, τα κύτταρα οδηγούνταν τελικά στον κυτταρικό θάνατο μέσω φερόπτωσης. Επομένως, η PGRMC1 φαίνεται να προωθεί την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Zhao et al., 2023). Μία ακόμη μελέτη πραγματοποιήθηκε το 2021 με σκοπό να εξεταστεί ο ρόλος της πρωτεΐνης PGRMC1

στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Hepatocellular Carcinoma, HCC), καθώς και οι επιδράσεις που έχει η απώλεια αυτής της πρωτεΐνης στην καρκινική ανάπτυξη, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η απώλεια της PGRMC1 έχει προστατευτική επίδραση κατά της ανάπτυξης του καρκίνου του ήπατος, επομένως η PGRMC1 σχετίζεται με την καρκινογένεση (Lee et al., 2021).

Οι παραπάνω μελέτες έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας. Ωστόσο, δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία μέχρι τώρα που να αναφέρεται στον ρόλο της αποσιώπησης των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 στον παγκρεατικό καρκίνο και συγκεκριμένα σε πρωτογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς που μελετήσαμε στην εργασία αυτή, κάτι που αποτελεί παγκόσμια καινοτομία και δείχνει πως απαιτεί μελλοντική διερεύνηση για πιο σαφή συμπεράσματα.

Ακολουθώντας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μέσω Western Blot, στα οποία μελετήθηκε η ταυτόχρονη αποσιώπηση των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1, τα επίπεδα έκφρασής τους βρέθηκαν μειωμένα, αλλά στην συγκεκριμένη περίπτωση η έκφραση ήταν ενδιάμεση, συγκριτικά με την αποσιώπηση του κάθε υποδοχέα ξεχωριστά. Η ταυτόχρονη αποσιώπηση και των δύο πρωτεϊνών (TMEM97 και PGRMC1) δεν φαίνεται να αναστέλλει την ικανότητα των κυττάρων Attached να δημιουργούν κλώνους, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων κλωνογένεσης, επίσης, δεν φαίνεται να επηρεάζει την κατανομή των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα με αλλαγές στον τρόπο αποσιώπησης, πιθανώς χωρίς ταυτόχρονη επώαση με siRNA, αλλά με χρονική διαφορά της αποσιώπησης του ενός υποδοχέα σε σχέση με την αποσιώπηση του άλλου.

Σε συνέχεια των πειραμάτων, τα κύτταρα Attached επώαστηκαν με τον σίγμα-2 προσδότη- αγωνιστή Σιραμεσίνη και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Western Blot, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του TMEM97 απουσία Σιραμεσίνης και παρουσία 5μM Σιραμεσίνης, το ίδιο ισχύει και με την έκφραση του PGRMC1, επομένως η δράση της Σιραμεσίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων ελέγχου κυτταροτοξικότητας της Σιραμεσίνης προέκυψε ότι η δράση της συγκεκριμένης ουσίας δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την αποσιώπηση των υποδοχέων, καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης μεταξύ των κυττάρων που έχουν υποστεί αποσιώπηση σε σύγκριση με τα Untreated δεν παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές ως προς την δράση της Σιραμεσίνης. Προέκυψε δηλαδή ότι, η σιραμεσίνη έχει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση στην κυτταρική σειρά Attached, με τη δράση της να ενισχύεται με την αύξηση της συγκέντρωσής της. Όσον αφορά στη δράση της Σιραμεσίνης στην κλωνογένεση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του clonogenic assay, προέκυψε ότι δρα ανασταλτικά στη δημιουργία κλώνων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ωστόσο και σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται να δρα ανεξάρτητα από τους υποδοχείς, καθώς δεν φαίνεται να υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων που έχουν επιμολυνθεί με siRNA και των Untreated. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, η Σιραμεσίνη φαίνεται να προκαλεί κυτταρικό θάνατο, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις, επίσης στην υψηλή συγκέντρωση (10μM) παρατηρείται μία μείωση των κυττάρων που βρίσκονται στην G1 φάση και μία αύξηση αυτών στις φάσεις S και

