

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πτυχιακή εργασία
«Διερεύνηση του ρόλου των σ2 υποδοχέων
στην αντικαρκινική δράση της Σιραμεσίνης»

« Elucidation of the Role of Sigma-2 Receptors in the Anticancer Activity of
Siramesine»

Δημητρίου Μαρία-Χρηστίνα | Λάρισα 2025

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη στήριξη και την καθοδήγηση σημαντικών ανθρώπων, στους οποίους οφείλω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Τμήμα Φαρμακολογίας, για την πολύτιμη βοήθειά του, την αδιάκοπη καθοδήγηση και τη γνώση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Φανή Κουτσουγιάννη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της. Η Φανή με στήριξε και με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε συγγραφικό επίπεδο. Με ενέπνευσε, με πίστεψε, με βοήθησε να διορθωθώ και -τελικά- να αγαπήσω τον κλάδο της έρευνας και της Φαρμακολογίας. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και την αμέριστη στήριξή της. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Αλεξοπούλου, η οποία, όπως και η Φανή, με στήριξε τόσο πρακτικά όσο και ψυχολογικά κατά τη διάρκεια της εργασίας, προσφέροντάς μου καθοριστική βοήθεια και πολύτιμες συμβουλές.

Από καρδιάς, ευχαριστώ τους γονείς μου, που στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε βήμα αυτής της διαδρομής. Η αγάπη, η αφοσίωση και η αμέριστη στήριξή τους υπήρξαν το θεμέλιο πάνω στο οποίο στηρίχθηκα για να φτάσω έως εδώ. Ήταν -και είναι- εκεί για εμένα σε όλες τις δύσκολες στιγμές, γιόρτασαν μαζί μου κάθε μικρή ή μεγάλη επιτυχία και πίστεψαν σε εμένα με τρόπο που με έκανε -και ακόμα κάνει- να νιώθω δυνατή και ικανή να αντιμετωπίσω τα πάντα .

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στις φίλες μου, που αποτελούν την οικογένεια που έχω διαλέξει στη ζωή μου, τις αδερφές που δεν είχα, αλλά τελικά απέκτησα. Ήταν πάντα εκεί, στις καλές και στις δύσκολες στιγμές, με στήριζαν, με ενθάρρυναν και μοιράστηκαν μαζί μου χαρές και λύπες. Η παρουσία τους, η αγάπη και η αλληλεγγύη τους αποτέλεσαν για μένα πηγή δύναμης. Τέλος, ευχαριστώ τον σύντροφό μου, που στάθηκε δίπλα μου με κατανόηση, αγάπη και στήριξη σε όλη τη διάρκεια αυτής της διαδρομής. Η παρουσία του έκανε τα δύσκολα πιο εύκολα και τις επιτυχίες πιο σημαντικές.

Περίληψη

Ο παγκρεατικός καρκίνος ανήκει στις πλέον θανατηφόρες μορφές κακοηθειών, με πενταετή επιβίωση μόλις 12%. Η επιθετική βιολογία του και η καθυστερημένη διάγνωση περιορίζουν σοβαρά τις θεραπευτικές επιλογές, καθιστώντας αναγκαία την ανακάλυψη νέων μοριακών στόχων για την πιο αποτελεσματική αντιμετώπισή του. Ο σίγμα-2 υποδοχέας (σ2R), ταυτοποιημένος ως η διαμεμβρανική πρωτεΐνη TMEM97, φαίνεται να αποτελεί υποσχόμενο μοριακό στόχο, καθώς συμμετέχει σε διεργασίες σημαντικές για την ανάπτυξη των όγκων. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να ρυθμίζει την ομοιόσταση της χοληστερόλης, την επιβίωση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους και τη μεταστατική τους ικανότητα. Ο πλέον μελετημένος αγωνιστής των σ2R, η σιραμεσίνη, αναφέρεται να έχει ιδιαίτερες αντικαρκινικές ιδιότητες, μεταξύ άλλων και σε καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο μέσω λυσοσωμικής αστάθειας, διαταραχής της μιτοχονδριακής λειτουργίας και επαγωγής φερόπτωσης, δράσεις που έχουν συνδεθεί με την λειτουργία της ως σ2 αγωνιστής.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τη σχέση σημαντικών *in vitro* αντικαρκινικών ιδιοτήτων της σιραμεσίνης με τους σ2R. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα EANM_att21013, στα οποία εφαρμόστηκε siRNA-μεσολαβούμενη σίγηση του TMEM97 και της PGRMC1. Με *in vitro* μεθόδους αξιολογήθηκαν η βιωσιμότητα, ο πολλαπλασιασμός, η κλωνογόνος ικανότητα και η μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα των κυττάρων πριν και μετά την έκθεση σε σιραμεσίνη. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα σε ανοσοκατεσταλμένα NSG ποντίκια, όπου εξετάστηκε η ικανότητα δημιουργίας όγκων των τροποποιημένων παγκρεατικών κυττάρων EANM_att21013 σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη υποδοχέων.

Τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η σίγηση του σ2 υποδοχέα (TMEM97) στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα EANM_att21013 δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα, τον ρυθμό ανάπτυξης και τη μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα των κυττάρων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια ήπια μείωση στην ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν κλώνους όταν απουσίαζε το TMEM97.

Αντίθετα, η σίγηση της πρωτεΐνης PGRMC1 στα ίδια κύτταρα οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας, της κλωνογόνου ικανότητας, καθώς και της ικανότητας για μετανάστευση και διήθηση, χωρίς όμως να επηρεαστεί ο ρυθμός ανάπτυξης. Τα κύτταρα με ταυτόχρονη σίγηση τόσο του σ2 υποδοχέα όσο και της PGRMC1 παρουσίασαν αποτελέσματα παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν μετά από σίγηση μόνο της PGRMC1.

Η προσθήκη σιραμεσίνης σε κύτταρα χωρίς σίγηση των παραπάνω πρωτεϊνών ανέδειξε δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα. Η Σιραμεσίνη μείωσε δοσοεξαρτώμενα τον ρυθμό πολλαπλασιασμού, την ικανότητα σχηματισμού κλώνων, καθώς και τη μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα των κυττάρων. Όταν η ίδια ουσία προστέθηκε στα κύτταρα που είχαν τροποποιηθεί επιγενετικά, η δραστικότητά της παρέμεινε αμετάβλητη. Δηλαδή απουσίας του σ2 υποδοχέα ή/και της πρωτεΐνης PGRMC1, η Σιραμεσίνη προκάλεσε δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας, καθώς και ελάττωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της ικανότητας κλωνογένεσης.

Στα *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα στα οποία είχε γίνει σίγηση είτε του σ2 υποδοχέα (TMEM97) είτε της πρωτεΐνης PGRMC1, παρατηρήθηκε επιβράδυνση της ανάπτυξης των όγκων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control. Αξίζει να σημειωθεί ότι, για το διάστημα που διήρκησε

το πείραμα, οι όγκοι που προήλθαν από τα κύτταρα με σίγηση του σ2 υποδοχέα (siTMEM97) εμφάνισαν ακόμα μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τους όγκους που προήλθαν από τα κύτταρα με σίγηση της PGRMC1 (siPGRMC1).

Συνοψίζοντας, η μελέτη ανέδειξε ότι οι σ2 υποδοχείς (TMEM97) δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου *in vitro*, ενώ *in vivo* η απουσία τους σχετίζεται με επιβράδυνση της ογκογένεσης. Αντίθετα, η PGRMC1 αποδείχθηκε ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη, στην μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, με τη συμβολή της να παραμένει σημαντική και *in vivo*, αν και σε μικρότερο βαθμό. Η διπλή σίγηση των TMEM97 και PGRMC1 επηρέασε κυρίως τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την απουσία της PGRMC1. Τέλος, η αντικαρκινική δράση της Σιραμεσίνης, υπό τις συνθήκες της μελέτης, φάνηκε να είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα των σ2 υποδοχέων -και της PGRMC1-, καθώς η δράση της διατηρήθηκε σε όλα τα κυτταρικά μοντέλα.

Abstract

Pancreatic cancer is among the most lethal malignancies, with a five-year survival rate of only 12%. Its aggressive biology and delayed diagnosis severely limit therapeutic options, highlighting the urgent need for the discovery of new molecular targets for more effective treatment. The sigma-2 receptor (σ 2R), identified as the transmembrane protein TMEM97, regulates cholesterol homeostasis, cell survival, proliferation, and metastatic potential, and appears to be a promising molecular target in this context. The best-studied σ 2R agonist, siramesine, has shown notable anticancer properties—including in pancreatic cancer cells—by inducing cell death through lysosomal destabilization, mitochondrial dysfunction, and ferroptosis, actions that have been linked to its function as a σ 2 agonist.

In the present study, we investigated the relationship between key *in vitro* anticancer properties of siramesine and the σ 2R. Primary pancreatic cancer cells (EANM_att21013) were used, in which siRNA-mediated silencing of TMEM97 and PGRMC1 was performed. *In vitro* methods were used to assess cell viability, proliferation, clonogenic capacity, and migratory/invasive ability before and after exposure to siramesine. Additionally, *vivo* experiments were conducted in immunosuppressed NSG mice, where the tumor-forming ability of the modified pancreatic cancer cells was examined in relation to the expression levels of the receptors under study.

The *in vitro* experimental data showed that silencing the σ 2 receptor (TMEM97) in EANM_att21013 pancreatic cancer cells did not affect viability, proliferation rate, or migratory and invasive capacity. However, a slight reduction in the cells' ability to form colonies was observed in the absence of TMEM97.

In contrast, silencing PGRMC1 in the same cells led to a significant decrease in viability, clonogenic capacity, and migratory/invasive ability, without affecting the proliferation rate. Cells with simultaneous silencing of both the σ 2 receptor and PGRMC1 exhibited results like those observed after silencing PGRMC1 alone.

The addition of siramesine to cells without silencing of the above proteins revealed dose- and time-dependent cytotoxicity. Siramesine dose-dependently reduced proliferation rate, clonogenic capacity, and migratory/invasive ability. When siramesine was added to epigenetically modified cells, its activity remained unchanged. That is, in the absence of the σ 2 receptor and/or PGRMC1, siramesine induced a dose- and time-dependent reduction in viability, as well as a decrease in proliferation rate and clonogenic capacity.

In the *in vivo* experiments, tumors derived from cells with silenced σ 2 receptor (TMEM97) or PGRMC1 showed slower growth compared to respective controls. Notably, throughout the duration of the experiment, tumors originating from cells with silenced σ 2 receptor (siTMEM97) exhibited an even lower growth rate than those from PGRMC1-silenced cells (siPGRMC1).

In summary, the study demonstrated that σ 2 receptors (TMEM97) do not significantly affect tumor growth *in vitro*, whereas their absence *in vivo* is associated with delayed tumorigenesis. In contrast, PGRMC1 proved to be a key regulator of growth, migratory, and invasive capacity of cancer cells *in vitro*, with its contribution remaining important *in vivo*, albeit to a lesser extent. Double silencing of TMEM97 and PGRMC1 primarily affected features associated with the absence of PGRMC1, further highlighting its central role in regulating cell aggressiveness. Finally, under the conditions of this

study, the anticancer action of siramesine appeared to be independent of the levels of both $\sigma 2$ receptors and PGRMC1, as its effect was maintained across all cellular models tested.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Καρκίνος	9
1.1 Γενικά για τον Καρκίνο	9
1.2. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων & ορόσημα του καρκίνου	10
2. Παγκρεατικός Καρκίνος.....	13
2.1. Φυσιολογική λειτουργία παγκρέατος και Βασική ανατομία	14
2.2. Εισαγωγή στον παγκρεατικό καρκίνο- Επιδημιολογικά στοιχεία.....	15
2.3. Κλινική Εικόνα - Συμπτωματολογία	15
2.4. Διάγνωση και Θεραπεία.....	16
3. Σίγμα Υποδοχείς	17
3.1. Σίγμα-1 Υποδοχείς (σ1R)	17
3.2. Σίγμα-2 Υποδοχείς (σ2R)	18
3.2.1. Δομή και σύμπλοκα που δημιουργεί ο σ2 υποδοχέας.....	19
3.2.2. Φυσιολογικός ρόλος	21
3.2.3. Ρόλος του σ2R στον καρκίνο	23
3.2.3.1 Ρόλος του s2R στον παγκρεατικό καρκίνο	25
4. PGRMC1	26
4.1 Γενικά για την PGRMC1	26
4.2 Φυσιολογικός ρόλος της PGRMC1	27
4.3 PGRMC1 και καρκινογένεση	30
5. Προσδέτες των σίγμα-2 Υποδοχέων.....	32
5.1 Ενδογενείς προσδέτες.....	32
5.2 Εξωγενείς προσδέτες	33
6. Σιραμεσίνη	34
6.1 Γενικά: Σιραμεσίνη	34
6.2 Ο ρόλος της Σιραμεσίνης στον καρκίνο	35
7. Αποσιώπηση των υποδοχέων PGRMC1 και TMEM97 με την τεχνολογία του siRNA.....	36
Σκοπός.....	38
Πειραματική Διαδικασία/ Υλικά και Μέθοδοι.....	39
2.1 Υλικά αναλώσιμα και διαλύματα.....	39
2.2 Κυτταροκαλλιέργειες	41
2.3 Καταμέτρηση κυττάρων (Trypan Blue Χρωστική) - Βιωσιμότητα κυττάρων	42
2.4 Αποσιώπηση των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 μέσω επιμόλυνσης με siRNA	43
2.5 Λύση κυττάρων και προσδιορισμός ποσότητας πρωτεΐνης.....	45
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες	45

2.7 Ανοσοαποτύπωση κατά Western – Έλεγχος επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών TMEM97 & PGRMC1	47
2.8 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue	48
2.9 Μέτρηση κυτταροτοξικότητας με τη χρώση Β σουλφοροδαμίνης (SRB assay)	49
2.10 Δοκιμασία μελέτης αναστολής σχηματισμού αποικιών (clonogenic assay).....	50
2.11 Μέθοδος μελέτης μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας με χρήση μεμβράνης διαπερατότητας, ε/ξωκυττάριας ύλης ή /και χημειοτακτικό μέσο (Transwell assay)	50
2.12 <i>In vivo</i> πείραμα	51
Αποτελέσματα.....	52
3.1 Αποσιώπηση των σ2R (TMEM97) και PGRMC1	52
3.2 Βιωσιμότητα παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων μετά από την έκθεση σε έναν σ2R προσδέτη, Σιραμεσίνη	53
3.3 Μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής/κυτταροτοξικής δράσης της Σιραμεσίνης σε συνθήκες σίγησης των TMEM97 ή/και PGRMC1 (SRB assay)	56
9.4 Επίδραση στην κλωνογόνο ικανότητα των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων της σίγησης των TMEM97 ή / και PGRMC1 και της έκθεσης σε σιραμεσίνη	60
3.5 Μεταναστευτική (migration) και διηθητική (invasion) ικανότητα των κυττάρων EANM_att021013 υπό συνθήκες σίγησης γονιδίων ή έκθεσης σε σιραμεσίνη	64
9.6 Αποτελέσματα των πειραμάτων <i>in vivo</i>	66
Συμπεράσματα/Συζήτηση	69
Βιβλιογραφία	73

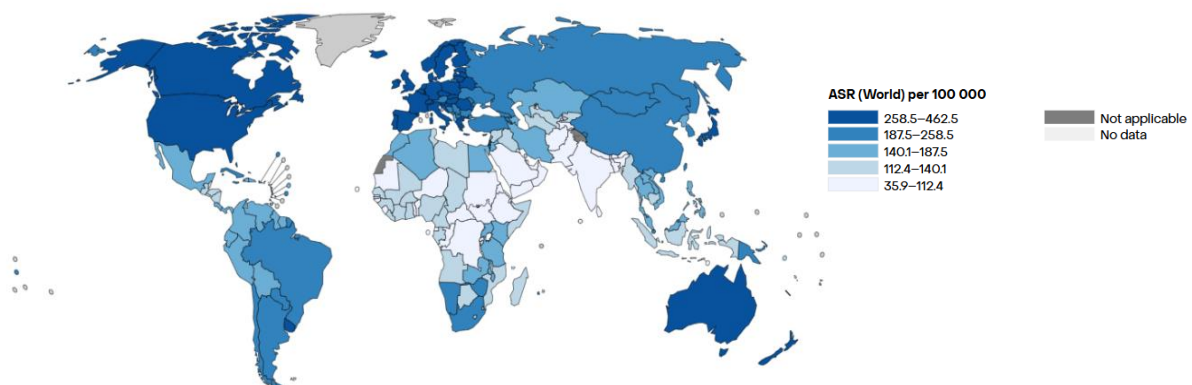
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καρκίνος

1.1 Γενικά για τον Καρκίνο

Ο όρος «καρκίνος» ετυμολογικά έχει τις ρίζες του στην Αρχαία Ελλάδα, όπου ο Ιπποκράτης, κατά τον 5ο αιώνα π.Χ., χρησιμοποίησε τη λέξη αυτή για να περιγράψει κακοήθεις όγκους. Το όνομα «καρκίνος» έχει ρίζες από την λέξη «καβούρι» λόγω της μορφολογίας των καρκινικών όγκων στους οποίους οι εσωτερικές και εξωτερικές διογκώσεις που δημιουργούταν θύμιζαν τα πόδια του καβουριού. Αργότερα, ο Ρωμαίος ιατρός Κέλσος (1ος αι. μ.Χ.) μετέφρασε τον όρο στα λατινικά ως cancer, ενώ ο Γαληνός (2ος αι. μ.Χ.) εισήγαγε τον όρο ὄγκος, ο οποίος έγινε η βάση της σύγχρονης ογκολογίας (Di Lonardo et al., 2015).

Σήμερα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμός Υγείας, ο όρος καρκίνος χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από την ανεξέλεγκτη διαίρεση και ανάπτυξη «ανώμαλων» κυττάρων, τα οποία μπορούν να εισβάλουν σε κοντινούς ή παρακείμενους ιστούς. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν, επίσης, να εξαπλωθούν και σε άλλα, απομακρυσμένα μέρη του σώματος μέσω του αίματος και του λεμφικού συστήματος, μία διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση. Η νόσος αυτή συγκαταλέγεται στα μεγαλύτερα ζητήματα δημόσιας υγείας διεθνώς, καθώς αποτελεί δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα, το 2022 καταγράφηκαν περίπου 20 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου ([Εικόνα 1.1](#)) και 9,7 εκατομμύρια θάνατοι διεθνώς, ενώ οι προβλέψεις δείχνουν ότι μέχρι το 2045 τα κρούσματα θα διπλασιαστούν (Ferlay et al., 2024).

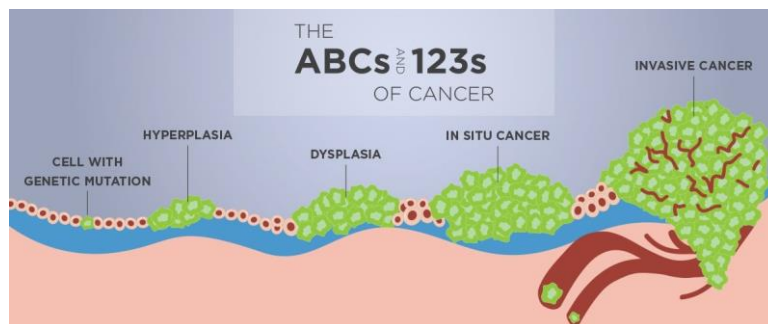


Εικόνα 1.1 : Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει τα συνολικά κρούσματα όλων των τύπων καρκίνου για το έτος 2022 (Bray et al., 2024)

Η διαδικασία της καρκινογένεσης, η οποία απεικονίζεται στην [Εικόνα 1.2](#), ξεκινά με μεταλλάξεις σε κρίσιμα γονίδια που οδηγούν στην υπερπλασία, δηλαδή σε αυξημένο και μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τα οποία όμως διατηρούν την φυσιολογική μορφολογία τους. Στην συνέχεια, εξελίσσεται στη δυσπλασία κατά την οποία τα κύτταρα παρουσιάζουν σταδιακά μορφολογικές αλλαγές και διαταραγμένη οργάνωση και τέλος, προχωρά στο καρκίνωμα in situ (CIS) που αντιστοιχεί στο Στάδιο 0. Στο στάδιο αυτό μπορούμε να χαρακτηρίσουμε τα κύτταρα κακοήθη αλλά το CIS δεν θεωρείται καρκίνος. Στο επόμενο στάδιο, τα κύτταρα διαπερνάν τη βασική μεμβράνη

με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται καρκίνος (Rosen & Sapra, 2023). Έτσι βάσει του συστήματος TNM (Tumor-Nodes-Metastasis), ο καρκίνος κατηγοριοποιείται στα στάδια Στάδια I-IV:

1. Στάδιο I: χαρακτηρίζεται από μικρό όγκο χωρίς επέκταση σε λεμφαδένες
2. Στάδιο II: ο όγκος είναι μεγαλύτερος αλλά παραμένει τοπικός
3. Στάδιο III: επέκταση σε περιφερικούς λεμφαδένες ή γειτονικούς ιστούς
4. Στάδιο IV: μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα



Εικόνα 1.1: Τα στάδια του καρκίνου (Sutton, D., 2020).

1.2. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων & ορόσημα του καρκίνου

Τα καρκινικά κύτταρα εκδηλώνουν ιδιότητες που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα, και η σύγχρονη έρευνα έχει αναγνωρίσει κάποια βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά γνωστά ως «ορόσημα του καρκίνου» (Hallmarks of cancer), τα οποία καθορίζουν τη νεοπλασματική εξέλιξη (Hanahan & Weinberg, 2000). Το 2000, οι Hanahan και Weinberg προσδιόρισαν έξι βασικά ορόσημα που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα:

1. Αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης

Τα κύτταρα χρειάζονται ειδικά σήματα για να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο. Σε φυσιολογικές συνθήκες, αυξητικοί παράγοντες δεσμεύονται σε υποδοχείς (π.χ. EGFR) και προκαλούν διαδοχική ενεργοποίηση της οδού RAS–RAF–MEK–ERK ή PI3K–AKT, οδηγώντας στην έκφραση γονιδίων απαραίτητων για τη κυτταρική διαίρεση. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται συχνά υπερέκφραση ή μεταλλάξεις σε ογκογονίδια που συμμετέχουν σε αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια (όπως το EGFR και το RAS), με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται σε ανεξέλεγκτη σηματοδότηση της ανάπτυξης (Grumolato & Aaronson, 2017).

2. Ανθεκτικότητα σε ανασταλτικά σήματα ανάπτυξης

Πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια ρυθμίζουν αρνητικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο TP53, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία ενεργοποιείται σε συνθήκες βλάβης DNA, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση. Μεταλλάξεις στο TP53 μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια αυτής της ικανότητας, επιτρέποντας στα κύτταρα να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό παρά την ύπαρξη βλαβών DNA (Amin et al., 2015).

3. Αντίσταση στην απόπτωση

Σε φυσιολογικά κύτταρα, η απόπτωση ελέγχει την «απομάκρυνση» μη απαραίτητων ή κατεστραμμένων κυττάρων μέσω δύο κύριων μονοπατιών: του ενδογενούς και του εξωγενούς

αποπτωτικού μονοπατιού. Μία από τις βασικές αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες είναι η Bcl-2, η οποία δεσμεύει και αναστέλλει μοριακούς παράγοντες όπως το Bax/Bak, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την απελευθέρωση κυτοχρώματος c και συνεπώς, την απόπτωση. Σε περιπτώσεις καρκίνου, η υπερέκφραση του Bcl-2 εμποδίζει την απόπτωση, επιτρέποντας στα κύτταρα να επιβιώνουν παρά τις επιβλαβείς συνθήκες. Αντίθετα, η απώλεια ή η μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών Bax ή Bid ενισχύει την ικανότητα των κυττάρων να αποφεύγουν την απόπτωση (Fernald & Kurokawa, 2013).

4. Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού

Τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα φθάνουν στο λεγόμενο όριο Hayflick, όπου η συνεχής βράχυνση των τελομερών οδηγεί σε γήρανση (senescence). Η ενεργοποίηση της τελομεράσης στα καρκινικά κύτταρα επιτρέπει την επιμήκυνση ή τη διατήρηση των τελομερών, δίνοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα απεριόριστων διαιρέσεων (Eissenberg 2013).

5. Συνεχής αγγειογένεση

Προκειμένου τα συνεχώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ενός όγκου να εξασφαλίσουν την αιμάτωση που χρειάζονται για την ανάπτυξη τους, εκκρίνουν παράγοντες όπως VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), οι οποίοι δεσμεύονται στους αντίστοιχους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενεργοποιούν την δημιουργία νέων αγγείων (Magalhães & Dias, 2019).

6. Μεταστατική ικανότητα

Η μετάσταση προϋποθέτει την απώλεια της πολικότητας και των κυτταρικών συνδέσεων (π.χ. μέσω μειωμένης έκφρασης E-cadherin) και ενεργοποίηση μονοπατιών επιθηλιο–μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT). Κύριοι παράγοντες EMT, όπως το SNAIL, TWIST και ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1), καταστέλλουν την έκφραση επιθηλιακών δεικτών (π.χ. E-cadherin) και επάγουν μεσεγχυματικούς δείκτες (π.χ. N-cadherin, Vimentin), διευκολύνοντας την κινητικότητα και εισχώρηση των κυττάρων στο στρώμα (Ribatti et al., 2020).

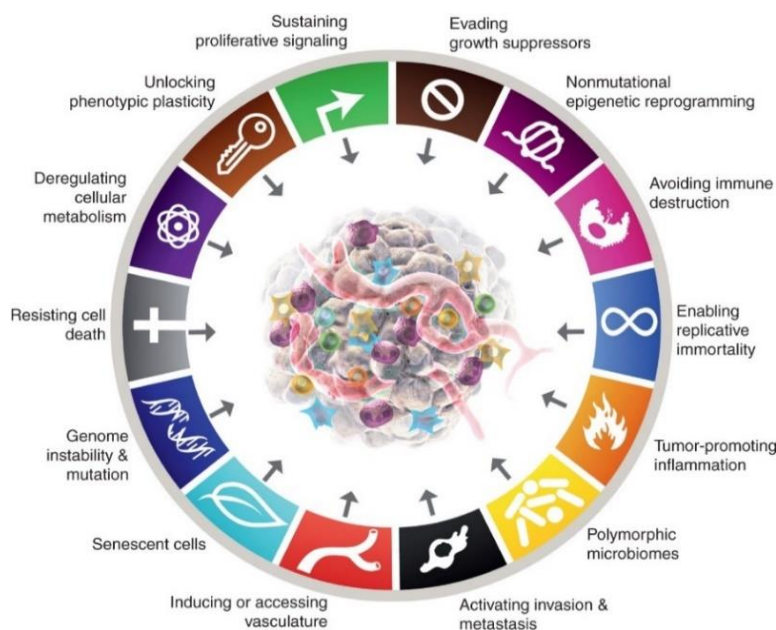
Το 2011, η ίδια επιστημονική ομάδα πρόσθεσε άλλα τέσσερα χαρακτηριστικά που αντανακλούν επιπρόσθετες πτυχές της ογκογένεσης (Hanahan & Weinberg, 2011):

7. Μεταβολικός αναπρογραμματισμός (φαινόμενο Warburg)

Παρά το διαθέσιμο οξυγόνο, τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να παράγουν ενέργεια μέσω γλυκόλυσης (αναερόβια διαδικασία), τα παραπροϊόντα της οποίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την βιοσύνθεση απαραίτητων δομικών στοιχείων του κυττάρου (νουκλεοτίδια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα). Πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο αυτό είναι η MYC, η οποία ενισχύει την έκφραση γονιδίων γλυκόλυσης και η HIF1α (Hypoxia-Inducible Factor alpha) (de Castro, 2019).

8. Διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αποφεύγουν την αναγνώριση και καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκφραση του PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται στους αντίστοιχους υποδοχείς στα T-λεμφοκύτταρα και εμποδίζει την δράση των κυττάρων αυτών (Ρόνοα & Fior, 2019).



Εικόνα 1.2: Συνοπτικά τα ορόσημα του καρκίνου (Hanahan, 2022)

9. Γονιδιωματική αστάθεια και μεταλλάξεις

Η γονιδιωματική αστάθεια αναφέρεται στην τάση των καρκινικών κυττάρων να συσσωρεύουν μεταλλάξεις και δομικές αλλοιώσεις του DNA, διευκολύνοντας την εξέλιξη της νόσου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μειωμένης δράσης (λόγω μεταλλάξεων) γονιδίων που φυσιολογικά «σκανάρουν», όπως το ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και επιδιορθώνουν το DNA, όπως τα BRCA1/2 (Breast Cancer 1/2, DNA Repair Associated) (Fior, 2019)

10. Ογκο-επαγόμενη φλεγμονή

Το μικροπεριβάλλον του όγκου χαρακτηρίζεται πολλές φορές και φλεγμονώδες, καθώς τόσο τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα όσο και τα κύτταρα του περιβάλλοντος (π.χ. του ανοσοποιητικού) εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες. Αυτές οι ουσίες προάγουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση των καρκινικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, σε απόκριση των παραγόντων αυτών, προσελκύονται επιπλέον φλεγμονώδη κύτταρα (όπως ουδετερόφιλα και μακροφάγα τύπου M2), τα οποία ενισχύουν περαιτέρω την φλεγμονή (Artero et al., 2025).

Η εξέλιξη της έρευνας του καρκίνου έχει οδηγήσει στην αναγνώριση νέων βιολογικών διεργασιών που συμβάλλουν στην ογκογένεση. Σε πρόσφατη μελέτη των Senga και Grose (2021), τέσσερα επιπλέον ορόσημα προστέθηκαν στο κλασικό πλαίσιο των Hanahan και Weinberg, το οποίο φαίνεται ενημερωμένο στην [Εικόνα 1.3](#). Αυτά είναι:

11. Μεταδιαφοροποίηση και αποδιαφοροποίηση

Το φαινόμενο της αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation) αναφέρεται στον επαναπρογραμματισμό τελικώς διαφοροποιημένων κυττάρων, τα οποία αποκτούν χαρακτηριστικά βλαστικού φαινοτύπου. Αντίθετα, η μεταδιαφοροποίηση (transdifferentiation) περιγράφει την άμεση μετατροπή ενός τελικώς διαφοροποιημένου κυττάρου σε έναν άλλον τύπο χωρίς ενδιάμεσο βλαστικό στάδιο. Κάθε διεργασία προσφέρει ξεχωριστά πλεονεκτήματα στα καρκινικά κύτταρα: η αποδιαφοροποίηση μέσω του βλαστικού φαινότυπου, συνεπάγεται απεριόριστη αναπαραγωγική

ικανότητα και δυνατότητα διαφοροποίησης σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους, ενώ η μεταδιαφοροποίηση διευκολύνει μεταστατική ικανότητα των κυττάρων (Hanahan, 2022).

12. Πολυμορφικό μικροβίωμα

Η σύνθεση του εντερικού ή τοπικού μικροβιώματος συμβάλλει στην καρκινογένεση μέσω της πρόκλησης χρόνιας φλεγμονής στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για παράδειγμα, η παρουσία του μύκητα *Malassezia spp.* στο περιβάλλον του παγκρεατικού καρκίνου ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου, καθώς προωθεί περαιτέρω την φλεγμονή στο σημείο αυτό (Artero et al., 2025).

13. Επιγενετικός αναπρογραμματισμός

Αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA (π.χ. υπερ- ή υπο-μεθυλίωση) και τροποποιήσεις ιστονών επιτρέπουν την υπο- ή υπερ-έκφραση γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ογκογένεση (Artero et al., 2025).

14. Αλλαγές στην νευρική σηματοδότηση

Οι καρκινικοί όγκοι εκμεταλλεύονται την αυξημένη νευρική σηματοδότηση που παρατηρείται για να προάγουν την ανάπτυξη, την αγγειογένεση, την φλεγμονή, την αποφυγή της ανοσοεπιτήρησης και τη μετάσταση (Hanahan & Monje, 2023).

2. Παγκρεατικός Καρκίνος

Ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελεί μία από τις πλέον θανατηφόρες μορφές καρκίνου παγκοσμίως, με το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης να παραμένει εξαιρετικά χαμηλό, μόλις στο 12%. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, παρατηρείται σταθερή και ανησυχητική αύξηση τόσο στην εμφάνιση της νόσου όσο και στη θνησιμότητα που αυτή προκαλεί. Ο αριθμός των νέων περιστατικών διπλασιάστηκε μεταξύ 1990 και 2019 (από 197.348 σε 530.297 ετησίως), ενώ ο δείκτης επίπτωσης κανονικοποιημένος ως προς την ηλικία (ASIR) αυξάνεται κατά μέσο όρο 0,8% ετησίως (Zhao et al., 2024).

Στατιστικά, οι άνδρες επηρεάζονται συχνότερα από τις γυναίκες, ενώ υψηλά ποσοστά καταγράφονται σε περιοχές όπως η Ευρώπη (Ferlay et al., 2024). Κυριότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου είναι το κάπνισμα, η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, που συμβάλλουν στην επιδείνωση της πρόγνωσης (Rahib et al., 2025).

Η έλλειψη ευαίσθητων και ειδικών βιοδεικτών καθιστά την έγκαιρη διάγνωση ιδιαίτερα δύσκολη, με αποτέλεσμα η πλειονότητα των ασθενών να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο ή μεταστατικό στάδιο. Έτσι, η ανάγκη για καλύτερη πρόληψη, όπως και η ανάπτυξη αξιόπιστων διαγνωστικών εργαλείων και στοχευμένων θεραπειών με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου είναι επιτακτική.

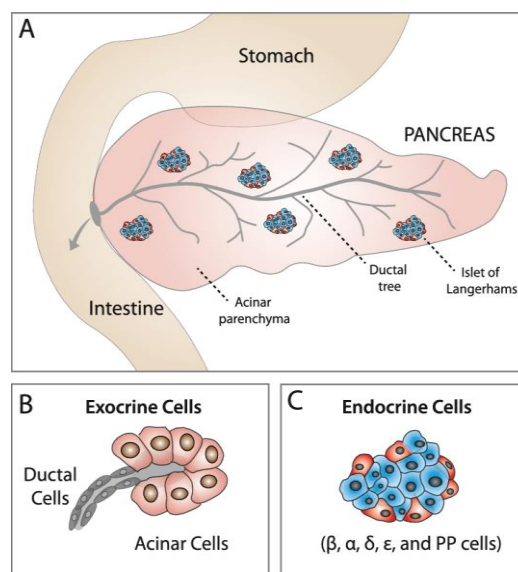
2.1. Φυσιολογική λειτουργία παγκρέατος και Βασική ανατομία

Το πάγκρεας είναι ένας μικτός αδένας με σύνθετη μορφολογική και λειτουργική οργάνωση, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο τόσο στη διαδικασία της πέψης όσο και στη ρύθμιση του μεταβολισμού μέσω της ενδοκρινούς λειτουργίας του. Βρίσκεται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα και εκτείνεται εγκάρσια από το δωδεκαδάκτυλο έως την πύλη του σπλήνα. Ανατομικά, διακρίνεται σε τρία κύρια τμήματα: την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Σε ενήλικες, το μήκος του παγκρέατος κυμαίνεται μεταξύ 14 και 23 cm (Lim et al., 2023).

Σε ιστολογικό επίπεδο, το πάγκρεας αποτελείται από δύο διακριτές, αλλά αλληλεπιδρώσες λειτουργικές μονάδες (Εικόνα 1.4):

- a. Εξωκρινής μοίρα: Καταλαμβάνει περίπου το 85–90% του συνολικού όγκου και αποτελείται από πυραμοειδή κύτταρα, που συνθέτουν και εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα, κυρίως πρωτεάσες, αμυλάσες και λιπάσες (Lim et al., 2023).
- b. Ενδοκρινής μοίρα: Αντιστοιχεί στις νησίδες του Langerhans, οι οποίες καταλαμβάνουν μόλις 1–2% του παγκρεατικού ιστού, αλλά επιτελούν κρίσιμες λειτουργίες στην ορμονική ρύθμιση του οργανισμού. Οι νησίδες περιλαμβάνουν τους εξής κυτταρικούς τύπους:
 - i. Β-κύτταρα (60–70%): Παράγουν ινσουλίνη και διαθέτουν σφαιρικούς, κεντρικά τοποθετημένους πυρήνες.
 - ii. Α-κύτταρα (20–25%): Εκκρίνουν γλυκαγόνο και εντοπίζονται στην περιφέρεια των νησίδων.
 - iii. Δ-κύτταρα (5–10%): Παράγουν σωματοστατίνη, μία ορμόνη που αναστέλλει την έκκριση άλλων ορμονών.
 - iv. PP-Κύτταρα (~5%): Εκκρίνουν παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP), το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση της πέψης και της ενεργειακής ομοιόστασης.
 - v. Ε-Κύτταρα (~1%): Παράγουν γκρελίνη, μια ορμόνη που διεγείρει την όρεξη (Lim et al., 2023).

Συνεπώς, το πάγκρεας διαδραματίζει διττό ρόλο: αφενός στην πέψη, μέσω των πεπτικών ενζύμων της εξωκρινούς μοίρας που διασπούν μακρομόρια της τροφής, και αφετέρου στη ρύθμιση του μεταβολισμού μέσω της ενδοκρινούς του λειτουργίας



Εικόνα 1.4: Ανατομία του παγκρέατος (Alvarez Fallas et al., 2021)

2.2. Εισαγωγή στον παγκρεατικό καρκίνο- Επιδημιολογικά στοιχεία

Σύμφωνα με τα δεδομένα του GLOBOCAN 2022, ο παγκρεατικός καρκίνος παραμένει μία από τις πιο θανατηφόρες ογκολογικές παθήσεις παγκοσμίως, με 467.409 θανάτους το 2022 (Εικόνα 1.5) και πενταετή επιβίωση γύρω στο 12% (American Cancer Society, 2025) Στην Ελλάδα, το 2022, ο παγκρεατικός καρκίνος ήταν ο 6^{ος} συχνότερα διαγνωσμένος τύπος καρκίνου και κατείχε την 4^η θέση ως αιτία θανάτου από κακοήθεια (Ferlay et al., 2024)..

Ο συχνότερος τύπος παγκρεατικού καρκίνου είναι το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (PDAC), το οποίο αφορά την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος και εντοπίζεται συχνότερα στην κεφαλή του οργάνου σε ποσοστό 60-70%. Η ανάπτυξή του σχετίζεται με έναν διαδοχικά συσσωρευτικό μηχανισμό γενετικών μεταλλάξεων στο φυσιολογικό παγκρεατικό επιθηλιακό ιστό, οδηγώντας σε προκαρκινικές αλλοιώσεις που σταδιακά εξελίσσονται σε διηθητικό καρκίνωμα (McGuigan et al., 2018).

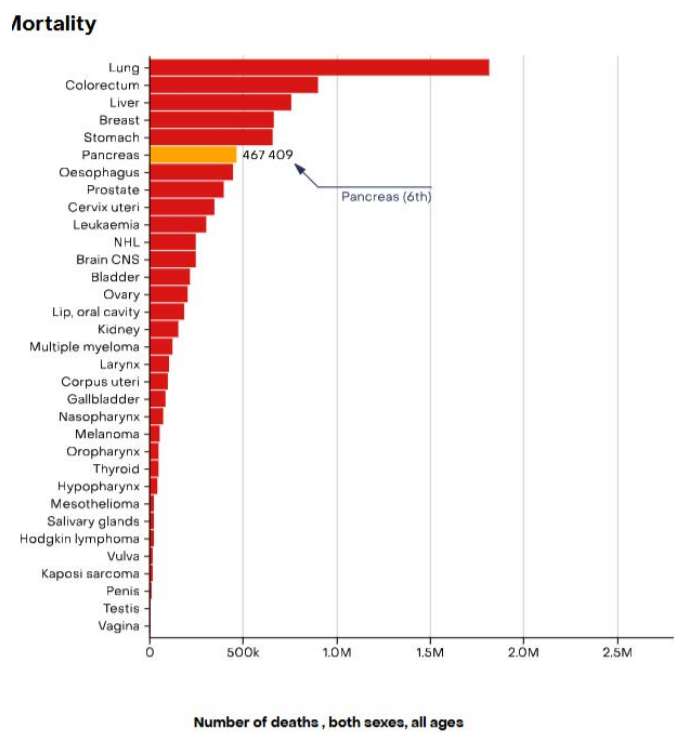
Οι κυριότερες πρόδρομες νεοπλασίες περιλαμβάνουν την παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (PanIN), τα ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα (IPMN) και τα βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα (MCN). Κάθε ένα από αυτά τα είδη χαρακτηρίζεται από διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά, παθολογοανατομικά ευρήματα και μοριακές υπογραφές (McGuigan et al., 2018).

Καθοριστικοί παράγοντες κινδύνου αποτελούν (McGuigan et al., 2018):

1. **Το κάπνισμα.** Σε σχέση με τους μη καπνιστές, οι νυν καπνιστές έχουν 74% μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και οι πρώην καπνιστές 20% μεγαλύτερο
2. **Η παχυσαρκία.** (Δείκτης Μάζας Σώματος >30): Το αυξημένο σωματικό λίπος προκαλεί χρόνια χαμηλού επιπέδου φλεγμονής και ινσουλινοαντίστασης, προάγοντας τελικά ωφέλιμο μικροπεριβάλλον για την καρκινογένεση
3. **Η ηλικία.** Το 90% των ατόμων με παγκρεατικό καρκίνο είναι άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών
4. **Η χρόνια παγκρεατίτιδα,** η οποία προκαλεί χρόνια φλεγμονή
5. **Η γενετική προδιάθεση,** η οποία περιλαμβάνει μεταλλάξεις σε κρίσιμα ογκοκατασταλτικά, όπως το BRCA1/2 και το PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2).

2.3. Κλινική Εικόνα - Συμπτωματολογία

Ο παγκρεατικός καρκίνος συχνά εμφανίζεται με μη ειδικά συμπτώματα, γεγονός που καθιστά την έγκαιρη διάγνωση ιδιαίτερα δύσκολη. Όταν ο όγκος εντοπίζεται στην κεφαλή του παγκρέατος,



Εικόνα 1.5: Θνησιμότητα σε διάφορους τύπους καρκίνων (Globocan, 2022)

προκαλείται απόφραξη του χοληδόχου πόρου, οδηγώντας σε ίκτερο στο 65–80% των περιπτώσεων, συνοδευόμενο από ανοιχτόχρωμα κόπρανα, σκουρόχρωμα ούρα και κνησμό, λόγω συσσώρευσης χολικών αλάτων. Παράλληλα, οι ασθενείς είναι δυνατόν να εμφανίσουν ναυτία και έμετο.

Ο κοιλιακός πόνος, ο οποίος εντοπίζεται συνήθως στο επιγάστριο και αντανακλά προς την πλάτη, αποτελεί ένδειξη προχωρημένου σταδίου της νόσου. Όγκοι που εντοπίζονται στο σώμα ή στην ουρά του παγκρέατος σχετίζονται με πιο έντονο και εμμένον πόνο. Η απώλεια βάρους και η ανορεξία παρατηρούνται σε ποσοστό άνω του 80% των ασθενών, και οφείλονται σε μεταβολικές διαταραχές. Επιπρόσθετα, η παγκρεατική ανεπάρκεια συχνά προκαλεί στεατόρροια και δυσπεψία, με λιπαρές και δυσώδεις κενώσεις. Σε μικρότερο ποσοστό (25–50%), εμφανίζεται σακχαρώδης διαβήτης, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένους ασθενείς, ενώ σπανιότερα παρατηρείται οξεία παγκρεατίτιδα (1–2%) (DiMagno, 1999, Fountain Life, n.d., Gupta et al., 2023)

2.4. Διάγνωση και Θεραπεία

Η διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου βασίζεται κυρίως σε απεικονιστικές μεθόδους, οι οποίες επιτρέπουν τον εντοπισμό της μάζας, την πιθανή διήθηση της σε αγγεία ή σε παρακείμενα όργανα, καθώς και την ανίχνευση μεταστάσεων. Πρώτη διαγνωστική προσέγγιση αποτελεί η αξονική τομογραφία (CT), η οποία μπορεί να ανιχνεύσει διόγκωση του παγκρεατικού πόρου, ατροφία του αδένου ή οζώδεις αλλοιώσεις. Σε περιπτώσεις ύποπτων ή αμφίβολων ευρημάτων χρησιμοποιείται επιπλέον μαγνητική τομογραφία (MRI) (McGuigan et al., 2018).

Μία άλλη απεικονιστική τεχνική με υψηλή ευαισθησία, ιδίως για μικρές αλλοιώσεις (<2 cm) είναι το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS), το οποίο επιτρέπει ταυτόχρονα και την λήψη δείγματος με βιοψία διά βελόνης. Σε περιπτώσεις αμφιλεγόμενες ή με πιθανές μεταστάσεις, χρησιμοποιείται η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων σε συνδυασμό με αξονική PET/CT, η οποία αποτελεί συνδυασμό 2 διαγνωστικών τεχνικών και επιτρέπει την απεικόνιση ενεργών νεοπλασματικών εστιών με τη χρήση ραδιοσημασμένου FDG (Enwelu & Aziz, 2013, Zhang et al., 2018).

Συμπληρωματικά προς τις απεικονιστικές εξετάσεις, διενεργούνται και εργαστηριακές αναλύσεις οι οποίες υποστηρίζουν την πρόωπη υποψία ή την παρακολούθηση της νόσου. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος βιοδείκτης είναι το αντιγόνο CA 19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9) που χρησιμοποιείται κυρίως για την αξιολόγηση ανταπόκρισης στη θεραπεία, την παρακολούθηση της νόσου ή την ανίχνευση υποτροπής, καθώς παρουσιάζει περιορισμένη ευαισθησία σε ασυμπτωματικούς ασθενείς (Zhang et al., 2018).

Επίσης, βιοχημικές αναλύσεις της συγκέντρωσης των ADH, HEX (N-ακετυλ-β-D-εξοζαμινιδάσης), HEX A και καθεψίνης D στον ορό και στα ούρα ασθενών έχουν δείξει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, υποδεικνύοντας την πιθανή αξία τους ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί δείκτες του παγκρεατικού καρκίνου (Jelski & Mroczko, 2019).

Αναφορικά με την θεραπεία, η χειρουργική εκτομή με σκοπό την πλήρη αφαίρεση του όγκου παραμένει η πλέον αποτελεσματική προσέγγιση, όταν αυτό είναι εφικτό (McGuigan et al., 2018). Ωστόσο, δεδομένου ότι το 80–85% των ασθενών διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο με αγγειακές διηθήσεις ή μεταστάσεις, μόλις ένα μικρό ποσοστό είναι κατάλληλο για χειρουργική επέμβαση. Μετεγχειρητικά, σχεδόν όλοι οι ασθενείς υποβάλλονται σε επικουρική (adjuvant) χημειοθεραπεία, συνήθως με FOLFIRINOX® (συνδυασμός 5-Φθοριοουρακίλης, Λευκοβορίνης, Ιρινοτεκάνης και Οξαλιπλατίνης) ή, εναλλακτικά με Γεμισιταβίνη ± Καπεσιταβίνη για την εξάλειψη πιθανών μικρομεταστατικών εστιών (McGuigan et al., 2018).

Σε περιπτώσεις ανεγχείρητων ή μεταστατικών όγκων, η κύρια θεραπευτική προσέγγιση είναι η συστηματική χημειοθεραπεία. Το FOLFIRINOX[®] αποτελεί τη θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς καλής φυσικής κατάστασης, ενώ η μονοθεραπεία με Γεμισιταβίνη ή ο συνδυασμός Γεμισιταβίνη – Nab-πακλιταξέλη (πακλιταξέλης δεσμευμένη με λευκωματίνη) προτιμώνται σε ευάλωτους ή ηλικιωμένους ασθενείς (Costanzo et al., 2023).