G2/M, αλλά και σε αυτήν την περίπτωση η Σιραμεσίνη φαίνεται να δρα ανεξάρτητα από του υποδοχείς TMEM97 και PGRMC1.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αφορά στον υποδοχέα TMEM97, αν και η αποσιώπησή του φαίνεται να μειώνει σημαντικά την έκφρασή του, δεν φαίνεται να επηρεάζει ουσιαστικά την ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες ούτε τον κυτταρικό κύκλο. Η αποσιώπηση του υποδοχέα PGRMC1 δεν φαίνεται να επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, ωστόσο φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη μείωση της ικανότητας δημιουργίας αποικιών, υποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας PGRMC1 παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην ογκογένεση σε σχέση με τον TMEM97. για πιο σαφή αποτελέσματα όμως κρίνεται απαραίτητη η διεκπεραίωση περισσότερων πειραμάτων. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή περαιτέρω και πιο λεπτομερών μελετών στο μέλλον, με σκοπό την πλήρη κατανόηση του ρόλου της πρωτεΐνης TMEM97 και της PGRMC1 στην καρκινογένεση και ειδικά στον παγκρεατικό καρκίνο και τη διερεύνηση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Αναφορικά με την Σιραμεσίνη, ως σίγμα-2 προσδέτης-αγωνιστής, παρουσιάζει αξιοσημείωτη δόσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δράση έναντι των πρωτογενών καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος Attached, καθιστώντας την πιθανό εργαλείο για την αναστολή της καρκινογένεσης στον παγκρεατικό καρκίνο, ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται να δρα ανεξάρτητα από την αποσιώπηση των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1, όπως επιβεβαιώνεται από όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μελέτης αυτής. Αυτό υποδηλώνει ότι η Σιραμεσίνη δεν δρα αποκλειστικά μέσω των υποδοχέων TMEM97 και PGRMC1, κάτι που θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ενδιαφέρον πεδίο για μελλοντική μελέτη του μηχανισμού δράσης της ουσίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Abatematteo, Francesca Serena, Mauro Niso, Enza Lacivita, and Carmen Abate. 2021. "Molecules Review σ 2 Receptor and Its Role in Cancer with Focus on a MultiTarget Directed Ligand (MTDL) Approach." <https://doi.org/10.3390/molecules26123743>.
- Adamska, Aleksandra, Alice Domenichini, and Marco Falasca. "Molecular Sciences Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies." www.mdpi.com/journal/ijms.
- Ahmed, I. S., Chamberlain, C., & Craven, R. J. (2012). S2R(Pgrmc1): the cytochrome-related sigma-2 receptor that regulates lipid and drug metabolism and hormone signaling. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. <http://doi.org/10.1517/17425255.2012.658367>
- Alberts B., Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, 2η έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2006.

- Alon A, Schmidt HR, Wood MD, Sahn JJ, Martin SF, Kruse AC. Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jul 3;114(27):7160-7165. doi: 10.1073/pnas.1705154114. Epub 2017 May 30. PMID: 28559337; PMCID: PMC5502638.
- Alon, A.; Schmidt, H.R.; Wood, M.D.; Sahn, J.J.; Martin, S.F.; Kruse, A.C. Identification of the gene that codes for the sigma2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, 114, 7160–7165
- Ansari, Daniel et al. 2014. “Pancreaticoduodenectomy--the Transition from a Low- to a High-Volume Center.” *Scandinavian journal of gastroenterology* 49(4): 481–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24255988/> (January 31, 2022).
- 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>
- Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM, Pantazis P. *Phytomedicine*. 2007 Apr;14(4):263-72. doi: 10.1016/j.phymed.2006.03.009. Epub 2006 May 18. PMID: 16713222.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363-6. doi: 10.1038/35053110. PMID: 11201747.
- Brierley, James. 2006. “The Evolving TNM Cancer Staging System: An Essential Component of Cancer Care.” *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* 174(2): 155. [/pmc/articles/PMC1329448/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16329448/) (February 5, 2022).
- 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>
- Chin, Venessa et al. 2018. “Chemotherapy and Radiotherapy for Advanced Pancreatic Cancer.” *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018(3). [/pmc/articles/PMC6494171/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30494171/) (February 5, 2022).
- Chu, Uyen B. et al. 2015. “The Sigma-2 Receptor and Progesterone Receptor Membrane Component 1 Are Different Binding Sites Derived From Independent Genes.” *EBioMedicine* 2(11): 1806–13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26870805/> (January 22, 2022).
- 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>
- Colabufo, N. A., Berardi, F., Abate, C., Contino, M., Niso, M., & Perrone, R. (2006). Sigma2 receptors: Chemistry, role in the (patho)physiology of tumor cells, and prospects in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 13(27), 3165-3185.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach* 2nd Edition.