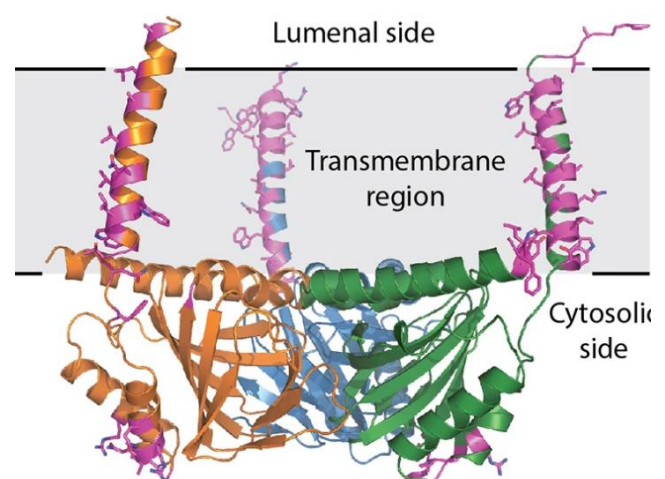
Συμπληρωματικά, μπορεί να εφαρμοσθεί και ακτινοθεραπεία, κυρίως με εξωτερική δέσμη (EBRT), η οποία στοχεύει επιλεγμένες περιοχές του σώματος (Ducruex et al., 2015). Δεδομένων των σημαντικών περιορισμών των υπάρχουσών θεραπευτικών επιλογών, η ανάγκη για ανάπτυξη νέων φαρμάκων παραμένει επιτακτική, με στόχο τη βελτίωση της πρόγνωσης και της επιβίωσης των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο.

3. Σίγμα Υποδοχείς

Οι σίγμα (σ) υποδοχείς αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία πρωτεϊνικών υποδοχέων με μοναδική ιστορία ταξινόμησης. Αρχικά, το 1976, ταυτοποιήθηκαν λανθασμένα ως υπότυπος οπιοειδών υποδοχέων από τον Martin και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελετούσαν τη δράση του βενζομορφανικού παραγώγου SKF-10,047. Η ονομασία "σίγμα" προήλθε απλώς από το πρώτο γράμμα "S" του ονόματος της ουσίας (SKF-10,047), ακολουθώντας την παράδοση ονοματολογίας των άλλων οπιοειδών υποδοχέων (μ, κ, δ) που είχαν ήδη ταυτοποιηθεί (Martin et al., 1976). Μεταγενέστερες έρευνες απέδειξαν, ωστόσο, ότι οι σίγμα υποδοχείς δεν ανήκουν στην οικογένεια των οπιοειδών υποδοχέων (Vaupe, 1983). Για ένα διάστημα, επικράτησε η άποψη ότι οι σίγμα υποδοχείς ταυτίζονταν με τις θέσεις δέσμευσης της φαινκυκλιδίνης (PCP), αλλά και αυτή η υπόθεση διαψεύστηκε, οδηγώντας στον ορισμό τους ως "μη-οπιοειδείς, μη-φαινκυκλιδινικοί υποδοχείς" (Largent et al., 1986). Περαιτέρω έρευνες αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο διακριτών υποτύπων με επικαλυπτόμενες εξειδικεύσεις προσδετών: του σίγμα-1 (σ1R) και του σίγμα-2 (σ2R) υποδοχέα (Fishback et al., 2010).

3.1. Σίγμα-1 Υποδοχείς (σ1R)

Οι σίγμα-1 (σ1) υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από 223 αμινοξέα, των οποίων η κρυσταλλική δομή ανακαλύφθηκε το 2016. Η δομή αυτή ανέδειξε τον σχηματισμό ομοτριμερών (Εικόνα 1.6), με κάθε υπομονάδα να διαθέτει μία N-τελική διαμεμβρανική έλικα και μία περιοχή δέσμευσης προσδέτη τύπου β-βαρελίου (Schmidt et al., 2016). Εντοπίζονται κυρίως στις εξειδικευμένες περιοχές της μεμβράνης που συνδέουν το ενδοπλασματικό δίκτυο με τα μιτοχόνδρια, γνωστές ως mitochondria-associated membranes (MAMs). Λειτουργούν όχι ως τυπικοί υποδοχείς αλλά ως ρυθμιστικοί σηματοδότες και πρωτεΐνες-συνοδοί (chaperones), ρυθμίζοντας την ομοιόσταση του ασβεστίου, τη δίοδο ιόντων μέσω διαύλων (Ca²⁺, Na⁺,



Εικόνα 1.6: Κρυσταλλική δομή του ομοτριμερούς σ1 υποδοχέα (Schmidt et al., 2016)

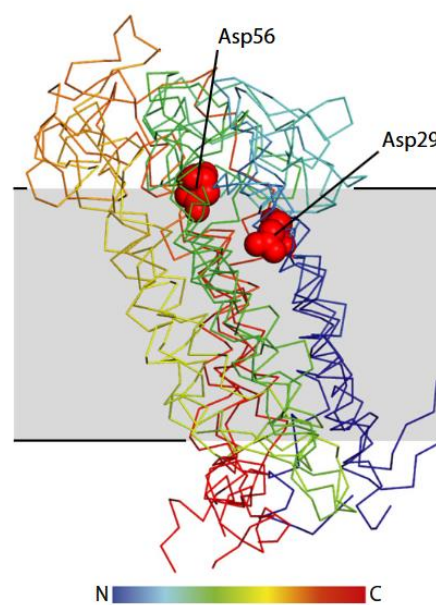
K⁺), και τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, αντίστοιχα (Pergolizzi et al., 2023). Όταν ενεργοποιούνται από αγωνιστές ή από μείωση των επιπέδων του ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, διαχωρίζονται από την πρωτεΐνη BiP, με την οποία φυσιολογικά δημιουργούν σύμπλοκο στις θέσεις MAM, και μετατοπίζονται για να σταθεροποιήσουν τους υποδοχείς IP3, διατηρώντας έτσι τη ροή του ασβεστίου μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων (Weng et al., 2017). Η ενεργοποίησή τους συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες, ενισχύει την κυτταρική επιβίωση και ενεργοποιεί αντι-αποπτωτικά μονοπάτια, προσφέροντας σημαντική νευροπροστασία.

Οι σ1 υποδοχείς συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση της λιπιδιακής ομοιόστασης, εντοπιζόμενοι σε περιοχές εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη, όπως τα οι λιπιδιακές σχεδίες (lipid rafts). Συνδέονται τόσο με ενδογενείς προσδέτες (π.χ. DHEA, προγεστερόνη, σφιγγοσίνη) όσο και με φαρμακευτικές ουσίες (π.χ. δεξτρομεθορφάνη, φλουβοξαμίνη, αλοπεριδόλη), παρουσιάζοντας ευρύ φαρμακολογικό προφίλ. Η πολυπλοκότητα της δράσης τους καθιστά τους σ1 υποδοχείς σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους για ποικίλες παθήσεις, όπως το Alzheimer, το Parkinson, το ALS, ο καρκίνος, οι ψυχιατρικές διαταραχές, αλλά και καταστάσεις όπως ο εθισμός, ο χρόνιος πόνος και η κατάθλιψη (Pergolizzi et al., 2023).

3.2. Σίγμα-2 Υποδοχείς (σ2R)

Οι σίγμα-2 υποδοχείς (σ2R) αποτελούν μια διακριτή κατηγορία μορίων που αναγνωρίστηκαν φαρμακολογικά από τη δεκαετία του 1990, ωστόσο η μοριακή τους ταυτότητα παρέμεινε αδιευκρίνιστη για περισσότερο από δύο δεκαετίες. Αν και αρχικά είχε προταθεί ότι ταυτίζονται με την πρωτεΐνη PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1), η υπόθεση αυτή απορρίφθηκε μέσω πειραμάτων σίγησης γονιδίων και ανάλυσης μοριακού βάρους (Nguyen et al., 2023). Πρόσφατα, το 2017, αποδείχθηκε ότι ο σ2 υποδοχέας ταυτίζεται με την πρωτεΐνη TMEM97 (Transmembrane protein 97) ή αλλιώς MAC30 (Meningioma-Associated Protein 30). Η λειτουργικός υποδοχέας βρίσκεται σε ομοδιμερή μορφή. Τα κατάλοιπα Asp29 και Asp56, όπως φαίνονται και στην [Εικόνα 1.7](#) αποτελούν τα καίρια σημεία για την πρόσδεση των εκλεκτικών προσδετών του σ2 υποδοχέα (Nguyen et al., 2023).

Οι σίγμα-2 υποδοχείς εκφράζονται ευρέως τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και σε περιφερικούς ιστούς, όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ και οι νεφροί. Ενδοκυτταρικά βρίσκονται κυρίως στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, αλλά πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει την παρουσία τους και σε άλλα μέρη, όπως στην κυτταρική μεμβράνη, στα λυσοσώματα και την πυρηνική μεμβράνη (Yang et al., 2020, Li et al., 2024). Η έκφρασή τους είναι αυξημένη σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο ενώ έχει τεκμηριωθεί η συμμετοχή τους στη νόσο Alzheimer, όπου αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των ολιγομερών του αμυλοειδούς-β (Zeng et al., 2020, Izzo et al., 2021). Επιπλέον, οι σ2 υποδοχείς φαίνεται να εμπλέκονται σε νευροψυχιατρικές



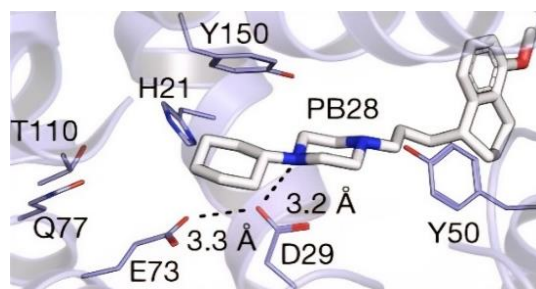
Εικόνα 1.7: Δομή του μονομερούς σ2R. Με έντονο κόκκινο φαίνονται τα σημεία πρόσδεσης των σ2L (Alon et al., 2017)

διαταραχές, όπως η σχιζοφρένεια, καθώς και σε καταστάσεις χρόνιου νευροπαθητικού πόνου (Li et al., 2022, Lizama et al., 2023). Η συσχέτισή τους με ευρύ φάσμα νόσων υψηλής κλινικής σημασίας έχει οδηγήσει, τα τελευταία χρόνια, σε εντατικοποίηση των ερευνητικών προσπαθειών για τη φαρμακολογική τους στόχευση, με σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών.

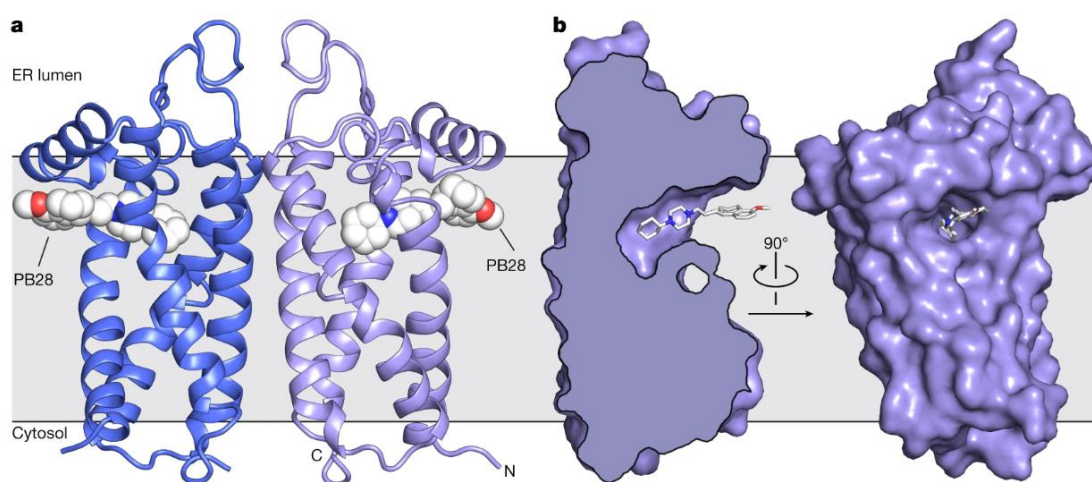
3.2.1. Δομή και σύμπλοκα που δημιουργεί ο σ2 υποδοχέας

Ο σ2 υποδοχέας (TMEM97) συναντάται ως ένα ομοδιμερές, με καθεμία από τις δύο υπομονάδες να διαθέτει τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες (TM1-TM4) που διατάσσονται σε μία χαρακτηριστική δομή τεσσάρων ελίκων (four-helix bundle), όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 1.9](#). Οι έλικες αυτές κάμπτονται ελαφρά λόγω συντηρημένων καταλοίπων προλίνης, δημιουργώντας μια κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα, στην οποία όπως απεικονίζει η [Εικόνα 1.8](#), μπορούν να προσδένονται οι σίγμα-2 προσδέτες (sigma-2 ligands, σ2L). Το διμερές σταθεροποιείται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης των ελίκων TM3, ενώ οι εξωκυτταρικοί βρόγχοι ECL1 και ECL2 σχηματίζουν «κάλυμμα» που αποκλείει πλήρως την κοιλότητα από το υδατικό περιβάλλον -συνήθως- του ενδοπλασματικού δικτύου. Αντί να ανοίγει προς τον αυλό του ER, η κοιλότητα διαθέτει πλευρική είσοδο προς τη λιπιδιακή διπλοστιβάδα, επιτρέποντας στους λιπόφιλους προσδέτες να εισέρχονται στην κοιλότητα πρόσδεσης χωρίς φορτίο λόγω της λιπόφιλης φύσης της μεμβράνης (Alon et al., 2021).

Μόλις εισέλθει ο προσδέτης, πρωτονιώνεται στο εσωτερικό της κοιλότητας και σχηματίζει ιοντικό δεσμό με το κατάλοιπο Asp29. Όπως παρατηρούμε στην [Εικόνα 1.8](#), η Asp56 απουσιάζει από της κοιλότητα πρόσδεσης, καθώς δεν συμβάλλει άμεσα στη σύνδεση του προσδέτη. Αντ' αυτού, ο ρόλος της έγκειται στην διατήρηση της σωστής γεωμετρίας της θέσης πρόσδεσης. Σε απόσταση ~3 Å από την Asp29, το κατάλοιπο Glu73 πιθανότατα πρωτονιώνεται και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με την ασπαράγίνη, σταθεροποιώντας περαιτέρω το «καπάκι» της κοιλότητας και υποβοηθώντας την αναγνώριση προσδετών (Alon et al., 2021).



Εικόνα 1.8: Σύνδεση προσδέτη (PB28) στην κοιλότητα του σ2 υποδοχέα (Alon et al., 2021)



Εικόνα 1.9: Αναπαράσταση της δομής του υποδοχέα σ2, συνδεδεμένου με τον σ2L PB28 (Alon et al., 2021)

Ο σ2 υποδοχέας σχηματίζει ποικίλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που μεσολαβούν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Τα σύμπλοκα αυτά είναι:

A. TMEM97-PGRMC1-LDLR

Το πλέον τεκμηριωμένο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του σ2 υποδοχέα (TMEM97) συγκροτείται με τις πρωτεΐνες PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) και LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor). Ο σχηματισμός αυτού του τριπλού συμπλόκου ενισχύει σημαντικά τη λειτουργία του LDLR, οδηγώντας σε αυξημένη ενδοκυττάρωση LDL και, κατ' επέκταση, σε μεγαλύτερη εισροή χοληστερόλης στο κύτταρο (Yang et al., 2020).

B. TMEM97-TSPO-PGRMC1-LDLR

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το σύμπλοκο που επάγει την εισροή της LDL στο κύτταρο είναι τετραμερές και αποτελείται από τις πρωτεΐνες TMEM97-PGRMC1-TSPO-LDLR ([Εικόνα 1.10A](#)). Η TSPO (Translocator Protein) φαίνεται να τροποποιεί αλλοστερικά τον TMEM97, ώστε να διευκολυνθεί η αλληλεπίδραση TMEM97-PGRMC1 (Thejer et al., 2023).

Γ. TMEM97-NPC1

Ο σ2 υποδοχέας επεμβαίνει στην ενδοκυτταρική κατανομή της χοληστερόλης αλληλεπιδρώντας και άρα αναστέλλοντας τον μεταφορέα NPC1 (NPC intracellular cholesterol transporter 1), ο οποίος υπό φυσιολογικές συνθήκες μετακινεί τη χοληστερόλη από τα λυσοσώματα προς το κυτταρόπλασμα. Καθώς τα σωματίδια LDL που έχουν εσωτερικευθεί οδηγούνται στα λυσοσώματα και αποικοδομούνται, η παραγόμενη ελεύθερη χοληστερόλη εγκλωβίζεται λόγω της αναστολής που έχει προκαλέσει το σύμπλοκο TMEM97-NPC1 ([Εικόνα 1.10A](#)), διαταράσσοντας την ομοιοστάση των λιπιδίων στο κύτταρο (Yang et al., 2020).

Δ. TMEM97-SOCE

Το σύμπλοκο SOCE (store-operated calcium entry) αποτελείται από 2 πρωτεΐνες: τον αισθητήρα ασβεστίου STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), ο οποίος ανιχνεύει την εξάντληση των αποθεμάτων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον διάυλο Orai1 που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και προκαλεί την εισροή ιόντων Ca^{2+} . Όταν στο ενδοπλασματικό δίκτυο ανιχνευθούν χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , ο STIM1 ενεργοποιείται, μετατοπίζεται και συνδέεται άμεσα με τον διάυλο Orai1, επάγοντας την διάνοιξη του. Ο σ2 υποδοχέας φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου SOCE ([Εικόνα 1.11](#)). Ωστόσο, παραμένει υπό συζήτηση το ποια είναι η κύρια πρωτεΐνη-στόχος της αλληλεπίδρασης. Το 2020, η επιστημονική ομάδα του Cantonero υποστήριξαν ότι ο σ2 υποδοχέας δημιουργεί σύμπλοκο με τον αισθητήρα STIM1 προωθώντας την αλληλεπίδραση του με τον διάυλο Orai1. Ωστόσο τον επόμενο χρόνο, η ίδια ερευνητική ομάδα μέσω co-IP (co-immunoprecipitation) ανακάλυψε ότι ο TMEM97 αλληλεπιδρά -και άρα δημιουργεί σύμπλοκο- άμεσα και πιο ισχυρά με το κανάλι Orai1 από ότι με τον αισθητήρα STIM1. Το σύμπλοκο TMEM97-Orai1 φαίνεται να διευκολύνει την αποτελεσματική είσοδο Ca^{2+} (Cantonero et al., 2021).

E. TMEM97-LRP6

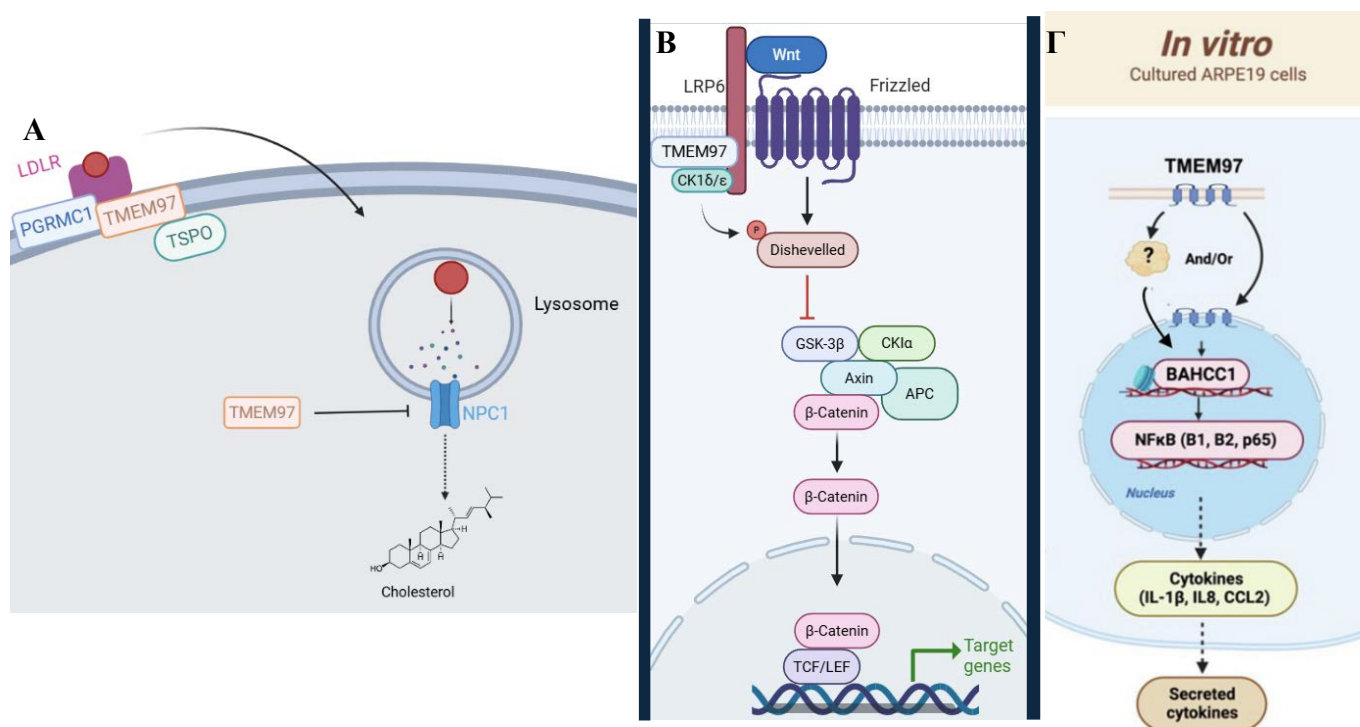
Ο TMEM97 συζευγνύεται με την LRP6 (Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6), ο οποίος συνεργάζεται με υποδοχείς της οικογένειας Frizzled, και στρατολογεί τις κινάσες CK1δ/ε, οι οποίες προσδένονται στο ίδιο σύμπλοκο ([Εικόνα 1.10B](#)). Οι CK1δ/ε φωσφορυλιώνουν στη συνέχεια την Dishevelled, ενεργοποιώντας το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης (Janovská et al., 2020, Zhu et al., 2021).

ΣΤ. TMEM97-BAHCC1

Η πρωτεΐνη BAHCC1 (BAH Domain Coiled Coil 1) αναγνωρίζει την μεθυλίωση H3K27_{me3} και προωθεί την σίγηση των γονιδίων που βρίσκονται κοντά στις τροποποιημένες ιστόνες (Fan et al., 2020). Σε πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι το σύμπλοκο TMEM97–BAHCC1, το οποίο απεικονίζεται στην [Εικόνα 1.10Γ](#) διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών σε κύτταρα επιθηλίου αμφιβληστροειδούς (RPE), πιθανώς μέσω της σίγησης κάποιων γονιδίων που αναστέλλουν την έκφραση των NFκB (Li et al., 2024).

Z. TMEM97- PrP^c / TMEM97-Aβ oligomer receptors

Ο πολυπρωτεϊνικός συναπτικός υποδοχέας των ολιγομερών Αβ, ο οποίος συγκροτείται κυρίως από τις πρωτεΐνες LILRB2 (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor Subfamily B Member 2), NgR1 (Nogo-66 Receptor 1) και PrP^c (Prion Protein), δεσμεύει τα διαλυτά ολιγομερή Αβ και πυροδοτεί μια σειρά ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ. ενεργοποίηση της κινάσης Fyn, φωσφορυλίωση υπομονάδων NMDA/AMPA), που τελικά οδηγούν σε συναπτοτοξικότητα. Ο σ2 υποδοχέας τόσο μόνος του όσο και σε σύμπλοκο με τον PGRMC1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των Αβ ολιγομερών, και κυρίως με την PrP^c, σταθεροποιώντας τους επιμέρους θύλακες σύνδεσης των Αβ ολιγομερών (Izzo et al., 2021, Colom-Cadena et al., 2024).



Εικόνα 1.10: Σχηματική απεικόνιση συμπλόκων που δημιουργεί ο σ2 υποδοχέας (TMEM97). (Α) Σύμπλοκο TMEM97-TSPO-PGRMC1-LDLR & TMEM97-NPC1 (Β) Σύμπλοκο TMEM97-LRP6 (Γ) Σύμπλοκο TMEM97-BAHCC1 (Li et al., 2024).

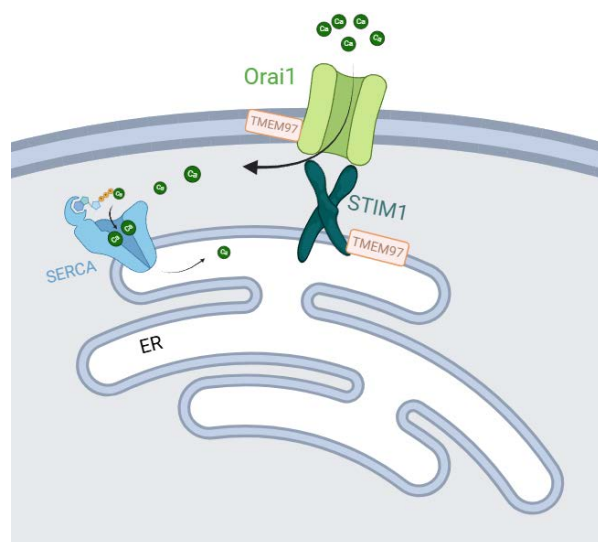
3.2.2. Φυσιολογικός ρόλος

Ο κύριος φυσιολογικός ρόλος των σ2 υποδοχέων αφορά τη ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Η σχέση αυτή διαφαίνεται αρχικά από τον κοινό λειτουργικό τομέα EXPERA (EXPanded EBP superfamily domain), τον οποίο μοιράζεται με άλλα γονίδια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της χοληστερόλης, όπως τα TM6SF (Transmembrane 6 Superfamily) και EBP

(Emopamil Binding Protein). Σε αντίθεση όμως με τις ισομεράσες στερολών EBP και TM6SF, ο TMEM97 δεν διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα. Αντ' αυτού έχει εξελιχθεί σε ρυθμιστικό «αισθητήρα» των αποθεμάτων χοληστερόλης. Είναι γονίδιο-στόχος του μεταγραφικού παράγοντα SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2): η έκφρασή του αυξάνεται όταν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα στερολών πέφτουν και καταστέλλεται όταν υπάρχει περίσσεια, δημιουργώντας μηχανισμό ανάδρασης (Yang et al., 2020).

Λειτουργικά, ο TMEM97 ρυθμίζει τη ροή χοληστερόλης με δύο κύριους τρόπους ([Εικόνα 1.10Α](#)). Πρώτον, σχηματίζει τριμερές σύμπλοκο TMEM97–PGRMC1–LDLR (ή τετραμερές TMEM97–TSPO–PGRMC1–LDLR, Thejer et al. 2023), το οποίο ενισχύει την ενδοκυττάρωση σωματιδίων LDL, αυξάνοντας την πρόσληψη εξωγενούς χοληστερόλης. Δεύτερον, αλληλεπιδρά με τον μεταφορέα NPC1, τροποποιώντας την απελευθέρωση της χοληστερόλης που προκύπτει από τη διάσπαση των LDL στα λυσοσώματα (Yang et al., 2020).

Ένας δεύτερος σημαντικός φυσιολογικός ρόλος των υποδοχέων σ2/TMEM97 στο εσωτερικό του κυττάρου αφορά τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Παρότι ο TMEM97 δεν αποτελεί άμεσο μεταφορέα ασβεστίου, επηρεάζει κρίσιμα τη λειτουργία του μηχανισμού SOCE μέσω της δημιουργίας συμπλόκου TMEM97-STIM1 ή TMEM97-Orai1, όπως περιγράφηκε παραπάνω ([Εικόνα 1.11](#)). Το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων είναι η διευκόλυνση της εισροής Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου (Cantonero et al., 2021, Cantonero et al., 2020).

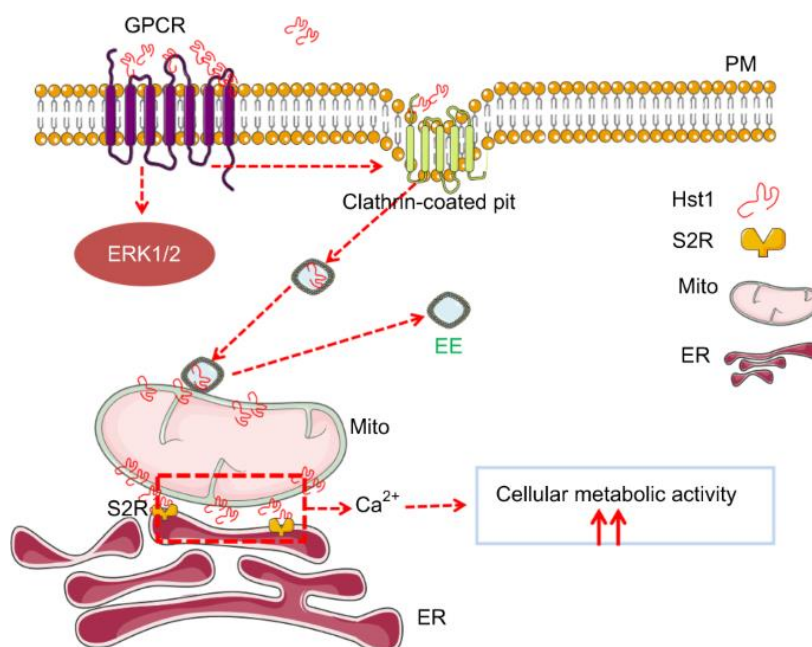


Εικόνα 1.11: Σχηματική απεικόνιση της δράσης που έχει ο σ2 υποδοχέας (TMEM97) στην ομοιόσταση του Ca^{2+}

Έρευνες σε ενδοθηλιακά, επιθηλιακά και κερατινοειδή κύτταρα αλλά και σε ινοβλάστες έχουν δείξει ο σ2R σχετίζεται με την μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, η ιστατίνη-1 (ενδογενής προσδέτης), όπως βλέπουμε στην [Εικόνα 1.12](#), αλληλεπιδρά τόσο με τον σ2 υποδοχέα που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όσο και με τα μιτοχόνδρια, φέρνοντας κοντά τα 2 αυτά οργανίδια. Το φαινόμενο ονομάζεται MERC (mitochondria-ER contacts) και έχει ως πιθανό αποτέλεσμα την μεταφορά Ca^{2+} από το ER στα μιτοχόνδρια, επάγοντας έτσι την ενεργοποίηση των αφυδρογονασών στον κύκλο του Krebs και αυξάνοντας τελικά την παραγωγή ATP. Ταυτόχρονα, τα MERCs συμμετέχουν και στην μεταφορά λιπιδίων από το ER στα μιτοχονδρίων, που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Ma et al., 2022). Επίσης, στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, μέσω του συμπλόκου TMEM97–BAHCC1 ([Εικόνα 1.10Γ](#)) ο σ2 υποδοχέας συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η ρύθμιση γίνεται επιγενετικά, μειώνοντας την έκφραση κάποιων γονιδίων που -με την σειρά τους- αναστέλλουν την έκφραση των NFκB (Li et al., 2024).

Ο τελευταίος και πιο πρόσφατος ρόλος που έχει αποδοθεί στους σίγμα-2 υποδοχείς αφορά τη συμμετοχή τους στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt σε επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς. Συγκεκριμένα, η σύνδεση του ενδογενούς προσδέτη 20(S)-υδροξυχοληστερόλης (20(S)-OHC) στον υποδοχέα φαίνεται να προάγει τη TMEM97-εξαρτώμενη σηματοδότηση της Akt

(TMEM97-dependent Akt signaling). Δυστυχώς, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση (Son et al., 2024). Η ενεργοποίηση της οδού Akt σε αυτά τα κύτταρα έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση, την αναγέννηση του επιθηλίου και την απόκριση σε οξειδωτικό στρες, διεργασίες κρίσιμες για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της λειτουργικότητας του κερατοειδούς (Chen et al., 2022)



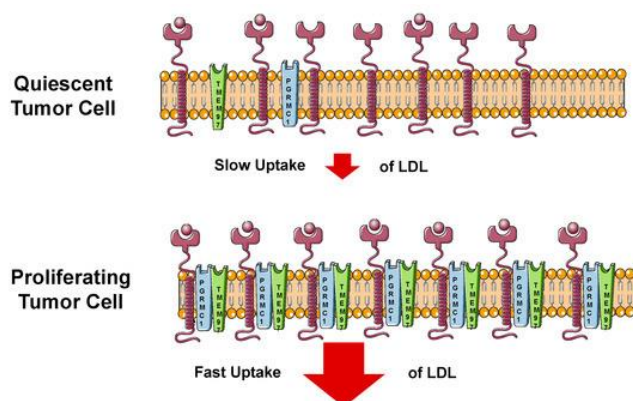
Εικόνα 1.12: Σχηματική απεικόνιση του έμμεσου ρόλου του $\sigma 2R$ στην μεταβολική δραστηριότητα μιτοχονδρίων (Ma et al., 2022)

3.2.3. Ρόλος του $\sigma 2R$ στον καρκίνο

Ο σίγμα-2 υποδοχέας ($\sigma 2R$ /TMEM97) παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε πολλές περιπτώσεις κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου (Zeng et al., 2020). Φαίνεται να διαδραματίζει πολυπαραγοντικό ρόλο στην ογκογένεση, ρυθμίζοντας βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η μεταστατική ικανότητα.

Αρχικά, έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη έκφραση του σίγμα-2 υποδοχέα ($\sigma 2R$ /TMEM97) σε καρκινικά κύτταρα συνδέεται με ενισχυμένη πρόσληψη χοληστερόλης μέσω του τριμερούς TMEM97-PGRMC1-LDLR (ή τετραμερούς TMEM97-TSPO-PGRMC1-LDLR) (Yang et al., 2020, Thejer et al., 2023). Η συνεργασία αυτών των πρωτεϊνών, όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 1.13](#), ενισχύει σημαντικά την ενδοκύττωση των LDL, σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι ο LDLR μόνος του, οδηγώντας σε αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης (Riad et al., 2018). Η χοληστερόλη είναι κρίσιμη για τα καρκινικά κύτταρα, καθώς υποστηρίζει τη βιογένεση των κυτταρικών μεμβρανών, τη σταθερότητα των λιπιδιακών σχεδίων στις οποίες συγκεντρώνονται υποδοχείς, όπως ο IGF-1R, ο EGFR και οι ERs (estrogen receptors). Έτσι, ενισχύονται σηματοδοτικά μονοπάτια που προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μεταστατική ικανότητα αλλά και την διαφυγή από την απόπτωση (Mollinedo & Gajate, 2020). Επιπλέον, η συσσώρευση χοληστερόλης στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί στην υπερπαραγωγή οξυστερολών, όπως η 27-HC (27-υδροξυχοληστερόλη), η οποία έχει συνδεθεί με την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την καταστολή της p53, την επαγωγή αγγειογένεσης

(μέσω της οδού STAT3–VEGF), καθώς και με τη επιθηλιακό-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), προάγοντας έτσι την επιθετικότητα των όγκων (Yang et al., 2020).



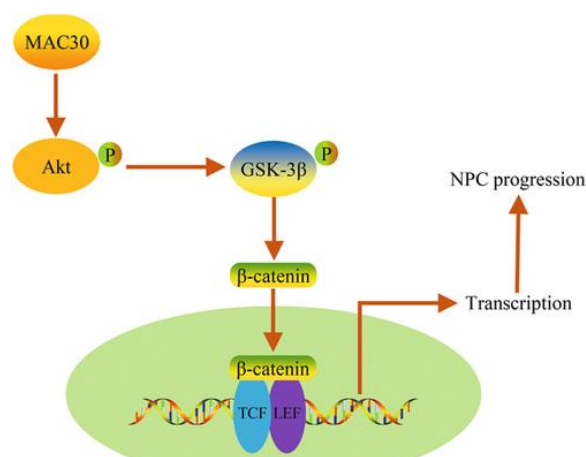
Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση της αυξημένης εισροής LDL από το τριμερές σύμπλοκο TMEM97-PGRMC1-LDLR στα καρκινικά κύτταρα (Zeng et al., 2020).

Όπως είδαμε νωρίτερα, ο $\sigma 2$ υποδοχέας παίζει, φυσιολογικά, ρόλο στην ομοιοστάση του Ca^{2+} , επηρεάζοντας τον μηχανισμό SOCE μέσω της ρύθμισης της σύζευξης STIM1–Orai1 (Εικόνα 1.11). Στο πλαίσιο του καρκίνου, αυτή η λειτουργία αποκτά ιδιαίτερη σημασία καθώς σε κύτταρα με αυξημένη έκφραση TMEM97 μπορεί να παρατηρηθεί και αυξημένη εισροή Ca^{2+} όπως έχει παρατηρηθεί στα MDA-MB-231 (καρκινικά κύτταρα μαστού) (Cantonero et al., 2020).

Ωστόσο, η δράση του $\sigma 2$ υποδοχέα δεν περιορίζεται μόνο σε αυτές τις λειτουργίες, αφού πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει την συμμετοχή του στην επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτό της Wnt/ β -κατενίνης. Όπως αναλύθηκε νωρίτερα, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, έχει βρεθεί ότι ο TMEM97 δημιουργεί σύμπλοκο με τον υποδοχέα LRP6 με αποτέλεσμα να στρατολογούνται οι κινάσες CK1δ/ε, οι οποίες τελικά ενεργοποιούν το μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης (Zhu et al., 2021).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σηματοδότηση της β -κατενίνης μέσω της δράσης του TMEM97 μπορεί να προκληθεί και μέσω εναλλακτικών οδών (Εικόνα 1.14). Συγκεκριμένα, σε κύτταρα ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (NPC), έχει φανεί ότι ο TMEM97 (MAC30) ενεργοποιεί την Akt, η οποία φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη GSK-3 β , με αποτέλεσμα να δρα η β -κατενίνη (Zhang et al., 2022).

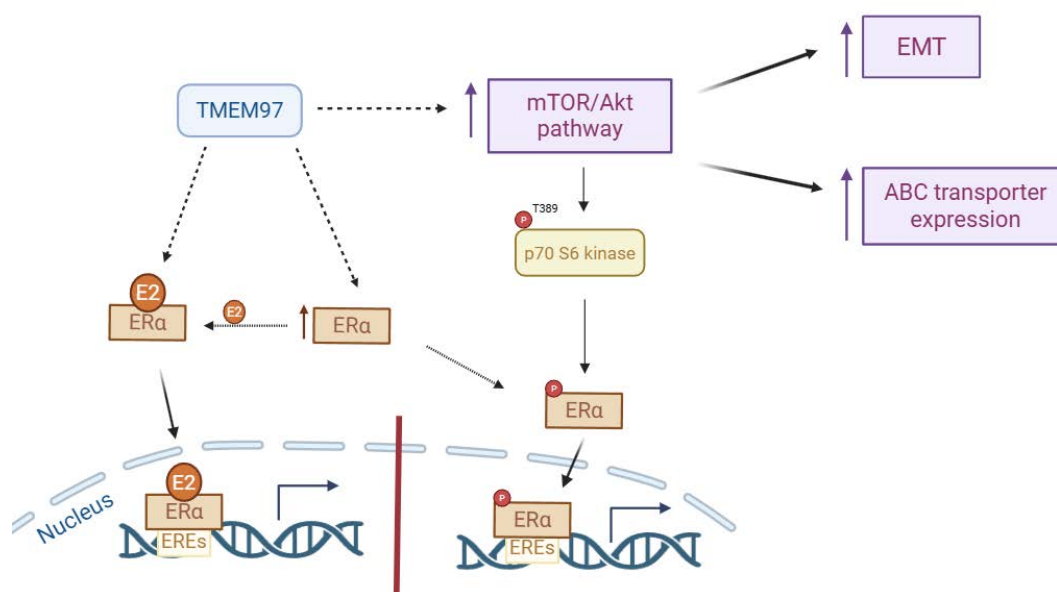
Επιπλέον, η δράση του TMEM97 φαίνεται να εκτείνεται και στη ρύθμιση ορμονοεξαρτώμενων υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι στον καρκίνο του προστάτη ο TMEM97 ρυθμίζει τόσο την έκφραση όσο και την δραστικότητα των υποδοχέων ανδρογόνου (AR) (Fang, 2024). Αντίστοιχα, στον ER⁺ καρκίνο του μαστού έχει τεκμηριωθεί η ικανότητα του TMEM97 να επηρεάζει την δραστικότητα των υποδοχέων οιστρογόνων τύπου α (ER α). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφρασή του αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου ER α , ενισχύει τη σύνδεση του ER α με την οιστραδιόλη (E2) και τα στοιχεία απόκρισης ERE (Estrogen Response Element), ενώ μέσω ενεργοποίησης της κινάσης S6K1, προάγει



Εικόνα 1.14: Επαγωγή μονοπατιού της β -κατενίνης μέσω TMEM97-dependent Akt signaling (Zhang et al., 2022).

τη φωσφορυλίωση του ERα. Η τροποποίηση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση του υποδοχέα ανεξαρτήτως παρουσίας προσδέτη (ligand-independent activation) (Zhang et al., 2023). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση της S6K1 δεν προκαλείται άμεσα από τον TMEM97, αλλά έμμεσα, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού mTOR, το οποίο αποτελεί θετικό ρυθμιστή της S6K1 (Εικόνα 1.15).

Στο ίδιο πλαίσιο, η μελέτη των Xu et al. (2024) σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου (CRC cells) επιβεβαίωσε τη δυνατότητα του TMEM97 να ενεργοποιεί το μονοπάτι mTOR/Akt, με άγνωστο προς στιγμήν τρόπο. Η ενεργοποίηση αυτού του άξονα, όπως αναπαριστάται στην Εικόνα 1.15, οδηγεί σε αυξημένη επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) και έκφραση μεταφορέων ABC (ανοχή σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα).



Εικόνα 1.15: Σχηματική απεικόνιση του ρόλου του σ2 υποδοχέα (TMEM97) στην επαγωγή της καρκινογένεσης

3.2.3.1 Ρόλος του s2R στον παγκρεατικό καρκίνο

Στον παγκρεατικό καρκίνο, τα επίπεδα έκφρασης του σίγμα-2 υποδοχέα (σ2R/TMEM97), τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, φαίνεται να ποικίλουν. Σε μελέτες που αφορούν παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, ο TMEM97 εμφανίζεται κυρίως υπερεκφρασμένος, ενώ σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις έχει καταγραφεί να υποεκφράζεται (Oyer et al., 2019, Niso et al., 2021). Αντιθέτως, σε δείγματα ασθενών παρατηρείται σταθερά μειωμένη έκφραση του TMEM97, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης σύμφωνα με δεδομένα από τη βάση TCGA (The Cancer Genome Atlas) και τα εργαλεία GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) και UALCAN (University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal) (Chandrashekar et al., 2022, Tang et al., 2019).

Από τους λειτουργικούς ρόλους του TMEM97 που αναφέρθηκαν προηγουμένως, μόνο ένας έχει επιβεβαιωθεί μέχρι σήμερα σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, και συγκεκριμένα αφορά την αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης μέσω της ενισχυμένης ενδοκύττωσης της LDL (Thejer et al., 2023). Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν ο TMEM97 εμπλέκεται και σε άλλους ογκογόνους μηχανισμούς στο πάγκρεας, όπως για παράδειγμα στην ρύθμιση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης, του οποίου η ενεργοποίηση έχει ήδη συσχετιστεί με τη δράση του TMEM97 στον καρκίνο του μαστού.

Συνοψίζοντας, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση, αφενός για να αποσαφηνιστεί ποια είναι ακριβώς η έκφραση του TMEM97 σε όγκους ασθενών και πώς αυτό συσχετίζεται με τις παρατηρήσεις από εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές, και αφετέρου για να διαπιστωθεί αν ο σ2 υποδοχέας διαδραματίζει και άλλους ρόλους στον καρκίνο.

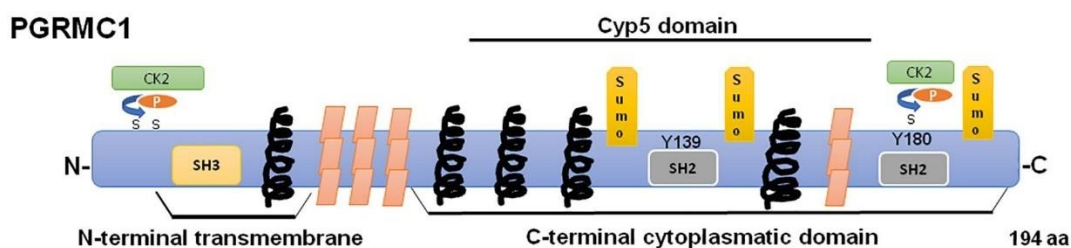
4. PGRMC1

4.1 Γενικά για την PGRMC1

Η πρωτεΐνη PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) είναι μια μικρή αιμοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 25 kDa, η οποία προσδένει προγεστερόνη (Cahill et al., 2016). Η πρωτεΐνη, η οποία αναπαρίσταται στην [Εικόνα 1.16](#), περιέχει τις παρακάτω διακριτές περιοχές:

- Ένα βραχύ N-τελικό υδρόφοβο τμήμα που διασχίζει μία φορά τη μεμβράνη και αγκυρώνει το μόριο στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα, τα μιτοχόνδρια ή την πλασματική μεμβράνη (McGuire & Espenshade, 2022).
- Έναν C-τελικό τμήμα στο οποίο υπάρχει μία επικράτεια τύπου κυτοχρώματος b_s (cytochrome b_s like domain). Η επικράτεια αυτή σχηματίζει ένα θύλακα στον οποίον προσδένεται ένα μόριο αίμης. Ο σίδηρος της αίμης δημιουργεί έναν ομοιοπολικό δεσμό με το κατάλοιπο Tyr113, ενώ ταυτόχρονα τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys105, Tyr107, Lys163, and Tyr164 δημιουργούν ασθενείς δεσμούς υδρογόνου με τις προπιονικές ομάδες της αίμης (Badve & Meier, 2024).

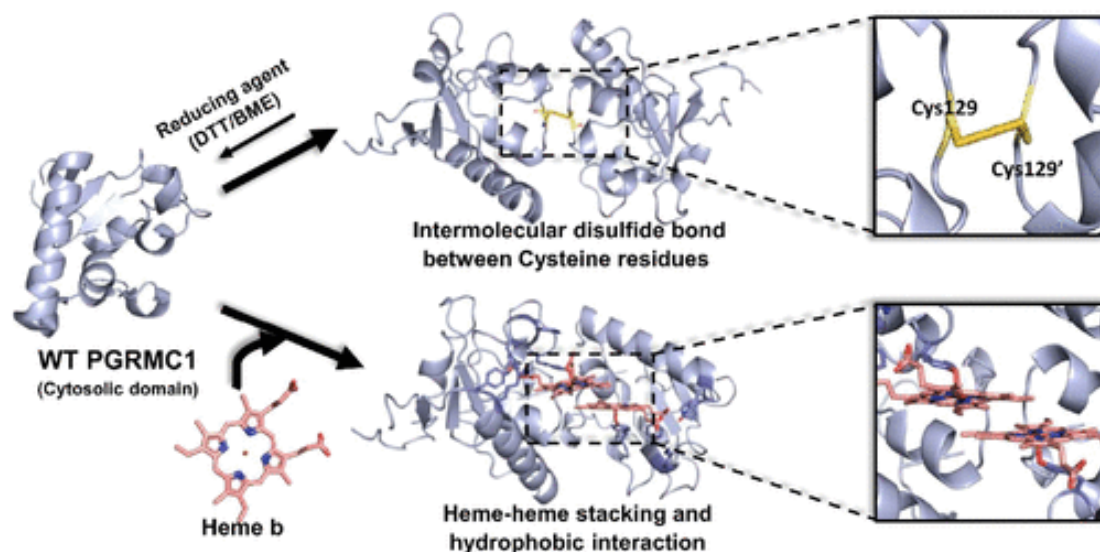
Η PGRMC1 φέρει δύο μοτίβα δέσμευσης Src Homology 2 (SH2) στα αμινοξέα 137–147 και 177–183, καθώς και ένα μοτίβο Src Homology 3 (SH3) στα αμινοξέα 62–67. Εντός αυτών των περιοχών εντοπίζονται τρία υποστρώματα φωσφορυλίωσης της Casein Kinase 2 (CK2), γεγονός που συνηγορεί στην υπόθεση ότι η CK2 ρυθμίζει κρίσιμες λειτουργίες της PGRMC1 (Cahill, 2017). Πράγματι, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μετα-μεταφραστικές φωσφορυλιώσεις της PGRMC1 είναι απαραίτητες για την ενεργοποίησή της και ιδίως για τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού και της διεργασίας του κυτταρικού κύκλου (Thejer et al., 2020).