In Sinauer Associates.

- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. *Methods*. 2004 Jun;33(2):95-103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023. PMID: 15121163.
- Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*. 2017 Jun;13(2):48-57. PMID: 28824341; PMCID: PMC5542916.
- Darzynkiewicz, Zbigniew, Elzbieta Bedner, and Piotr Smolewski. 2001. "Flow Cytometry in Analysis of Cell Cycle and Apoptosis." *Seminars in hematology* 38(2): 179–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11309699/> (January 31, 2022).
- DG Lambert, Drugs and receptors, Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, Volume 4, Issue 6, December 2004, Pages 181–184, <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkh049>
- Dhar, Puneet, S Kalghatgi, and Vivek Saraf. "Pancreatic Cancer in Chronic Pancreatitis."
- Ercan, Gulinnaz, Ayfer Karlitepe, and Bulent Ozpolat. 2017. "Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches." *Anticancer research* 37(6): 2761–75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28551612/> (November 21, 2021)
- 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>
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*.
- 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>
- Georgiadis, Markos-Orestis, Olga Karoutzou Id, Angeliki-Sofia Foscolos, and Ioannis Papanastasiou. "Molecules Sigma Receptor (Σ R) Ligands with Antiproliferative and Anticancer Activity." www.mdpi.com/journal/molecules.
- Givan, Alice L. 2011. "Flow Cytometry: An Introduction." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 699: 1–29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21116976/> (January 31, 2022).
- Global Cancer Observatory (iarc.fr) GLOBOCAN 2022: New Global Cancer Data | UICC. (n.d.). <https://www.uicc.org/news/globocan-2022-new-global-cancer-data>
- Golan, D. E., Tashjan, A. H., Armstrong, E. J., & Armstrong, A. W. (2012). Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. *Pediatric Clinics*

- of North America, 58, 472.
- Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2015;16(14):5619-24.
- 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>
- Hafner, M et al. 2013. “Siramesine Triggers Cell Death through Destabilisation of Mitochondria, but Not Lysosomes.” Cell Death and Disease 4. www.nature.com/cddis.
- Haglund, C., J. Lundin, P. Kuusela, and P. J. Roberts. 1994. “CA 242, a New Tumour Marker for Pancreatic Cancer: A Comparison with CA 19-9, CA 50 and CEA.” British journal of cancer 70(3): 487–92. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8080735/> (January 3, 2022).
- Hajj, Carla, and Karyn A. Goodman. 2015. “Pancreatic Cancer and SBRT: A New Potential Option?” Reports of Practical Oncology and Radiotherapy 20(5): 377–84. <https://journals.viamedica.pl/rpor/article/view/73642> (January 3, 2022).
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- <http://doi.org/10.1016/j.pcl.2010.10.005>
- http://www.aacr.org/Documents/Landmarks_in_Cancer_Research_2007.pdf
- 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>
- Huang, Y. S., Lu, H. L., Zhang, L. J., & Wu, Z. (2014). Sigma-2 Receptor Ligands and Their Perspectives in Cancer Diagnosis and Therapy. Medicinal Research Reviews, 34(3), 532–566. <http://doi.org/10.1002/med.21297>
- James K Pru, Pleiotropic Actions of PGRMC Proteins in Cancer, Endocrinology, Volume 163, Issue 7, July 2022, bqac078, <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac078>
- 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>
- Karpozilos A, Pavlidis N (September 2004). "The treatment of cancer in Greek antiquity". *European Journal of Cancer*. 40 (14): 2033–2040.
- Kayed, H.; Kleeff, J.; Ding, J.; Hammer, J.; Giese, T.; Zentgraf, H.; Buchler, M.W.; Friess, H. Expression analysis of MAC30 in human pancreatic cancer and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol. Histopathol.* 2004, 19, 1021–1031
- 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>.
- Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16022.
- Knudson, A.G. Cancer genetics. *Am. J. Med. Genet.* 111. 96J02 (2002).
- Landi, Stefano. 2009. "Genetic Predisposition and Environmental Risk Factors to Pancreatic Cancer: A Review of the Literature." *Mutation research* 681(2–3): 299–307. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19150414/> (February 22, 2022).
- Lee SR, Lee JG, Heo JH, Jo SL, Ryu J, Kim G, Yon JM, Lee MS, Lee GS, An BS, Shin HJ, Woo DC, Baek IJ, Hong EJ. Loss of PGRMC1 Delays the Progression of Hepatocellular Carcinoma via Suppression of Pro-Inflammatory Immune Responses. *Cancers (Basel)*. 2021 May 18;13(10):2438. doi: 10.3390/cancers13102438. PMID: 34069911; PMCID: PMC8157610.
- Lipton, S. (2004). Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), 101–10. <http://doi.org/10.1602/neurorx.1.1.101>
- Lizama, B.N.; Kahle, J.; Catalano, S.M.; Caggiano, A.O.; Grundman, M.; Hamby, M.E. Sigma-2 Receptors—From Basic Biology to Therapeutic Target: A Focus on Age-Related Degenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 6251. <https://doi.org/10.3390/ijms24076251>
- Ma, S, E S Henson, Y Chen, and S B Gibson. 2016. "Ferroptosis Is Induced Following Siramesine and Lapatinib Treatment of Breast Cancer Cells." *Cell Death and Disease* 7. www.nature.com/cddis.
- Mao D, Zhang X, Wang Z, Xu G, Zhang Y. TMEM97 is transcriptionally activated by YY1 and promotes colorectal cancer progression via the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Hum Cell*. 2022 Sep;35(5):1535-1546. doi: 10.1007/s13577-022-00759-5. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35907137.
- Marrelli, Daniele et al. 2009. "CA19-9 Serum Levels in Obstructive Jaundice: Clinical Value in Benign and Malignant Conditions." *American journal of surgery* 198(3): 333–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19375064/> (January 3, 2022).
- Matsumoto, R. R., Bowen, W. D., & Su, T. P. (2007). Sigma receptors: Chemistry, cell biology and clinical implications. *Sigma Receptors: Chemistry, Cell Biology and Clinical Implications*. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-36514-5>

- Maurice, T., & Su, T. P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacology and Therapeutics*. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.07.001>
- Maurice, T., & Su, T. P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacology and Therapeutics*. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.07.001>
- McKinnon, Katherine M. 2018. "Flow Cytometry: An Overview." *Current protocols in immunology* 120: 5.1.1-5.1.11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29512141/> (January 31, 2022).
- Memba, Robert et al. 2017. "The Potential Role of Gut Microbiota in Pancreatic Disease: A Systematic Review." *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* ... [et al.] 17(6): 867–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935288/> (January 3, 2022).
- Meyer, C.; Schmid, R.; Scriba, P.C.; Wehling, M. Purification and Partial Sequencing of High-Affinity Progesterone-Binding Site(s) from Porcine Liver Membranes. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 1996, 239, 726–731.
- Mohammed, Somala, George Van Buren, William E Fisher, and William E Fish-Er. 2014. "Pancreatic Cancer: Advances in Treatment." *World J Gastroenterol* 20(28): 9354–60. <http://www.wjgnet.com/esps/HelpDesk>:<http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx:9354-9360>Availablefrom:URL:<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i28/9354.htm>DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>.
- 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>
- Motoi, Fuyuhiko, and Michiaki Unno. "Adjuvant and Neoadjuvant Treatment for Pancreatic Adenocarcinoma." *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2020(5): 483–89. <https://academic.oup.com/jjco/article/50/5/483/5742660>.
- Murphy, M.; Pykett, M.J.; Harnish, P.; Zang, K.D.; George, D.L. Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ.* 1993, 4, 715–722.
- Murray, Andrew. 1994. "Cell Cycle Checkpoints." *Current opinion in cell biology* 6(6): 872–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7880536/> (January 31, 2022).
- Nguyen, N.T.; Jaramillo-Martinez, V.; Mathew, M.; Suresh, V.V.; Sivaprakasam, S.; Bhutia, Y.D.; Ganapathy, V. Sigma Receptors: Novel Regulators of Iron/Heme