Εικόνα 1.16: Απεικόνιση της πρωτεΐνης PGRMC1 με τα διακριτά της μέρη (Velázquez Hernández et al., 2022)

Η πρωτεΐνη PGRMC1 εντοπίζεται κυρίως σε ομοδιμερή μορφή, με τον διμερισμό της να προκύπτει μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο μορίων αίμης ([Εικόνα 1.17](#)). Συγκεκριμένα, ο σίδηρος κάθε αίμης μπορεί να σχηματίσει συνολικά έξι ομοιοπολικούς δεσμούς: τέσσερις με τα άτομα αζώτου του πορφυρινικού δακτυλίου και έναν με την PGRMC1 (μέσω της Tyr113). Η έκτη συντονιστική θέση του σιδήρου παραμένει ελεύθερη. Αυτή η θέση μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικό δεσμό με τον σίδηρο ενός άλλου μορίου αίμης που είναι συνδεδεμένο σε μονομερές PGRMC1, φέρνοντας, έτσι, σε στενή επαφή τα δύο μονομερή της PGRMC1 (Badve & Meier, 2024). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι

ο διμερισμός της PGRMC1 μπορεί να γίνει και ανεξάρτητα της αίμης μέσω της δημιουργίας ενός δισουλφισικού δεσμού, όπως φαίνεται στο πάνω τμήμα της Εικόνας 1.17 (Badve & Meier, 2024). Το διμερές που δημιουργείται μπορεί να επάγει κάποιες από τις βιολογικές του δράσεις, ακόμη και απουσίας αίμης (McGuire et al., 2021).



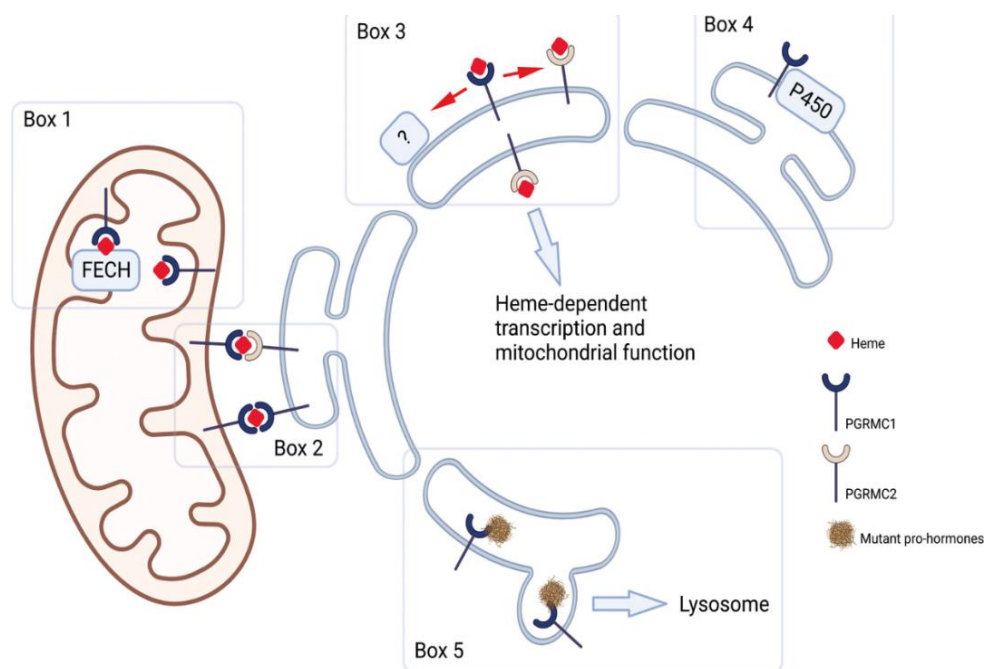
Εικόνα 1.17: Η πρωτεΐνη PGRMC1 και οι πιθανοί τρόποι διμερισμού της (Badve & Meier, 2024).

Αναφορικά με τη σύνδεση της PGRMC1 με την προγεστερόνη, έχουν προταθεί τρεις μη συσχετισμένοι μεταξύ τους μηχανισμοί. Στο πρώτο σενάριο, η προγεστερόνη δεν αλληλεπιδρά άμεσα με την PGRMC1, αλλά έμμεσα επεμβαίνει στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης. Αυτές οι μεταβολές επηρεάζουν στη συνέχεια τη στερεοδιάταξη, τις αλληλεπιδράσεις, τη δραστηριότητα και τις λειτουργίες της PGRMC1 (Bai et al., 2021, Peluso et al., 2012, Sabbir, 2019). Το δεύτερο σενάριο προτείνει ότι συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της PGRMC1 είναι απαραίτητες για την άμεση αλληλεπίδραση με την προγεστερόνη. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση από την Casein Kinase 2 (CK2) στη θέση Ser181 αποτελεί κρίσιμη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της PGRMC1 από τις προγεστίνες μεδροξυπρογεστερόνη, νορεθιστερόνη και διενογέστη στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MCF7 και T47D (Schneck et al., 2013, Willibald et al., 2017). Τέλος, σύμφωνα με μία άλλη θέση, η PGRMC1 ρυθμίζει την κυτταρική απόκριση στην προγεστερόνη ελέγχοντας τη μεμβρανική βιοδιαθεσιμότητα των υποδοχέων της, ιδίως μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον μεμβρανικό υποδοχέα προγεστερόνης α (mPR α) (Thomas, 2022, Cahill et al., 2016).

4.2 Φυσιολογικός ρόλος της PGRMC1

Η πιο γνωστή λειτουργία του PGRMC1 είναι να ενεργοποιεί, σταθεροποιώντας μετα-μεταφραστικά, αρκετά ένζυμα της οικογένειας CYP, τουλάχιστον 29 (Εικόνα 1.18). Κάποια από αυτά τα ένζυμα είναι το Cyp51a1, το οποίο συμμετέχει στην βιοσύνθεση χοληστερόλης, το CYP21 το οποίο μετατρέπει την προγεστερόνη σε δεοξυκορτικοστερόνη και τα CYP1A2 & CYP3A4, τα οποία συμμετέχουν στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών (χημειοθεραπευτικά π.χ Δοξορουβικίνη) (Kabe et al., 2016, McGuire & Espenshade, 2022). Μάλιστα, σε ορισμένους τύπους κυτοχρωμάτων P450, όπως το ένζυμο apo-CYB5,

η PGRMC1 λειτουργεί ως μεταφορέας αίμης, προωθώντας τη δέσμευσή της στο ένζυμο και ενεργοποιώντας το (McGuire & Espenshade, 2022).



Εικόνα 1.18: Απεικόνιση των ρόλων της PGRMC1 (1) συνδέεται με τη FECH στα μιτοχόνδρια, (2) Μεταφορά της αίμης μεταξύ οργανιδίων ή προς την PGRMC2 του ενδοπλασματικού δικτύου (3) ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις ελεύθερης αίμης (4) σταθεροποιεί κυτοχρώματα P450 και (5) συμβάλλει στη απομάκρυνση λανθασμένα αναδιπλωμένων προορμονών (McGuire & Espenshade, 2022)

Πέρα όμως από τον ρόλο της στη σταθεροποίηση και λειτουργία των κυτοχρωμάτων P450, η PGRMC1 έχει αναδειχθεί ως βασικός ρυθμιστής της ομοιόστασης της αίμης και του σιδήρου στο κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να συνδέεται με το ένζυμο FECH (φεροκαταλάση), όπως φαίνεται στην [Εικόνα 1.18](#), το οποίο είναι το τελευταίο στην βιοσύνθεση της αίμης, και να προσλαμβάνει από αυτό την νεοσχηματισμένη αίμη (McGuire & Espenshade, 2022). Ωστόσο, όταν η PGRMC1 είναι ήδη συνδεδεμένη με αίμη, τότε λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του ενζύμου (Piel et al., 2016). Επίσης, μπορεί να μεταφέρει την αίμη από τα μιτοχόνδρια στο ER, λειτουργώντας ουσιαστικά ως πρωτεΐνη-συννοδός της αίμης (chaperon). Στο ER, μεταφέρει το μόριο αίμης στην PGRMC2 ([Εικόνα 1.18](#)), η οποία με την σειρά της ενεργοποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου επάγει την μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην λειτουργία των μιτοχονδρίων (π.χ., Rev-Erba, BACH1) και -μόνο στον λιπώδη ιστό- στην θερμογένεση (McGuire & Espenshade, 2022). Τέλος, αναφορικά με τον σίδηρο, συμμετέχει στην ομοιόστασή του, αλληλεπιδρώντας με τον μεταφορέα TFRC (Transferrin Receptor) ο οποίος μεταφέρει Fe^{2+} από τα ενδοσώματα στα μιτοχόνδριά του. Έτσι, ρυθμίζει την βιοδιαθεσιμότητα του Fe^{2+} για την παραγωγή αίμης (Piel et al., 2016).

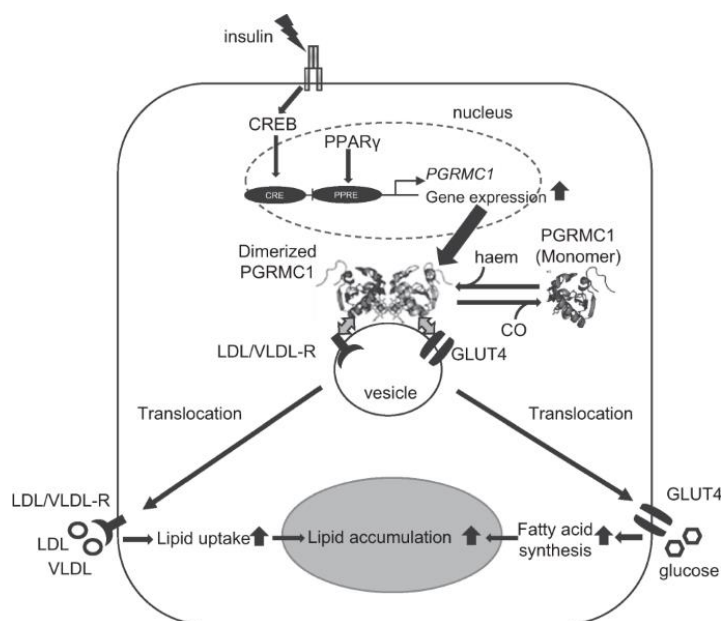
Άλλοι βιολογικοί ρόλοι της PGRMC1 περιλαμβάνουν:

1. Την συμμετοχή της στην ομοιόσταση του Ca^{2+} . Αλληλεπιδρά με τον μεταφορέα TPC1 (Two-Pore Channel 1), ενισχύοντας τη μεταφορά ασβεστίου από τα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλα, προάγει τον σχηματισμό περιοχών επαφής (MCSs) μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων, αυξάνοντας έτσι τη ροή Ca^{2+} από το ER στα

μιτοχόνδρια και ενισχύοντας τους μεταβολικούς ρυθμούς των μιτοχονδρίων. (Gunaratne et al., 2023).

2. Την συμμετοχή της στην ομοιόσταση των λιπιδίων ([Εικόνα 1.19](#)). Στον λιπώδη ιστό, η ινσουλίνη επάγει την μεταγραφή του γονιδίου του PGRMC1 (λόγω στοιχείων CRE που βρίσκονται ανοδικά). Όταν διμεριστεί, η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τους μεταφορείς LDLR/VLDLR και GLUT4 και τους μεταφέρει στην κυτταρική μεμβράνη (Furuhata et al., 2020). Ταυτόχρονα, σε καρκινικά κύτταρα του μαστού έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά - ρυθμίζοντας θετικά- πρωτεΐνες, όπως οι SCID1, FDFT1 και CYP51 που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των λιπιδίων και της χοληστερόλης (Asperger et al., 2020). Έτσι, ο PGRMC1 φαίνεται έμμεσα, μέσω της συμμετοχής του στην παραγωγή χοληστερόλης, να επάγει και την στεροειδογένεση στα ωοθηκικά κύτταρα (Peluso & Pru, 2014).
3. Την αναγνώριση και απομάκρυνση λανθασμένα αναδιπλωμένων προορμονών ([Εικόνα 1.18](#)). Πιο συγκεκριμένα, Ο PGRMC1 μέσω του luminal domain εντοπίζει προορμόνες μικρού μοριακού βάρους (<150 kDa), όπως η προ-ινσουλίνη, που δεν έχουν διπλωθεί σωστά. Στη συνέχεια, συνεργάζεται με την RTN3 (Reticulon 3), η οποία ενεργοποιεί το σύστημα ER-phagy, οδηγώντας τις ελαττωματικές πρωτεΐνες προς τα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Chen et al., 2021).

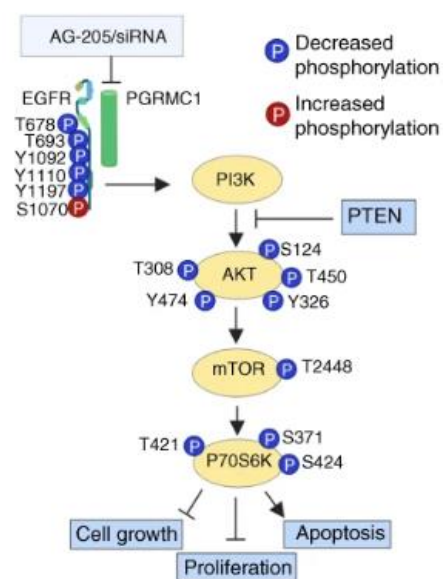
Την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών. Ο PGRMC1 δεσμεύει την προγεστερόνη αναστέλλοντας τα Tcf/Lef-εξαρτώμενα γονιδια (γνωστά και ως Wnt target genes) όπως για παράδειγμα είναι τα γονίδια c-myc και c-jun. Έτσι μειώνεται η μίτωση αλλά και η απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο PGRMC1 συμμετέχει στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κοκκιωδών κυττάρων και κατά συνέπεια στη διαδικασία της θυλακιογένεσης (Peluso & Pru, 2014). Σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) διαπιστώνονται σημαντικά αυξημένα επίπεδα PGRMC1 στο πλάσμα, στον ωοθηκικό ιστό και στα κοκκιώδη κύτταρα, γεγονός που συνδέεται με αναστολή της απόπτωσης των κοκκιωδών κυττάρων (Zhou et al., 2023)



Εικόνα 1.19: Επαγωγή της μεταγραφής της PGRMC1 και η δράση της στα λιποκύτταρα (Asperger et al., 2020)

4.3 PGRMC1 και καρκινογένεση

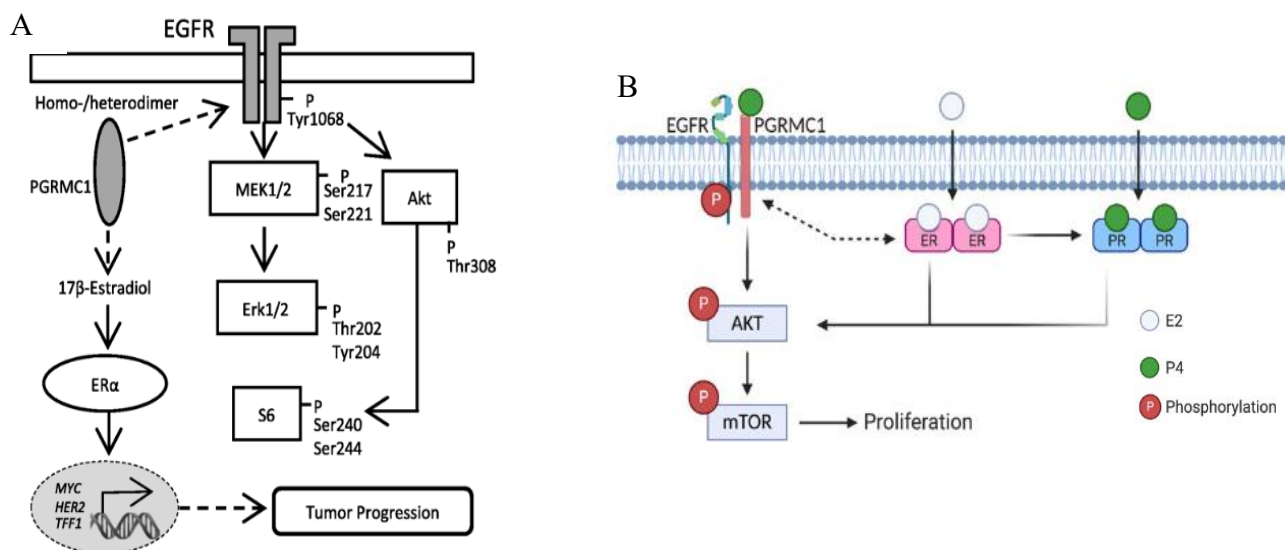
Κατά την καρκινογένεση, η PGRMC1 ενισχύει την ανάπτυξη και την επιθετικότητα των όγκων μέσω διαφόρων μηχανισμών. Ο κυρίαρχος τρόπος δράσης της είναι η αλληλεπίδραση της διμερούς μορφής της με τον υποδοχέα EGFR, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, πιθανώς μέσω επαγωγής φωσφορυλίωσης. Παρά το ότι ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως η απουσία αλληλεπίδρασης PGRMC1–EGFR αυξάνει τη φωσφορυλίωση του EGFR στη θέση Ser¹⁰⁷⁰, ενισχύοντας την ενδοκύτωση και την αποικοδόμηση του υποδοχέα και μειώνοντας τη διαθεσιμότητα και τη σηματοδοτική του ικανότητα στην επιφάνεια του κυττάρου, όπως απεικονίζεται στην [Εικόνα 1.20](#) (Pedroza et al., 2020). Προϋπόθεση για αυτή τη ρύθμιση αποτελεί η φωσφορυλίωση της PGRMC1 στη θέση Tyr180 ([Εικόνα 1.16](#)), η οποία έχει επίσης συνδεθεί με άλλες ογκογόνες λειτουργίες της πρωτεΐνης, όπως ο έλεγχος του σχήματος των κυττάρων, της γλυκόλυσης και της μορφολογίας των μιτοχονδρίων (Thejer et al., 2020).



Εικόνα 1.20: Απεικόνιση της δράσης που έχει η απουσία του PGRMC1 στον EGFR και στο downstream μονοπάτι (Pedroza et al., 2020)

Ο δεύτερος μηχανισμός μέσω του οποίου η PGRMC1 συμβάλλει στην ογκογένεση αφορά τη δράση της στον υποδοχέα οιστρογόνων ERα, ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού που είναι θετικός για τον υποδοχέα αυτό (ER-positive breast cancer). Συγκεκριμένα, η PGRMC1 φαίνεται να ενισχύει τη λειτουργία του ERα ([Εικόνα 1.21B](#)), αν και ο ακριβής μοριακός μηχανισμός παραμένει μέχρι στιγμής ασαφής (Barata et al., 2024). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η PGRMC1 ρυθμίζει και την έκφραση του ERα, καθώς η μείωση των επιπέδων της PGRMC1 συνοδεύεται από ανάλογη μείωση και στα επίπεδα του υποδοχέα ERα στα καρκινικά κύτταρα (Pedroza et al., 2021).

Εμμεσα, η PGRMC1 επηρεάζει τα επίπεδα των ενδοκυττάρων οιστρογόνων μέσω της ενεργοποίησης ενζύμων της οικογένειας CYP που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των στεροειδών. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί το ένζυμο CYP19 (αρωματάση), το οποίο καταλύει τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε 17β-εστραδιόλη ([Εικόνα 1.21A](#)), αυξάνοντας έτσι την παραγωγή οιστρογόνων εντός του κυττάρου (Barata et al., 2024). Η ενίσχυση της έκφρασης και της δραστηριότητας του ERα από την PGRMC1 έχει ως αποτέλεσμα την προαγωγή ογκογενετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, ο ενεργοποιημένος ERα συμβάλλει στη φωσφορυλίωση του υποδοχέα EGFR, καθώς και στη ρύθμιση των downstream μορίων του μονοπατιού, όπως οι πρωτεΐνες AKT και mTOR, που είναι κρίσιμες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (Pedroza et al., 2021).



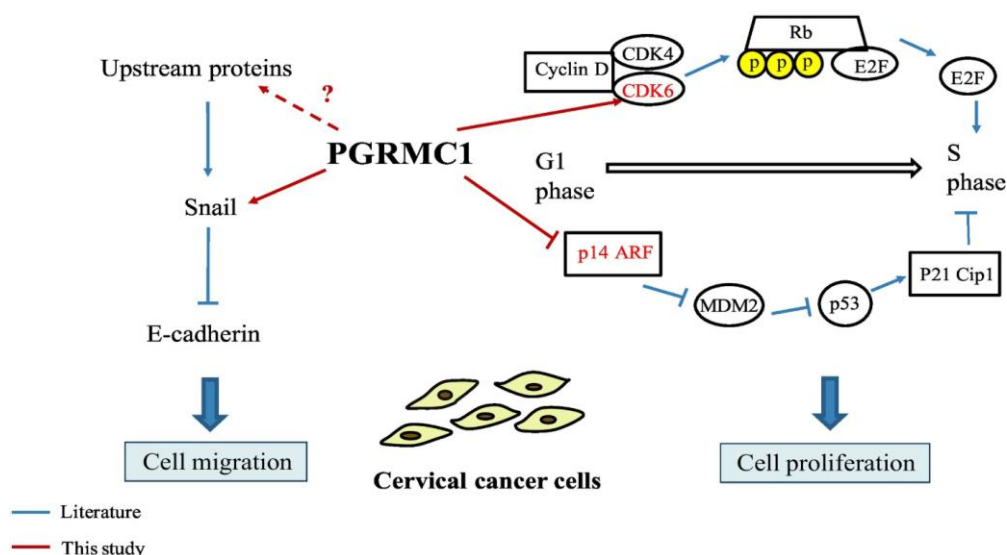
Εικόνα 1.21: (Α) Δράση του PGRMC1 στον EGFR και στον ERα (Asperger et al., 2020) (Β) Δράση του PGRMC1 στο ERα, ο οποίος προωθεί την φωσφορυλίωση και άρα ενεργοποίηση την Akt στο μονοπάτι Akt-mTOR (Pedroza et al., 2021)

Η PGRMC1, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, συμμετέχει ενεργά στην ομοιόσταση της αίμης και του Fe^{2+} , ρυθμίζοντας τα επίπεδά τους στα κύτταρα. Στα καρκινικά κύτταρα, λοιπόν, η αυξημένη έκφραση της PGRMC1 μπορεί να συμβάλλει στην προστασία από τη φερρόπτωση, καθώς δεσμεύοντας το ασταθές μόριο της αίμης αποτρέπει έμμεσα τη δημιουργία ελεύθερων ριζών μέσω αντιδράσεων Fenton. Επιπλέον, η PGRMC1 μειώνει τα επίπεδα ελεύθερου Fe^{2+} και φαίνεται να επάγει την παραγωγή γλουταθειόνης, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων. Σε μελέτες σε τριπλά αρνητικά καρκινικά κύτταρα, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης της PGRMC1 και υψηλότερων επιπέδων γλουταθειόνης, γεγονός που συνδέεται με αυξημένη αντοχή στη φερρόπτωση και προώθηση της καρκινικής επιβίωσης (Zhao et al., 2023).

Τέλος, ο PGRMC1 φαίνεται να σχετίζεται με την μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Έρευνά που πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου απέδειξε ότι ο PGRMC1 επάγει την έκφραση του Snail, μιας καθοριστικής πρωτεΐνης που συμμετέχει στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 1.22). Στην ίδια έρευνα, φάνηκε ότι η PGRMC1 προκαλεί ταυτόχρονη:

- i. Μείωση στην έκφραση των p14ARF & P21Cip1 και
- ii. Αύξηση στην έκφραση της CDK6.

Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν άμεσα τον κυτταρικό κύκλο, προωθώντας, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 1.22, την κυτταρική διαίρεση (Shih et al., 2019).