Homeostasis and Ferroptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 14672.
<https://doi.org/10.3390/ijms241914672>

- Ostenfeld MS, Høyer-Hansen M, Bastholm L, Fehrenbacher N, Olsen OD, Groth-Pedersen L, Puustinen P, Kirkegaard-Sørensen T, Nylandsted J, Farkas T, Jäättelä M. Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy*. 2008 May;4(4):487-99. doi: 10.4161/auto.5774. Epub 2008 Feb 22. PMID: 18305408.
- Ostenfeld, Marie Stampe, Nicole Fehrenbacher, Maria Hoyer-Hansen, et al. 2005. "Effective Tumor Cell Death by Sigma-2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress." *Cancer research* 65(19): 8975–83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204071/> (January 23, 2022).
- Ostenfeld, Marie Stampe, Nicole Fehrenbacher, Maria Høyer-Hansen, et al. 2005. "Effective Tumor Cell Death by S-2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress." www.aacrjournals.org.
- Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology*. 2008 Feb;149(2):534-43. doi: 10.1210/en.2007-1050. Epub 2007 Nov 8. PMID: 17991724; PMCID: PMC2219306.
- 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>
- Rao, J., Alshafie, S., Williams, D. C., & Rizzo, R. (2008). Characterization of the role of PGRMC1 in cellular cholesterol metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(3), 438-444. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.029.
- 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>
- Riad, Aladdin et al. 2018. "Sigma-2 Receptor/TMEM97 and PGRMC-1 Increase the Rate of Internalization of LDL by LDL Receptor through the Formation of a

- Ternary Complex.” Scientific reports 8(1).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30443021/> (January 23, 2022).
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458-61. doi: 10.1038/nprot.2006.238. PMID: 17406435.
- Sánchez, C., & Papp, M. (2000). The selective sigma2 ligand Lu 28-179 has an antidepressant-like profile in the rat chronic mild stress model of depression. *Behavioural Pharmacology*, 11, 117–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877116>
- 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.” *Veterinary pathology* 35(6): 461–78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9823588/> (January 31, 2022).
- Schnelldorfer, Thomas, and Michael G. Sarr. 2009. “Alessandro Codivilla and the First Pancreatoduodenectomy.” *Archives of Surgery* 144(12): 1179–84. <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/405587> (January 3, 2022).
- Sereti E, Tsimplouli C, Kalaitidou E, Sakellaris N, Dimas K. Study of the Relationship between Sigma Receptor Expression Levels and Some Common Sigma Ligand Activity in Cancer Using Human Cancer Cell Lines of the NCI-60 Cell Line Panel. *Biomedicines*. 2021 Jan 5;9(1):38. doi: 10.3390/biomedicines9010038. PMID: 33466391; PMCID: PMC7824900.
- Shukla, A. K., Grimster, N. P., & Sin, N. (2018). TMEM97, a sigma-2 receptor, regulates cholesterol homeostasis and is a potential pharmacological target in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 293(9), 3519-3530.
- Skandalakis, L.J. et al. (1993) ‘Surgical Embryology and Anatomy of the Pancreas’, *Surgical Clinics of North America*, 73(4), pp. 661–697. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(16\)46080-9](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(16)46080-9).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13). <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>
- Skuza, G. (2003). Potential antidepressant activity of sigma ligands. *Polish Journal of Pharmacology Pol. J. Pharmacol*, 55, 923–934. Retrieved from http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2003/6_923.pdf
- Skuza, G., & Rogóz, Z. (2006). The synergistic effect of selective sigma receptor agonists and uncompetitive NMDA receptor antagonists in the forced swim test in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 57(2), 217–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845227>
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1434-7. doi:

- 10.1126/science.1102514. Epub 2004 Jul 29. PMID: 15284453.
- Springfeld, Christoph et al. 2019. "Chemotherapy for Pancreatic Cancer." *La Presse Médicale* 48(3): e159–74.
- Stewart, B. W., Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. World Health Organization, 1–631. <http://doi.org/9283204298>
- 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>
- Takeda, Yoshinori et al. 2017. "Asymptomatic Pancreatic Cancer: Does Incidental Detection Impact Long-Term Outcomes?" *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 21(8): 1287–95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397027/> (February 5, 2022).
- Takeda, Yoshinori et al. 2017. "Asymptomatic Pancreatic Cancer: Does Incidental Detection Impact Long-Term Outcomes?" *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 21(8): 1287–95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397027/> (February 5, 2022).
- Tappia, P.S.; Ramjiawan, B. Biomarkers for Early Detection of Cancer: Molecular Aspects. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5272. <https://doi.org/10.3390/ijms24065272>
- Torphy, Robert J, Yuki Fujiwara, and Richard D Schulick. 2028. "Pancreatic Cancer Treatment: Better, but a Long Way to Go." *Surgery Today* 50: 1117–25. <https://doi.org/10.1007/s00595-020-02028-0>.
- 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>
- Unger, Keith et al. 2018. "Metabolomics Based Predictive Classifier for Early Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Oncotarget* 9(33): 23078. [/pmc/articles/PMC5955422/](https://pmc/articles/PMC5955422/) (January 3, 2022).
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. *The Genetic Basis of Human Cancer* (McGraw-Hill, Toronto, 2002).
- Wheeler, K., Wang, LM., Wallen, C. et al. Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *Br J Cancer* 82, 1223–1232 (2000). <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1067>
- Wyllie, D. J. A., & Chen, P. E. (2009). Taking The Time To Study Competitive Antagonism. *British Journal of Pharmacology*, 150(5), 541–551. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706997>

- Xu, Jinbin et al. 2011. "Identification of the PGRMC1 Protein Complex as the Putative Sigma-2 Receptor Binding Site." *Nature communications* 2(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21730960/> (January 22, 2022).
- 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, Yi et al. 2020. "Gut Microbiota: Its Potential Roles in Pancreatic Cancer." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org 10: 572492. www.frontiersin.org.
- Zeng, C.; Vangveravong, S.; Xu, J.; Chang, K.C.; Hotchkiss, R.S.; Wheeler, K.T.; Shen, D.; Zhuang, Z.P.; Kung, H.F.; Mach, R.H. Subcellular localization of sigma-2 receptors in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer Res.* 2007, 67, 6708–6716
- Zhang, Lulu, Santosh Sanagapalli, and Alina Stoita. 2018. "Challenges in Diagnosis of Pancreatic Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 24(19): 2047. [/pmc/articles/PMC5960811/](https://pmc/articles/PMC5960811/) (December 27, 2021).
- Zhang, Yan Bo et al. 2020. "Combined Lifestyle Factors, Incident Cancer, and Cancer Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies." *British journal of cancer* 122(7): 1085–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32037402/> (December 31, 2021).
- Zhang P, Tian Q, Gao H, Zhao A, Shao Y, Yang J. Inhibition of MAC30 exerts antitumor effects in nasopharyngeal carcinoma via affecting the Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022 Jul;36(7):e23061. doi: 10.1002/jbt.23061. Epub 2022 Apr 4. PMID: 35373413.
- Zhao Y, Ruan X, Cheng J, Xu X, Gu M, Mueck AO. PGRMC1 promotes triple-negative breast cancer cell growth via suppressing ferroptosis. *Climacteric.* 2023 Apr;26(2):135-142. doi: 10.1080/13697137.2023.2170225. Epub 2023 Feb 1. PMID: 36724820.