Εικόνα 1.22: Δράση της PGRMC1 στο EMT και στον κυτταρικό κύκλο (Shih et al., 2019)

5. Προσδέτες των σίγμα-2 Υποδοχέων

Οι προσδέτες των σίγμα-2 υποδοχέων αποτελούν μία ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα μορίων, η οποία περιλαμβάνει κυρίως συνθετικές ενώσεις σχεδιασμένες για φαρμακολογική χρήση. Οι ενώσεις αυτές έχουν αναπτυχθεί στο πλαίσιο της αναζήτησης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για παθήσεις όπου ο σ2 υποδοχέας διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο, όπως ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί μόνο δύο ενδογενείς προσδέτες του σ2 υποδοχέα: η 20(S)-υδροξυχοληστερόλη [20(S)-OHC], ένα οξειδωμένο παράγωγο της χοληστερόλης και η ιστατίνη-1 (histatine-1) μία φυσική αντιμικροβιακή πεπτιδική πρωτεΐνη.

Η κατηγοριοποίηση των σίγμα-2 προσδετών βασίζεται κυρίως σε φαρμακολογικά κριτήρια: πρώτον, στην συγγένεια σύνδεσης τους στους σ2 υποδοχείς, η οποία εκφράζεται με τις σταθερές K_i ή K_d (όσο μικρότερη η τιμή, τόσο ισχυρότερη η δέσμευση), και δεύτερον, στην εκλεκτικότητα τους έναντι των σι υποδοχέων, η οποία υπολογίζεται ως λόγος $K_i(\sigma_1)/K_i(\sigma_2)$ (Mach et al., 2013). Εκτός των φαρμακολογικών κριτηρίων, έχει χρησιμοποιηθεί και λειτουργική κατηγοριοποίηση των σ2 προσδετών, η οποία -σύμφωνα με τους Zeng et al. (2014)- γίνεται σύμφωνα με τη κυτταροτοξικότητα που έχουν αναλογικά με την σιρμασίνη, που θεωρήθηκε πρότυπος σ2 αγωνιστής

5.1 Ενδογενείς προσδέτες

Η **20(S)-υδροξυχοληστερόλη** [20(S)-OHC] είναι ένας από τους δύο ενδογενείς προσδέτες των σ2-υποδοχέων και παράγεται με υδροξυλίωση της χοληστερόλης στη θέση C20 από ένζυμο της οικογένειας κυτοχρώματος P450.

Η πρόσδεση της 20(S)-OHC αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση TMEM97-TSPO, προκαλώντας διάλυση του τετραμερούς συμπλόκου TMEM97-TSPO-PGRMC1-LDLR. Η αποσυναρμολόγηση αυτή απελευθερώνει το TMEM97, το οποίο μετακινείται στα λυσοσώματα και σχηματίζει νέο σύμπλοκο με την NPC1. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται η αναστολή εξαγωγής χοληστερόλης από τα

λυσοσώματα προς το κυτταρόπλασμα, ενώ παράλληλα περιορίζεται και η ενδοκύττωση LDL λόγω της διάλυσης του συμπλόκου με τον LDLR (Thejer et al., 2023).

Ο διπλός αυτός μηχανισμός συνιστά έναν βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης: σε συνθήκες υψηλής χοληστερόλης αυξάνεται η 20-OHC, η οποία με τη σειρά της μειώνει τόσο την πρόσληψη όσο και την απελευθέρωση της χοληστερόλης από τα λυσοσώματα, επαναφέροντας τα επίπεδα σε φυσιολογικά όρια.

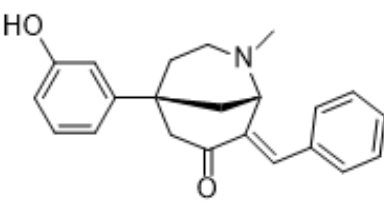
Πέρα από τη ρύθμιση της χοληστερόλης, σε επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς έχειδειχθεί ότι η πρόσδεση της 20-OHC στον σ2-υποδοχέα (TMEM97) ενεργοποιεί τον άξονα σηματοδότησης Akt/GSK3β, μέσω ενεργοποίησης της TMEM97-dependent Akt σηματοδότησης (Zhang et al., 2022).

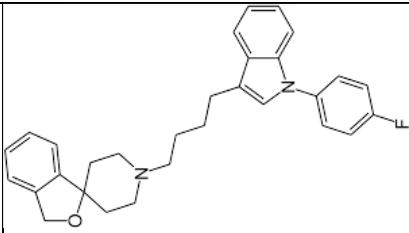
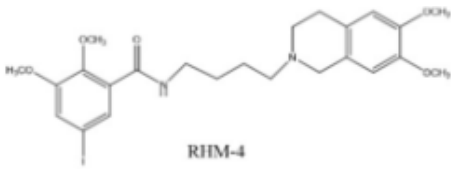
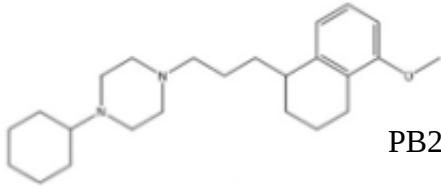
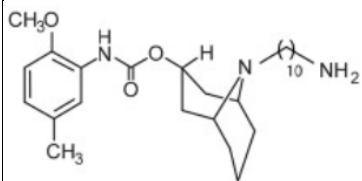
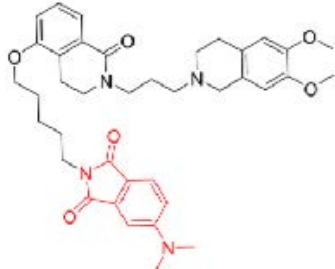
Ο 2^{ος} ενδογενής προσδέτης των σ2 υποδοχέων είναι η **ιστατίνη-1**, ένα πεπτίδιο που είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του δράσεις και για την συμμετοχή του στην επούλωση τραυμάτων. Η σύνδεση του στους σ2 υποδοχείς, φαίνεται να αυξάνει τον μεταβολικό ρυθμό των μιτοχονδρίων (Ma et al., 2022). Επιπλέον, έχει γίνει αναφορά από τους Han et al. (2024) ότι σε καρκινικά κύτταρα του ενδοθηλίου η ιστατίνη-1 μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη, μέσω της ενεργοποίησης των σ2 υποδοχέων.

5.2 Εξωγενείς προσδέτες

Οι εξωγενείς προσδέτες των σ2 υποδοχέων (συνθετικοί) έχουν αποτελέσει ακρογωνιαίοί λίθοι στην έρευνα των σ2 υποδοχέων, παρέχοντας εργαλεία για τη χαρτογράφηση της κατανομής, την κατανόηση των μονοπατιών σηματοδότησης και την προώθηση νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί ή παραχθεί περίπου 650 τέτοια μόρια, με διαφορετικά χαρακτηριστικά το καθένα. Οι σ2 προσδέτες (s2L) έχουν συγκεντρωθεί σε μία ειδική βάση δεδομένων που διευκολύνει την αναζήτηση και τη στοχευμένη αξιοποίησή τους (<http://www.researchdsf.unict.it/S2RSLDB/index.php>). Οι πιο διαδεδομένοι εξωγενείς προσδέτες των σ2 υποδοχέων είναι οι αγωνιστές που φαίνονται στον Πίνακα 1.1 (Hanafi, 2021):

Πίνακας 1.1 : Αγωνιστές σ2 υποδοχέα: χημικές δομές και χαρακτηριστικά τους

Κατηγορίες	Χημική Δομή	σ2L	Χαρακτηριστικά
Morphans	CB64 	CB64D, CB184	1 ^η γενιά σ2 εκλεκτικών μορίων - Υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους σ2R - Αγωνιστές

Siramesine		Siramesine	Ενότητα 6
Benzamides	 RHM-4	RHM-4 and ISO-1	- Βελτιστοποιημένα παράγωγα ανταγωνιστών ντοπαμίνης - Από τα πιο εκλεκτικά σύνδεσης στον S2R
Cyclohexyl-piperazines	 PB28	PB28, F281	- Μεγάλα λιπόφιλα μόρια - PB28: υψηλή συγγένεια για S2R και S1R
Granatanes	 SW43	SW43, WC26, SV119	Η πιο υποσχόμενη κατηγορία S2L
Ραδιοσημασμένοι προσδέτες	 NO1	[3H]DTG, [18F]RHM, [18F]ISO-1, NO1	- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε PET απεικόνιση - Παρουσιάζουν υψηλό tumor-to-background ratio

6. Σιραμεσίνη

6.1 Γενικά: Σιραμεσίνη

Η σιραμεσίνη (Lu-28-179) σχεδιάστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 από τη φαρμακευτική εταιρεία H. Lundbeck ως τροποποιημένο παράγωγο των αρυλ-πιπεραζινικών αγωνιστών του σεροτονινεργικού υποδοχέα 5-HT_{1A}. Παρά τα ενθαρρυντικά προκλινικά ευρήματα που υποδείκνυαν αγχολυτική δράση, οι κλινικές δοκιμές φάσης I/II δεν κατέδειξαν στατιστικά σημαντικό όφελος σε ασθενείς με αγχώδεις διαταραχές, με συνέπεια και τη διακοπή τους (Klawonn et al., 2017). Λίγο αργότερα, ωστόσο, αποκαλύφθηκε ότι η σιραμεσίνη διαθέτει υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους 5₂-υποδοχείς και χρησιμοποιήθηκε ως ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης ([³H]Lu-28-179) για τον

προσδιορισμό των σ_2R σε εγκεφαλικούς και περιφερειακούς ιστούς (Søby et al., 2002). Όταν διαπιστώθηκε ότι οι σ_2 υποδοχείς υπερεκφράζονται σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα νεοπλασματικά κύτταρα, η χρήση της σιραμεσίνης μετατοπίστηκε στην θεραπευτική στόχευση όγκων (Ostenfeld et al., 2005).

6.2 Ο ρόλος της Σιραμεσίνης στον καρκίνο

Η πρώτη συστηματική τεκμηρίωση της αντικαρκινικής δράσης της σιραμεσίνης αποκάλυψε έναν «λυσosomalικό» άξονα κυτταρικού θανάτου: το μόριο συσσωρεύεται στα λυσοσώματα, αυξάνει το pH εντός των οργανιδίων, αποσταθεροποιεί τη μεμβράνη τους (LMP) και απελευθερώνει καθεψίνες στο κυτταρόπλασμα. Η διαρροή των πρωτεασών, σε συνδυασμό με τα παραγόμενα ROS, πυροδοτεί μία ανεξάρτητη από κασπάσες αποπτωτική διαδικασία που διαπιστώθηκε σε κύτταρα μαστού MCF-7 και τραχήλου HeLa (Ostenfeld et al., 2005).

Από την ίδια ερευνητική ομάδα, το 2008, αποδείχθηκε ότι η συσσώρευση της σιραμεσίνης στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων επάγει την ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτοφαγίας στα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας έντονη συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων εξαρτώμενη από τις πρωτεΐνες Atg6 και Atg7 (Autophagy Related 6/7). Ταυτόχρονα, αναστέλλεται η δραστηριότητα του mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1), γεγονός που ενισχύει την αυτοφαγική απόκριση. Ωστόσο, λόγω της λυσοσωμικής δυσλειτουργίας που προκαλεί η σιραμεσίνη, τα αυτοφαγόσωματα δεν ωριμάζουν και δεν αποδομούνται αποτελεσματικά, με αποτέλεσμα τη μαζική συσσώρευσή τους. Η μελέτη έδειξε επίσης ότι η αναστολή του σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων αυξάνει την κυτταροτοξικότητα της σιραμεσίνης, υποδηλώνοντας ότι η αυτοφαγία λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός απέναντι στο λυσοσωμικό στρες που προκαλεί το μόριο.

Ο Cesen και η επιστημονική του ομάδα (2013) εντόπισαν έναν δεύτερο «μιτοχονδριακό» άξονα: σε HeLa, MCF-7, U-87MG και HaCat καρκινικά κύτταρα, η σιραμεσίνη προκαλεί απώλεια του μιτοχονδριακού δυναμικού, ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης και διαρροή αφενός του κυτοχρώματος c και αφετέρου μεγάλων ποσοτήτων ROS. Έτσι το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται οδηγεί στον θάνατο του κυττάρου. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα υποστήριξε ότι η καταστροφή των μιτοχονδρίων είναι κυρίαρχος μηχανισμός επαγωγής απόπτωσης λόγω σιραμεσίνης και ανεξάρτητος από LMP.

Ο τρίτος, και πλέον πρόσφατα αποσαφηνισμένος μηχανισμός, με τον οποίο η σιραμεσίνη επιφέρει κυτταρικό θάνατο σε καρκινικά κύτταρα μαστού περιγράφηκε από τον Ma και τους συνεργάτες (2016). Η μελέτη έδειξε ότι το μόριο πυροδοτεί φερρόπτωση: αυξάνει ταχύτατα τα επίπεδα ελεύθερου Fe^{2+} , ενισχύει τις αντιδράσεις Fenton και εκτοξεύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), οδηγώντας σε εξαρτώμενο από το σίδηρο οξειδωτικό στρες και άμεσο κυτταρικό θάνατο. Σε μεταγενέστερη εργασία της ίδιας ομάδας διαπιστώθηκε ότι η παρατεταμένη έκθεση στη σιραμεσίνη (>24 ώρες) και, κατ' επέκταση, η επίμονη συσσώρευση ROS ενεργοποιεί την NCOA4-εξαρτώμενη αποδόμηση της φερριτίνης (ferritinophagy). Η διαδικασία απελευθερώνει επιπλέον σίδηρο, ενισχύοντας περαιτέρω το οξειδωτικό στρες οδηγώντας τελικά σε αύτωση (autosis) — μια ιδιαίτερη αυτοφαγικού τύπου μορφή θανάτου που χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση κυτταροπλάσματος, διόγκωση πυρήνα και απώλεια ιοντικής ομοιόστασης. (Ma et al., 2017).

Όλες οι παραπάνω κυτταροτοξικές δράσεις της σιραμεσίνης αποδίδονται σχεδόν αποκλειστικά στη σύνδεσή της με τους σ2-υποδοχείς, με αποτέλεσμα να έχει επικρατήσει – περισσότερο ως παραδοχή παρά ως αποδεδειγμένο γεγονός – ότι λειτουργεί ως αγωνιστής των σ2R και γι' αυτό επιφέρει θάνατο στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η συσχέτιση παραμένει σε μεγάλο βαθμό υποθετική και δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η σιραμεσίνη να ενεργοποιεί μηχανισμούς απόπτωσης ή άλλες οδούς κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητα από τη αλληλεπίδρασή της με τους σ2-υποδοχείς.

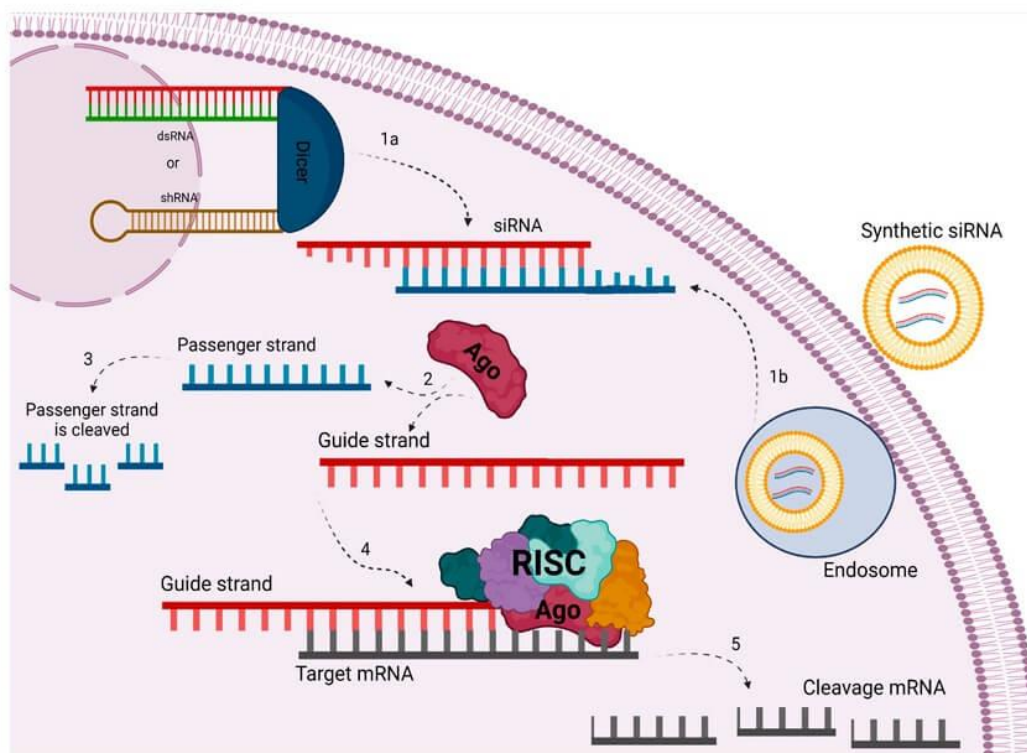
7. Αποσιώπηση των υποδοχέων PGRMC1 και TMEM97 με την τεχνολογία του siRNA

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) . Όπως διαφαίνεται και στην [Εικόνα 1.23](#), 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 νηματοειδή 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 ότι τα siRNA δεν αλληλεπιδρούν 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 Fougères 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 Fougères et al., 2007).

Συνεπώς η τεχνολογία του siRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την αποσίωψη πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη καρκινογένεση (Bahreyni & Luo, 2020). Εν κατακλείδι, αξιοποιώντας τους παραπάνω μηχανισμούς, στην παρούσα πτυχιακή, έγινε χρήση ειδικά σχεδιασμένων siRNAs με σκοπό την αποσίωψη των mRNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 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 ειδικότητα της Σιραμεσίνης ως προς τη δράση της ως αγωνιστής των $\sigma 2$ υποδοχέων.



Εικόνα 1.23: Μηχανισμός σίγασης γονιδίων μέσω siRNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα: Η σίγαση επιτυγχάνεται είτε μέσω του ενδογενούς μονοπατιού (endogenous pathway), όπου τα μικρά RNA παράγονται από το ίδιο το κύτταρο, είτε μέσω του εξωγενούς μονοπατιού (exogenous pathway), όπου τα siRNA εισάγονται τεχνητά (De Brito e Cunha et al., 2022)

Σκοπός

Οι κυτταροτοξικές δράσεις της σιραμεσίνης που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα αποδίδονται σχεδόν αποκλειστικά στη σύνδεσή της με τους σ2-υποδοχείς, με αποτέλεσμα να έχει επικρατήσει – περισσότερο ως παραδοχή παρά ως αποδεδειγμένο γεγονός – ότι λειτουργεί ως αγωνιστής των σ2R και γι' αυτό επιφέρει θάνατο στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η συσχέτιση παραμένει σε μεγάλο βαθμό υποθετική· δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η σιραμεσίνη να ενεργοποιεί μηχανισμούς απόπτωσης ή άλλες οδούς κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητα από τη δέσμευσή της στους σ2-υποδοχείς.

Το ζήτημα αυτό διερευνά η παρούσα μελέτη. Εστιάζουμε στη σχέση της κυτταροτοξικότητας της σιραμεσίνης με τους σ2-υποδοχείς εφαρμόζοντας σίγηση (siRNA) του TMEM97 -της πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε ως σ2R- και της συνεργαζόμενης πρωτεΐνης PGRMC1 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα. Δημιουργήσαμε τρεις πειραματικές συνθήκες:

- a. siTMEM97 (σίγηση μόνο του TMEM97),
- b. siPGRMC1 (σίγηση μόνο της PGRMC1) και
- c. siDOΘBAE (ταυτόχρονη σίγηση TMEM97 + PGRMC1).

Σε κάθε περίπτωση αξιολογήσαμε, με κλιμακούμενες συγκεντρώσεις σιραμεσίνης, τη βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό και την επεμβατική ικανότητα των κυττάρων.

Η απάντηση στο ερώτημα αν η σιραμεσίνη διατηρεί την κυτταροτοξικότητά της παρά την απουσία των TMEM97/PGRMC1 έχει κλινική βαρύτητα: εάν αναδειχθούν εναλλακτικοί μηχανισμοί δράσης, η ουσία θα μπορούσε μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό φάρμακο ακόμη και σε όγκους με χαμηλή ή μηδενική έκφραση αυτών των πρωτεϊνών-στόχων. Έτσι, η παρούσα εργασία επιδιώκει να καθορίσει εάν η σιραμεσίνη διατηρεί την αντικαρκινική της δράση ακόμη και χωρίς τη συμμετοχή των σ2-υποδοχέων, παρέχοντας κρίσιμα δεδομένα για τον σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών αντικαρκινικών θεραπειών.

Πειραματική Διαδικασία/ Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά αναλώσιμα και διαλύματα

Στον [Πίνακα 2.1](#) παρατίθενται τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, ενώ στον [Πίνακα 2.2](#) βρίσκονται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.1: Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν

Αναλώσιμο	Εταιρεία	Lot number
Φλάσκες 75 cm ²	Thermo Scientific	156499
Φλάσκες 25 cm ²	Corning	430372
Φιαλίδια (Falcon) 50ml	Corning	430291
Φιαλίδια (Falcon) 15ml	Thermo Scientific	339650
Πιάτα 96 θέσεων (96-well plates)	Thermo Scientific	167008
Πιάτα 6 θέσεων (6-well plates)	Thermo Scientific	140685
Φιαλίδια (Eppendorfs) 1,5ml	Axygen MCT	150-L-C
Συστήματα Διαπερατής μεμβράνης 8μm πόρων (Transwells) 24mm για πιάτο 6 θέσεων	Costar	21824052
Μείγμα πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Matrigel)	Corning®	41116155
Σόριγγες		
Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (RPMI 1640)	Gibco	31870-025
Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη (Pen/strep) 100X	Gibco	15140-122
Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum Premium - FBS)	Gibco	S00T51010I
L-Γλουταμίνη 100X	Gibco	2957353
Λιπαμφεκταμίνη (Lipofectamine RNAiMAX)	Invitrogen	3088137
Opti-Mem I (1x)	Gibco	31985-062
Σιραμεσίνη (Siramesine)	H. Lundbeck	Lu 28-179-C
Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) 0.9%w/v	DEMO Pharmaceuticals	2502227
Χρωστική Trypan blue	Gibco	15250-061
Τρυψίνη 1X	Gibco	25200-056
Διάλυμα RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay buffer)	Cell signaling Technology	#9806

Αναστολείς Πρωτεασών/Φωσφατασών (PI) (100x)	Cell signaling Technology	#5872S
30% Ακρυλαμίδα	Serva	10687.01
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Base (σκόνη)	EMD Milipore Corp	3244015
Θειικό δωδεκυλονάτριο (SDS - Sodium Dodecyl Sulfate)	PanReac AppliChem	132363.1209
Υπερθειικό αμμώνιο (APS - Ammonium persulfate)	Serva	13376.01
Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνης (TEMED)	Sigma	112K0586
Μπλε της Βρομοφαινόλης	Sigma	B0126-25G
Γλυκερόλη	PanReac AppliChem	1Y012739
B-μερκαπτοαιθανόλη	Gibco	1403948
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS - Phosphate-Buffered Saline)	Biowest	MSO215
Μάρτυρας πρωτεϊνών (Protein Marker)	Lonza (ProSieve, QuadColor)	00193837
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO - Dimethyl Sulfoxide)	PanReac AppliChem	3S011641
Μεμβράνη PVDF πόρων 0.45 μm	Thermo scientific	PE1802864
Γλυκίνη (σκόνη)	PanReac AppliChem	3T012994
Μεθανόλη 100%	PanReac AppliChem	0002537831
Μη ιονικό απορρυπαντικό (Tween 20)	PanReac	4F019194
Χρώση ανίχνευσης πρωτεϊνών (Ponseau S)	AppliChem	A1405,0100
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	Biorad	170-50G
Τριχλωροξικό οξύ (TCA - Trichloroacetic acid)	AppliChem	A1431,1000
Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με μέθοδο Bradford	Thermo Scientific	TL276861
Αλβουμίνη	Thermo Scientific	YI374275
Σουλφοροδαμίνη B (SRB)	Sigma	MKBD3195
Οξικό οξύ 100%	Chem Lab	29.3901110

Πίνακας 2.2: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και ο τρόπος παρασκευής τους

Διάλυμα	Παρασκευή
Θρεπτικό Ανάπτυξης Κυττάρων (χωρίς αντιβιοτικά)	RPMI 1640, 5% FBS, 1% L-Γλουταμίνη
Θρεπτικό Ανάπτυξης Κυττάρων (με αντιβιοτικά)	RPMI 1640, 5% FBS, 1% L-Γλουταμίνη, 1% Pen/Strep
PBS 1X	10% PBS 10x, 90% ddH ₂ O
TCA 50%	1:1 (TCA 100%:ddH ₂ O)
Tris Base 10mM	Tris Base σκόνη σε ddH ₂ O (10mM)
Tris Cl (0,5M/1M/1,5M) & pH (6.8/7.4/8.8)	Tris Base σκόνη σε ddH ₂ O σε τελική επιθυμητή συγκέντρωση. Μπορούμε να προσαρμόσουμε το pH με Υδροχλωρικό οξύ (HCl)
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer)	RIPA 1X (stock 10X), PI 1X (stock 100X), ddH ₂ O
Διάλυμα φορτώματος δειγμάτων πρωτεϊνών (Loading Buffer)	Γλυκίνη, SDS 20%, Tris-Cl 0,5M, B-Μερκαπτοαιθανόλη, Μπλε της Βρωμοφαινόλης 0,2%
Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων πρωτεϊνών (Blocking Buffer)	5% FBS σε 1X TBST (Ρυθμιστικό δ/μα Tris με Tween 20)

2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων στην παρούσα εργασία αποτελούν έναν *ex vivo* πρωτογενή καρκινικό παγκρεατικό κυτταρικό πληθυσμό, ο οποίος απομονώθηκε στο εργαστήριό μας (Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) ύστερα από χειρουργική εκτομή όγκου από ασθενή με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και ονομάστηκε EANM_att021013 (Σερέτη Ε. Α., 2019).

Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε φλάσκες 75cm² σε πλήρες θρεπτικό υλικό (5% ορός FBS, 1% L-Γλουταμίνη, 1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη), το οποίο παρασκευάζεται σύμφωνα με τον [Πίνακα 2.2](#). Οι συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων είναι συγκεκριμένες, σε ειδικό κλίβανο επώασης με θερμοκρασία ίση με 36,6°C και τα ποσοστά του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και της υγρασίας να είναι σταθερά στο 5% και 95%, αντίστοιχα. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες (Laminar Hood).

Ο ορός (FBS) είναι το κλάσμα του αίματος από έμβρυο βοοειδών και περιέχει αυξητικούς παράγοντες που βοηθούν την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη είναι απαραίτητα στο θρεπτικό μέσω και δρουν προστατευτικά στις κυτταροκαλλιέργειες έναντι της ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων. Το αμινοξύ L-Γλουταμίνη χρησιμεύει ως εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα, προσομοιάζοντας ένα φυσιολογικό περιβάλλον στο οποίο μπορούν να διατηρήσουν τις βασικές μεταβολικές λειτουργίες τους.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80-90% του χώρου της φλάσκας, απαιτείται ανακαλλιέργεια, με την οποία λαμβάνουμε ένα μέρος του πληθυσμού, ώστε αυτός να αναπτυχθεί σε νέο χώρο και με νέο θρεπτικό. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει:

- i. Απόχυση θρεπτικού υλικού και πλύση με ισοτονικό διάλυμα PBS 1X
- ii. Προσθήκη τρυψίνης 1X, η οποία αποτελεί πρωτεολυτικό ένζυμο. Με αυτό τον τρόπο θα διασπαστούν οι πρωτεΐνες προσκόλλησης της κυτταρικής μεμβράνης και, έτσι, θα αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια καλλιέργειας και θα μειωθούν οι διακυτταρικές συνδέσεις που έχουν αναπτυχθεί. Η φλάσκα με την τρυψίνη επωάζεται για κάποια λεπτά στον κλίβανο (37° C, 5% CO₂)
- iii. Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων (Axionvert 40 CFL της εταιρίας Zeiss) ώστε να ελεγχθεί η αποκόλληση τους από την επιφάνεια της φλάσκας
- iv. Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου, το οποίο λόγω του ορού (FBS) που περιέχει, απενεργοποιεί τη δράση της τρυψίνης
- v. Συλλογή του υπερκείμενου που αποτελείται από πλήρες θρεπτικό μέσο και κύτταρα. Με βάση τον ρυθμό αύξησης των κυττάρων, κρατείται και η ανάλογη ποσότητα του ελαιωρήματος.

Η φλάσκα επανατοποθετείται στον κλίβανο επώασης ώστε να πολλαπλασιαστούν εκ νέου τα κύτταρα.

2.3 Καταμέτρηση κυττάρων (Trypan Blue Χρωστική) - Βιωσιμότητα κυττάρων

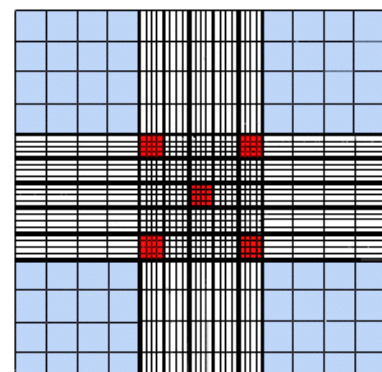
Η μέτρηση των κυττάρων είναι αναγκαία για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue 0,5 % w/v, μία χρωστική η οποία διεισδύει μόνο σε κύτταρα με κατεστραμμένη μεμβράνη, βάφοντάς τα μπλε και καθίσταται δυνατή η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Η καταμέτρηση γίνεται με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer, η οποία περιλαμβάνει κεντρική περιοχή με θαλάμους μέτρησης (Εικόνα 2.1).

Για τον ακριβή υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων, χρησιμοποιείται ένα μέρος του ελαιωρήματος των κυττάρων (90 μL) με προσθήκη από 10 μL Trypan Blue. Από το μίγμα τοποθετούνται 20 μL στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και, υπό μικροσκόπιο, καταμετρώνται τα άχρωμα (ζωντανά) κύτταρα στα τέσσερα μεγάλα τεταρτημόρια, τα οποία δηλώνονται με μπλε στην διπλανή εικόνα.

Ο αριθμός των κυττάρων/ ml προκύπτει από τον τύπο:

$$\begin{aligned} & \text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} \\ &= \frac{\text{αριθμός κυττάρων Neubauer}}{4} \times 10^4 \\ & \times \text{ml αρχικού δείγματος} \end{aligned}$$

Στον παραπάνω τύπο ο *αριθμός κυττάρων Neubauer* αντιστοιχεί στο συνολικό πλήθος που μετρήθηκε στα τέσσερα μεγάλα τεταρτημόρια της πλάκας Neubauer, ενώ το 10⁴ αντιπροσωπεύει τον όγκο που καλύπτουν αυτά τα τεταρτημόρια (Πρωτόκολλο Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture – Phelan 2007).



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση πλάκας Neubauer. Με μπλε παρουσιάζονται τα τετράγωνα στα οποία μπορούμε να μετρήσουμε κύτταρα (Blood Cell Indices)

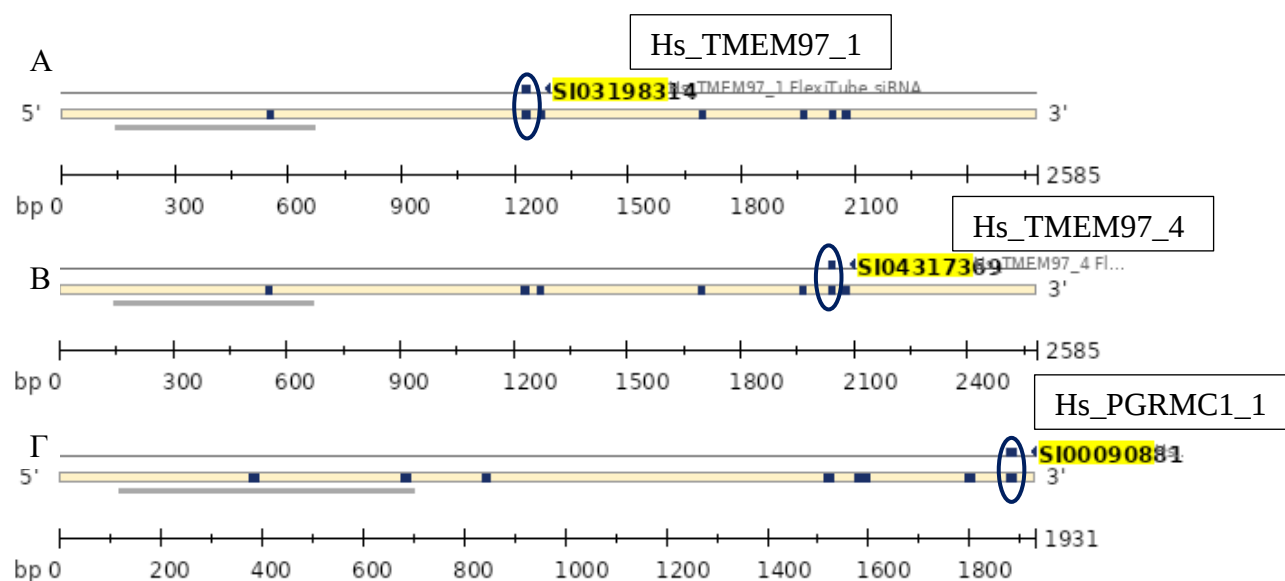
2.4 Αποσίωψη των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 μέσω επιμόλυνσης με siRNA

Στην παρούσα εργασία η έκφραση του σ2-υποδοχέα (TMEM97) και της PGRMC1 καταστέλλεται μετα-μεταγραφικά σε επίπεδο mRNA με την χρήση ειδικά σχεδιασμένων μικρών παρεμβατικών RNA (siRNA). Τα συνθετικά siRNA είναι δίκλωνα, μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων και φέρουν προεξοχή δύο βάσεων στο 3' άκρο κάθε κλώνου. Η μεταφορά τους στα πρωτογενή παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα EANM_att021013 πραγματοποιήθηκε με Λιποαφεκταμίνη, ένα κατιονικό λιποσωμικό σκεύασμα που προσφέρει υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης, εγκλωβίζοντας τα αρνητικά φορτισμένα siRNA Brian Dalby et al., 2004.

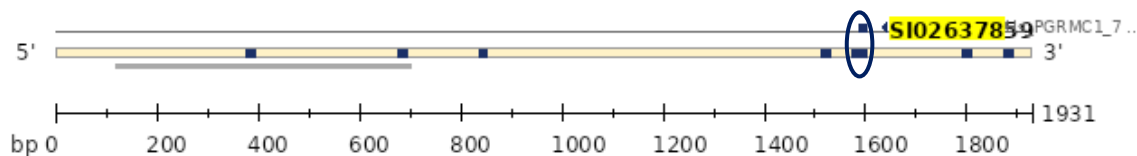
Πίνακας 2.3: Αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την σίγηση των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1

Πρωτεΐνη	Γονίδιο	Lot Number	Αλληλουχία στόχος 5' → 3' (guide)
TMEM 97	Hs_TM97_1	CB004357	CTAGGTTATAAGGAAGTGGTA
	Hs_TM97_4	CB004354	CAAGCCATATTGGCCCGATTA
PGRMC1	Hs_PGRMC1_1	CC003896	ATGATGTGCTTTGGTCAGTTA
	HS_PGRMC1_7	CC003893	AACAGTACAGTCGCTAGTCAA

Για τη επιτυχή αποσίωψη των mRNA χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αλληλουχίες siRNA για κάθε πρωτεΐνη στόχο, δηλαδή δύο αλληλουχίες για την σίγηση του TMEM97 και δυο αλληλουχίες για την σίγηση του PGRMC1 (εταιρία Qiagen [Flexitube GeneSolution]). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μία άλλη αλληλουχία scrambled (αρνητικό δείγμα ελέγχου – negative control) (Santa Cruz Biotechnology, sc-37007). Η αλληλουχία αυτή δεν στοχεύει σε κανένα μετάγραφο και χρησιμοποιείται για να διασφαλίσουμε ότι τα αποτελέσματα της σίγησης οφείλονται στη στοχευμένη δράση των siRNAs και όχι σε μη ειδικές ή τυχαίες επιδράσεις που μπορεί να έχει ο μηχανισμός RNAi ή το πειραματικό πρωτόκολλο. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα άγριου τύπου EANM_att021013 (Wild Type, WT) τα οποία δεν επιμολύνθηκαν με καμία αλληλουχία siRNA. Οι αλληλουχίες φαίνονται στον [Πίνακα 2.3](#), ενώ ο γενετικός τόπος στόχευσης τους αναπαρίσταται στην [Εικόνα 2.2](#).



Δ



Εικόνα 2.2: Στις (Α)-(Δ) παρουσιάζονται τα pre-mRNAs και η θέση την οποία στοχεύει κάθε αλληλουχία (μπλε τετράφωνο και κύκλος)

Η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε 2 μέρες. Την 1^η ημέρα τα πρωτογενή παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση από την φλάσκα στην οποία αναπτύσσονται, καταμετρούνται και ο επιθυμητός αριθμός των κυττάρων τοποθετείται σε πιάτο 6 θέσεων (6-well plate). Σε κάθε πηγάδι η πυκνότητα των κυττάρων η επιθυμητή πυκνότητα πρέπει να είναι στο 60%. Για τον συγκεκριμένο πρωτογενή πληθυσμό χρησιμοποιήθηκαν 150.000 κύτταρα ανά πηγάδι. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών και κρατώνται στον κλίβανο για 24 ώρες (θερμοκρασία 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασία). Ο λόγος της απουσίας αντιβιοτικών δεν είναι τυχαίος κατά την διαδικασία της επιμόλυνσης. Συγκεκριμένα, η λιποαμφεκταμίνη που χρησιμοποιείται για την μεταφορά των siRNAs αυξάνει προσωρινά την διαπερατότητα της μεμβράνης λόγω της αλληλεπίδρασης και σύντηξής της με αυτήν. Αυτή η αύξηση της διαπερατότητας επιτρέπει την είσοδο και άλλων μορίων που βρίσκονται στο θρεπτικό μέσο, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Έτσι, η συσσώρευση των αντιβιοτικών στο εσωτερικό των κυττάρων προκαλεί σημαντική κυτταρική τοξικότητα που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο και να μειώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης. Για τον λόγο αυτό, το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται τόσο πριν, όσο και κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης με τα siRNAs και τη λιποαμφεκταμίνη, δεν περιέχει αντιβιοτικά.

Κατά τη 2^η ημέρα και μετά από την πάροδο 24 ωρών, προστίθενται στα πηγαδάκια τα διαλύματα siRNA, με τελική συγκέντρωση κάθε αλληλουχίας siRNA 100nM. Για να δημιουργηθούν οι τέσσερις διαφορετικοί τύποι τροποποιημένων κυττάρων (siTMEM97, siPGRMC1, siDouble και scrambled control), παρασκευάστηκαν αντίστοιχα τέσσερα διαλύματα siRNA. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτών απαιτεί την ανάμειξη ίσου όγκου διαλύματος siRNA (διαλυμένου σε Opti-Mem) με διάλυμα λιποαμφεκταμίνης, επίσης διαλυμένο σε ίση ποσότητα Opti-Mem, σε αναλογία 1:1. Το Opti-Mem είναι ένα ειδικά σχεδιασμένο θρεπτικό μέσο μειωμένου ορού, το οποίο βελτιστοποιεί την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς γενετικού υλικού και ελαχιστοποιεί την κυτταρική τοξικότητα κατά τη διαδικασία της επιμόλυνσης. Το μείγμα αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα siRNA-Lipofectamine, και στη συνέχεια προστίθενται στα κύτταρα.

Πριν από την προσθήκη των διαλυμάτων siRNA, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα NaCl 0.9% προκειμένου να απομακρυνθούν μεταβολικά υπολείμματα. Στη συνέχεια, προστίθεται νέο θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικά (1750μl) και αμέσως μετά τα διαλύματα siRNA (+250μl) που έχουν ήδη προετοιμαστεί. Στα κύτταρα άγριου τύπου EANM_att021013 (WT), προστίθεται μόνο θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικά (2ml). Τα πιάτα τοποθετούνται στον κλίβανο για 72 ώρες υπό συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασίας. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση, καταμετρούνται και ένα μέρος τους χρησιμοποιείται για δημιουργία λυμάτων με σκοπό τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων του TMEM97 και PGRMC1, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία και ο βαθμός της σίγησης. Τα υπόλοιπα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκες 25 cm² με θρεπτικό μέσο που περιέχει αντιβιοτικά, για πειράματα

όπως κυτταρομετρία ροής, έλεγχος βιωσιμότητας κ.αλ. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή των siRNA, η σίγηση διατηρείται για περίπου 5-7 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της επιμόλυνσης.

2.5 Λύση κυττάρων και προσδιορισμός ποσότητας πρωτεΐνης

Το πρώτο βήμα για την ποσοτικοποίηση και για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, είναι η λύση των κυττάρων κατά την οποία απομονώνονται και συλλέγονται οι πρωτεΐνες από το εσωτερικό των κυττάρων. Έτσι, μετά από τις 72 ώρες επιμόλυνσης που απαιτούνται, τα κύτταρα συλλέγονται και καταμετρούνται. Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών και για την ηλεκτροφόρησή τους απαιτούνται ~1 εκατομμύρια κύτταρα για κάθε συνθήκη υπό μελέτη (siTMEM97, siPGRMC1 siDouble, scrambled και wild type).

Η λύση των κυττάρων γίνεται με το Lysis Buffer (δ/μα που αναφέρθηκε στον [Πίνακα 2.2](#)) το οποίο λόγω των συστατικών του, προκαλεί διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών ενώ ταυτόχρονα προστατεύει τις πρωτεΐνες από την αποικοδόμησή τους (αναστολή πρωτεασών και φωσφατασών από το PI – Protease and Phosphatase inhibitors). Αφού προστεθεί το διάλυμα λύσης στα κύτταρα, πραγματοποιείται επώαση για περίπου 30-40 λεπτά στον πάγο με συνεχή ανάδευση (vortex). Μετά το πέρας της επώασης τα διαλύματα φυγοκεντρώνται (13.000rpm/min για 20 λεπτά) και συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο πρέπει να είναι διαυγές. Στην περίπτωση που το υπερκείμενο είναι θολό η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί.

Μετά τη λύση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε η ποσοτική μέθοδος Bradford, η οποία βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Blue G-250 στις πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες, με αποτέλεσμα τη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από καφέ σε μπλε. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε η ποσοτική μέθοδος Bradford με τη βοήθεια της δοκιμασίας πρωτεΐνης Pierce BCA Protein Assay Kit και της αλβουμίνης, πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Ο προσδιορισμός γίνεται ύστερα από φωτομέτρηση στα 540nm (Bio-Tek Instruments, Microplate reader, EL311S). Η ένταση του μπλε χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας πρωτεΐνης που υπάρχει σε κάθε πηγαδάκι. Από την καμπύλη αλβουμίνης και την απορρόφηση των δειγμάτων υπό μελέτη υπολογίζεται η συγκέντρωση πρωτεΐνης με τη βοήθεια του Excel Microsoft.

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες

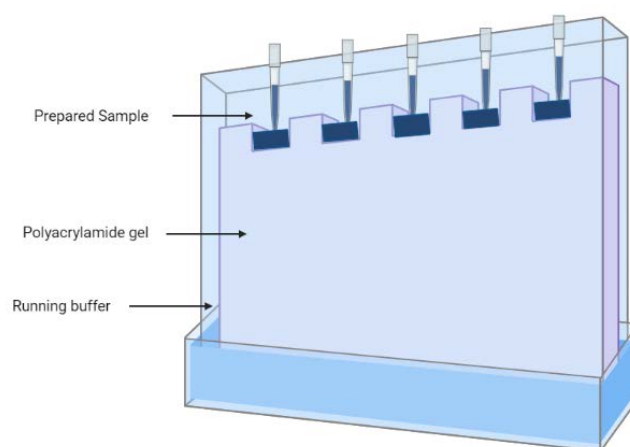
Για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικής σίγησης των TMEM97 και PGRMC1, τόσο στην περίπτωση αποσιώπησης της πρωτεΐνης TMEM97 (siTMEM97) και PGRMC1 (siPGRMC1), όσο και στην διπλή ταυτόχρονη σίγηση των δύο πρωτεϊνών (siDouble), πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες και στην συνέχεια ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στις περιπτώσεις των συνθηκών ελέγχου (scrambled siRNA και άγριου τύπου WT) αναμένονται φυσιολογικά επίπεδα της έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης, το οποίο χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους (kDa). Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα διαμέσου των πόρων που υπάρχουν στο πήκτωμα, ενώ οι μεγαλύτερες μετακινούνται πιο αργά.

Πίνακας 2.4: Υλικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτωμάτων

	Running gel (10%)	Stacking gel (5%)
Απεσταγμένο νερό (ddH₂O)	5.7 ml	3,4 ml
30% Ακρυλαμίδα	1.7 ml	4 ml
0,5M Tris Base, pH= 6,8	2.5 ml	-
1,5M Tris Base	-	2.5 ml
20% SDS	0,1 ml	0.1 ml
10% APS	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Το πήκτωμα αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα: το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel), όπου οι πρωτεΐνες πακετάρονται και συγκεντρώνονται σε μία λεπτή ζώνη, και το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού (running/resolving gel), όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους. Το ποσοστό πολυακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού επιλέγεται ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης-στόχου. Στην περίπτωση των TMEM97 και PGRMC1 (~24 kDa και ~22 kDa, αντίστοιχα), χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα διαχωρισμού 12%. Το πήκτωμα πακεταρίσματος έχει σταθερή πυκνότητα 5%. Τα υλικά και οι ποσότητες για την παρασκευή των πηκτωμάτων παρατίθενται στον [Πίνακα 2.4](#)



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση του πηκτώματος ηλεκτοφόρησης (Carrillo, 2023)

Τα πηκτώματα διαχωρισμού και πακεταρίσματος τοποθετούνται διαδοχικά ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αρχικά προστίθεται το πήκτωμα διαχωρισμού (κάτω μέρος πηκτώματος) και αφού πολυμεριστεί, ακολουθεί το πήκτωμα πακεταρίσματος (πάνω μέρος πηκτώματος). Πριν από τον πολυμερισμό του πάνω πηκτώματος, τοποθετείται μια χτένα (10 θέσεων) ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για τη φόρτωση των δειγμάτων.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών ακολουθείται συγκεκριμένη διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται στην παρούσα πτυχιακή είναι 24 μ g. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα πρωτεΐνης αναμιγνύεται με ένα διάλυμα φόρτωσης (loading buffer), το οποίο περιέχει συστατικά, όπως SDS για την αποδιάταξη και αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών, β-μερκαπτοαιθανόλη για τη μείωση των δισουλφιδικών δεσμών, γλυκερόλη για την αύξηση της πυκνότητας του δείγματος και μπλε της βρωμοφαινόλης για οπτικοποίηση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Ακολουθεί θέρμανση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 100°C, ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών, και στη συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο, ώστε να υγροποιηθούν οι υδρατμοί και να ελαχιστοποιηθούν στο μέγιστο δυνατόν οι απώλειες δείγματος.

Αφού προστεθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer, pH=8,3) στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, με τρόπο ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα (όπως φαίνεται στην [Εικόνα 2.3](#)), ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα αντίστοιχα πηγαδάκια του πηκτώματος. Να σημειωθεί ότι σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετείται πάντα ένας δείκτης μοριακού βάρους (protein marker), ο οποίος χρησιμεύει ως αναφορά για τον προσδιορισμό του μεγέθους των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με εφαρμογή τάσης 100V. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, οι πρωτεΐνες έχουν διαχωριστεί με βάση το μοριακό τους βάρος και είναι έτοιμες για την μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF.

2.7 Ανοσοαποτύπωση κατά Western – Έλεγχος επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών TMEM97 & PGRMC1

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western ξεκινά με τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) σε μεμβράνη PVDF (διφθοριούχου πολυβινυλιδίνης). Η μεταφορά πραγματοποιείται σε semi-dry συνθήκες. Για τη διαδικασία αυτή, το πήκτωμα και η μεμβράνη τοποθετούνται μεταξύ φύλλων φίλτρου εμποτισμένων με ειδικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer Buffer) ([Πίνακας 2.2](#)), σχηματίζοντας το λεγόμενο "sandwich". Η τυπική διάταξη του sandwich είναι: φίλτρο – πήκτωμα – μεμβράνη PVDF – φίλτρο, με όλα τα στρώματα καλά εμποτισμένα σε Transfer buffer, ώστε να διασφαλιστεί η αγωγιμότητα και η αποτελεσματική μεταφορά. Να σημειωθεί ότι πριν τη χρήση της, η μεμβράνη PVDF ενεργοποιείται με βύθιση σε μεθανόλη για 15 δευτερόλεπτα, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια τοποθετείται σε Transfer buffer για εξισορρόπηση. Τελικά, το sandwich που δημιουργείται, τοποθετείται οριζόντια ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια της συσκευής semi-dry transfer (BioRad Trans Blot Turbo System), όπου εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης (1,3 A) και κυμαινόμενης τάσης (25V), σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά.

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχεται με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S, η οποία επιτρέπει τον οπτικό έλεγχο της ομοιόμορφης μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης τρεις φορές με διάλυμα TBST ([Πίνακας 2.2](#)). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) ([Πίνακας 2.2](#)), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του υποβάθρου κατά την ανίχνευση.

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου πραγματοποιείται με διαδοχική επώαση της μεμβράνης με τα κατάλληλα αντισώματα. Αρχικά, προστίθενται τα πρωταρχικά αντισώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:1.000, και η μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια στους 4°C υπό ήπια ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, τα πρωταρχικά αντισώματα απομακρύνονται και ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης, διάρκειας 10 λεπτών με διάλυμα TTBS 1X ([Πίνακας 2.2](#)), ώστε να απομακρυνθούν μη ειδικά δεσμευμένα αντισώματα. Στη συνέχεια, προστίθεται το δευτερεύον αντίσωμα ([Πίνακας 2.5](#)), σε αραιώση 1:10.000. Η επιλογή του δευτερεύοντος αντισώματος βασίζεται στο είδος του πρωταρχικού αντισώματος και καθορίζεται από το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Μετά την επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα, η μεμβράνη πλένεται εκ νέου με TTBS για την απομάκρυνση μη δεσμευμένων αντισωμάτων και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για το δευτερεύον αντίσωμα.

Πίνακας 2.5: Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

	Αντισώματα	Εταιρία	Κωδικός
Πρωταρχικά αντισώματα με αραίωση 1:1000	Anti-TMEM97 (Rabbit mAb)	ATLAS ANTIBODIES	R112253
	Anti-PGRMC1 (Rabbit mAb)	Cell Signaling Technology	#13856
	Anti-B-actin (Mouse mAb)	Santa Cruz	sc-8432
Δευτερεύοντα αντισώματα σε αραίωση 1:10.000	Anti-Mouse HRP linked (IgG)	Cell Signaling Technology	#7076
	Anti-Rabbit HRP linked (IgG)	Cell Signaling Technology	#7074

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιείται υπόστρωμα χημειοφωταύγειας (ECL), με το οποίο η μεμβράνη επωάζεται για 5 λεπτά πριν την απεικόνιση. Το υπόστρωμα αυτό οξειδώνεται από το ένζυμο HRP (Horseradish Peroxidase), το οποίο είναι συνδεδεμένο στα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιούμε. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στην παραγωγή φωτός, το οποίο καταγράφεται από το σύστημα απεικόνισης χημειοφωταύγειας (Uvitec Cambridge) και αναλύεται από το λογισμικό Alliance (Version 16.06), επιτρέποντας, έτσι, την ακριβή ανίχνευση των πρωτεϊνών.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται μέτρηση της έντασης των ζωνών που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη-στόχο και συγκρίνονται με την ένταση της ζώνης της ακτίνης, που χρησιμοποιείται ως house-keeping protein. Η ανάλυση γίνεται με το λογισμικό ImageJ και η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως πυκνομετρία. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε ξεχωριστά στα δύο πηκτώματα ηλεκτροφόρησης (ένα για TMEM97 και ένα για PGRMC1). Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε ξεχωριστές μεμβράνες PVDF, κάθε μεμβράνη επώαστηκε με το αντίστοιχο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα, ανάλογα με την πρωτεΐνη-στόχο που εξεταζόταν ([Πίνακας 2.5](#))

2.8 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue

1^η ημέρα: Για την πειραματική αυτή διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 6 θέσεων (6-wells) στα οποία προστέθηκαν 150.000 κύτταρα/πηγάδι. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν για κάθε περίπτωση (siTMEM97, siPGRMC1, siDOUBLE, scrambled siRNA, Wild type) αφορούν χρόνο επώασης για 3/6/12/24 ώρες σε τρεις συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης (5/10/20μM). Μετά από την προσθήκη των κυττάρων σε θρεπτικό με αντιβιοτικό, το σύνολο των πιάτων τοποθετήθηκε στον κλίβανο για 24 ώρες (θερμοκρασία 36,6°C παρουσία 5% CO₂ και 95% επίπεδα υγρασίας).

2^η ημέρα: Μετά από 24ώρες προστίθενται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις σιραμεσίνης (5μM, 10μM και 20μM) και συνθήκες ελέγχου (χωρίς προσθήκη Σιραμεσίνης). Η στιγμή της προσθήκης της Σιραμεσίνης ορίστηκε ως χρόνος μηδέν (T-zero). Έτσι, μετά από 3, 6, 12 και 24 ώρες συλλέχθηκε το σύνολο του περιεχομένου από κάθε πηγάδι με σκοπό την μέτρησή των κυττάρων όπως αναλύεται στην ενότητα [6.3](#). Τελικά, η βιωσιμότητα υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Βιωσιμότητα} = \frac{\text{ζωντανά κύτταρα}}{(\text{νεκρά} + \text{ζωντανά}) \text{ κύτταρα}} * 100\%$$

2.9 Μέτρηση κυτταροτοξικότητας με τη χρώση Β σουλφοροδαμίνης (SRB assay)

Η μέθοδος SRB χρησιμοποιείται ευρέως για να εκτιμηθεί *in vitro* η κυτταροτοξική και αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση της της αποσιώπησης των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 στην πολλαπλασιαστική ικανότητα του πρωτογενή παγκρεατικού καρκινικού πληθυσμού, όπως και η επίδραση της Σιραμεσίνης με παρουσία και απουσία των εν λόγω πρωτεϊνών. Εν προκειμένω, χρησιμοποιήθηκαν τα επιμολυσμένα κύτταρα με siRNA (siTMEM97, siPGRMC1 και siDouble) και κύτταρα ελέγχου (scrambled και wild type).

1^η ημέρα: Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα 96 για 5 συγκεντρώσεις σιραμεσίνης (0 μM/ 0,1 μM/ 1μM/ 10μM/ 100 μM). Σε κάθε πηγαδάκι επιστρώθηκαν περίπου 5.000 κύτταρα, ενώ ο τελικός όγκος ήταν 100μl ανά πηγαδάκι. Παράλληλα στρώσαμε και ένα επιπλέον πιάτο 96 θέσεων (Τ₀ κύτταρα) με τα ίδια κύτταρα και την ίδια πυκνότητα (5.000 κύτταρα, 100μl τελικός όγκος) που είναι τα κύτταρα ελέγχου την χρονική στιγμή μηδέν (T-zero). Τα κύτταρα τοποθετούνται στον κλίβανο για 24ωρη επώαση (θερμοκρασία 36,6°C παρουσία 5% CO₂ και 95% επίπεδα υγρασίας).

2^η ημέρα: Μετά από 24 ώρες στα πλακίδια 96 θέσεων προστέθηκαν 100 μl Σιραμεσίνης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0 μM/ 0,1 μM/ 1μM/ 10μM/ 100 μM). Τελικά τα μικροπλακίδια τοποθετούνται ξανά στο κλίβανο στις ίδιες συνθήκες για 48 ώρες. Στο πιάτο με τα κύτταρα Τ₀ προστίθεται μόνο θρεπτικό μέσο, ώστε να έχουν τον ίδιο τελικό όγκο με τα κύτταρα που έλαβαν την ουσία και στην συνέχεια μονιμοποιούνται. Η μονιμοποίηση πραγματοποιείται με προσθήκη 50 μL/θέση παγωμένου TCA 50%. Το πλακίδιο επωάζεται για 1 ώρα στους 4 °C, στην συνέχεια εκπλένεται με απεσταγμένο νερό (ddH₂O) για την απομάκρυνση του TCA και τελικά αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις το μικροπλακίδιο είναι στεγνό μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C.

Ημέρα 4^η: Μετά την επώαση για 48 ώρες, τα κύτταρα με την σιραμεσίνη μονιμοποιούνται με τον ίδιο τρόπο όπως τα Τ₀. Μόλις τα πιάτα στεγνώσουν, βάφονται με την χρωστική Sulforhodamine B (διάλυμα 0.4% w/v σε 1% οξικό οξύ), η οποία υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες μπορεί να προσδένεται σε βασικά αμινοξέα. Δηλαδή, η χρωστική αυτή μπορεί να βάφει τις πρωτεΐνες όσων κυττάρων έχουν μονιμοποιηθεί στον πάτο κάθε πηγαδάκι.

Τα κύτταρα αφήνονται για επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια ξεβάφονται με διάλυμα οξικού οξέος 1%, ώστε να φύγει η περίσσεια χρωστικής και αφήνονται να στεγνώσουν. Στην συνέχεια, γίνεται προσθήκη 150μl Tris Base 10mM σε κάθε πηγαδάκι και τα πλακίδια αφήνονται στον κλίβανο για 10 λεπτά. Το διάλυμα αυτό που χρησιμοποιείται είναι βασικό και επομένως ικανό να αποδεσμεύσει την χρωστική που έχει δεσμευτεί στις πρωτεΐνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαλυτοποιηθεί και άρα να μπορεί να ανιχνευθεί ως σήμα χρώματος από το φωτόμετρο. Η φωτομέτρηση γίνεται μετά από την επώαση, στα 540nm. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις με τη βοήθεια του λογισμικού Excel Microsoft οδηγούν στον υπολογισμό των εξής παραμέτρων:

- GI50 (Αναστολή ανάπτυξης - 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 (Ολική αναστολή ανάπτυξης - 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 (Θανατηφόρα συγκέντρωση - 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 (wild type controls EANM_att021013) μετά από 48 ώρες.

2.10 Δοκιμασία μελέτης αναστολής σχηματισμού αποικιών (clonogenic assay)

Η δοκιμασία σχηματισμού αποικιών αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο που εξετάζει την ικανότητα μεμονωμένων κυττάρων να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται, οδηγώντας τελικά στη δημιουργία αποικιών. Για να χαρακτηριστεί μια συστάδα ως αποικία, απαιτείται η παρουσία τουλάχιστον 50 κυττάρων. Εν προκειμένω, χρησιμοποιήσαμε πιάτα 6 θέσεων στα οποία τοποθετήθηκαν 800 κύτταρα/πηγαδάκι. Μελετήθηκαν οι συνθήκες με σίγηση των TMEM97 και PGRMC1 (siTMEM97, siPGRMC1 siDouble), όπως επίσης και τα δείγματα ελέγχου (scrambled siRNA και άγριου τύπου WT), υπό επίδραση της Σιραμεσίνης σε συγκέντρωση 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0μM, 0,1μM, 0,5μM, 1μM, 5μM και 10μM) οι οποίες προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις του stock σιραμεσίνης σε διαλύτη DMSO.

Όπως και στις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες έτσι και εδώ, την 1^η ημέρα στρώνεται ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων στα πιάτα 6 θέσεων και στην συνέχεια τοποθετούνται για 24 ώρες στον κλίβανο. Την επόμενη ημέρα προστίθεται η σιραμεσίνη και τα πιάτα αφήνονται στον κλίβανο για 1 εβδομάδα. Συνήθως, λόγω του αυξημένου μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, απαιτείται προσεκτική αφαίρεση και επανατοποθέτηση νέου θρεπτικού ανά 3 ημέρες. Με το πέρας της μιας εβδομάδας, κύτταρα μονιμοποιούνται, βάφονται με SRB και φωτομετρούνται στα 540nm (η διαδικασία παρουσιάζεται αναλυτικά στην ενότητα [2.9](#)).

2.11 Μέθοδος μελέτης μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας με χρήση μεμβράνης διαπερατότητας, ε/ξωκυττάριας ύλης ή /και χημειοτακτικό μέσο (Transwell assay)

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη *in vitro* μέθοδο για τη μελέτη της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων. Η βασική αρχή της τεχνικής στηρίζεται στη χρήση ειδικών ενθεμάτων με ημιδιαπερατή μεμβράνη πόρων 8 μm, τα οποία τοποθετούνται σε πιάτα 6 θέσεων. Στο επάνω διαμέρισμα (insert) προστίθενται τα κύτταρα σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό FBS, ενώ στο κάτω διαμέρισμα τοποθετείται θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% FBS, το οποίο δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας.

Στο πλαίσιο της μελέτης μας πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα, ένα που εστιάζει στην μελέτη μεταστατικής και διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων με χρήση Matrigel (metastatic/invasion assay) και ένα που εστιάζει στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων με

χρήση απλώς χημειοτακτικού μέσου (ορός) χωρίς χρήση του Matrigel (migration assay). Για το κάθε ένα από τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 150.000 κύτταρα ανά ένθεμα (insert). Χρησιμοποιήθηκαν: α) κύτταρα siTMEM97, β) κύτταρα siPGRMC1 και γ) κύτταρα siDouble, ενώ ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ελέγχου με scrambled siRNA. Επιπλέον, ελέγχθηκε η δράση της Σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 2,5 μ M και 5 μ M στα κύτταρα ελέγχου, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση της ουσίας στην μεταναστευτική, μεταστατική και διεισδυτική ικανότητα των πρωτογενών κυττάρων EANM_att021013.

Τα inserts που χρησιμοποιήσαμε είτε επικαλύφθηκαν με Matrigel (παρασκευασμένο σύμφωνα με τον προμηθευτή) για την προσομοίωση του εξωκυττάρου στρώματος (ECM), είτε χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επίστρωση για τη μελέτη της απλής μεταναστευτικής ικανότητας. Μετά την επώαση για 48 και 24 ώρες στον κλίβανο, αντίστοιχα, τα κύτταρα που διέσχισαν τη μεμβράνη και κατέληξαν στον πυθμένα από τα πηγαδάκια μονιμοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο SRB (η οποία αναλύεται στην ενότητα [2.9](#)) ώστε να αξιολογηθεί η μεταναστευτική ή η διεισδυτική ικανότητα, αντίστοιχα.

2.12 *In vivo* πείραμα

Για τη μελέτη της *in vivo* ογκογένεσης των τροποποιημένων κυττάρων siTMEM97 και siPGRMC1 χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ), που αποτελούν το πλέον ανοσοκατεσταλμένο εργαστηριακό στέλεχος για πειράματα που απαιτούν την εμφύτευση πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων. Τα NSG ποντίκια χαρακτηρίζονται από πλήρη έλλειψη ώριμων T-λεμφοκυττάρων, B-λεμφοκυττάρων και NK (Natural Killers) κυττάρων, λόγω της συνδυασμένης παρουσίας της μετάλλαξης Prkdc^{scid} (severe combined immunodeficiency) και της στοχευμένης διαγραφής του γονιδίου Il2rg, που κωδικοποιεί την γ-αλυσίδα του υποδοχέα ιντερλευκίνης-2. Επιπλέον, η παρουσία ειδικού αλληλόμορφου του γονιδίου Sirpa στο υπόβαθρο NOD επιτρέπει στα μακροφάγα να αναγνωρίζουν το ανθρώπινο CD47⁺ ως σήμα αυτοπροστασίας, αποτρέποντας τη φαγοκυττάρωση των ανθρώπινων κυττάρων (Maletzki et al., 2019).

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ηλικίας 4-6 εβδομάδων κατά την έναρξη του πειράματος. Κάθε ποντίκι υποβλήθηκε σε υποδόρια ένεση κάτω από το αριστερό οπίσθιο άκρο, με εναιώρημα που περιείχε 150.000 κύτταρα EANM_att021013. Οι πειραματικές ομάδες περιλάμβαναν κύτταρα με σίγηση του TMEM97 (siTMEM97), κύτταρα με σίγηση της PGRMC1 (siPGRMC1) και μη επεξεργασμένα κύτταρα (untreated), με τρεις επαναλήψεις (τρία ποντίκια) για κάθε ομάδα.

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, οι μύες θανατώθηκαν με βάση τα εγκεκριμένα πρότυπα ευζωίας. Ακολούθησε χειρουργική εκτομή των πρωτοπαθών όγκων, οι οποίοι φωτογραφήθηκαν και ζυγίστηκαν, ενώ οι διαστάσεις τους μετρήθηκαν με παχύμετρο (mm). Κατά την διάρκεια της νεκροτομής, εξετάστηκαν προσεκτικά και άλλα όργανα (όπως ήπαρ, πνεύμονες, σπλήνα κ.ά.) για την και αναζήτηση τυχόν μεταστάσεων.

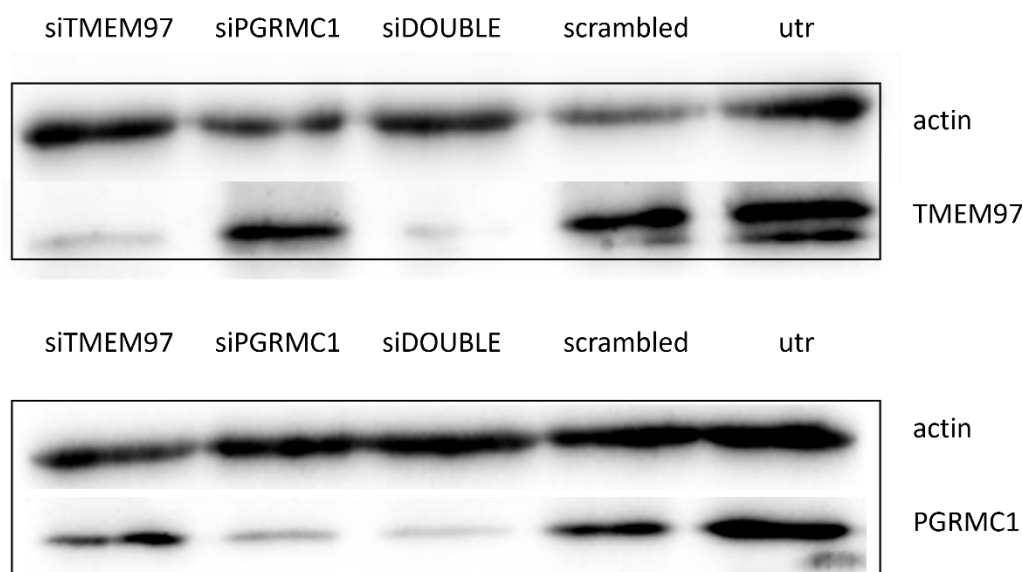
Αποτελέσματα

3.1 Αποσιώπηση των σ2R (TMEM97) και PGRMC1

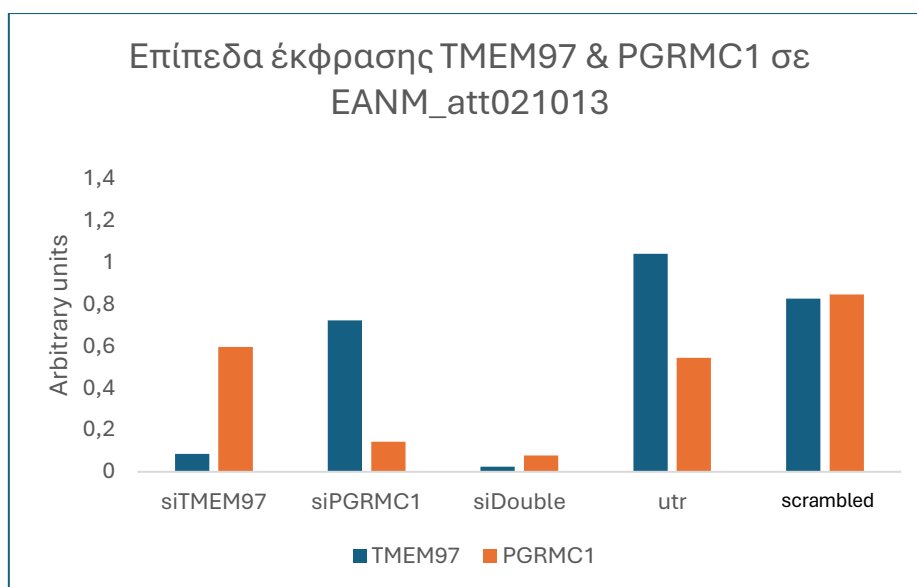
Η αποσιώπηση εξετάστηκε μέσω της ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του πρωτογενούς πληθυσμού παγκρεατικού καρκίνου EANM_att021013 που επιμολύνθηκε με siRNA. Σκοπός ήταν να επιβεβαιωθεί η επιτυχής αποσιώπηση των υπό μελέτη πρωτεϊνών ώστε να συνεχιστεί η μελέτη της επίδρασης των σ2R στον παγκρεατικό καρκίνο και στην δράση της Σιραμεσίνης. Ειδικότερα, εξετάστηκαν 5 διαφορετικές συνθήκες:

- Κύτταρα με σίγηση στον TMEM97 (siTMEM97),
- Κύτταρα με σίγηση στον PGRMC1 (siPGRMC1)
- Κύτταρα με ταυτόχρονη σίγηση στον TMEM97 + PGRMC1 (siDOUBLE)
- Κύτταρα ελέγχου με Scrambled siRNA (scrambled)
- Κύτταρα ελέγχου άγριου τύπου (Wild Type, WT)

Όπως φαίνεται στην [Εικόνα 3.1](#) και στο αντίστοιχο γράφημα της [Εικόνας 3.2](#), όπου εμφανίζεται η πυκνομετρικής απεικόνιση, η έκφραση της πρωτεΐνης TMEM97 όταν έχει γίνει επιμόλυνση με siRNA (siTMEM97 & siDOUBLE) είναι μειωμένη αισθητά. Στην περίπτωση που δεν έχει γίνει επιμόλυνση με siRNA για τον TMEM97 (siPGRMC1, WT, scrambled) η πρωτεΐνη εμφανίζει εμφανώς έντονη έκφραση. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης PGRMC1 όπου έγινε αντίστοιχα επιμόλυνση με siRNA (siPGRMC1 & siDOUBLE), παρομοίως η έκφρασή της εμφανίζεται πολύ μειωμένη, σε αντίθεση με τα κύτταρα όπου δεν πραγματοποιήθηκε σίγηση με siRNA για την PGRMC1 (siTMEM97, WT, scrambled) και η πρωτεΐνη εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης.



Εικόνα 3.1: Επίπεδα έκφρασης της TMEM97 και PGRMC1 στα κύτταρα EANM_021013 με σίγηση της TMEM97 (siTMEM97), σίγηση του PGRMC1 (siPGRMC1), σίγηση και των δύο πρωτεϊνών (siDOUBLE), με προσθήκη scrambled siRNA (scrambled) και χωρίς τροποποίηση (untreated-utr)

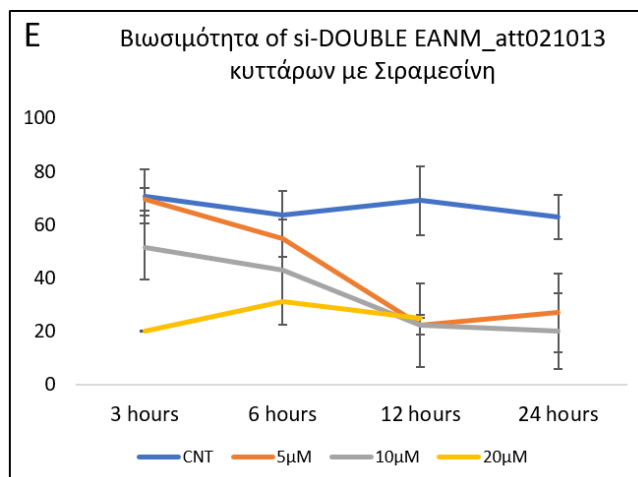
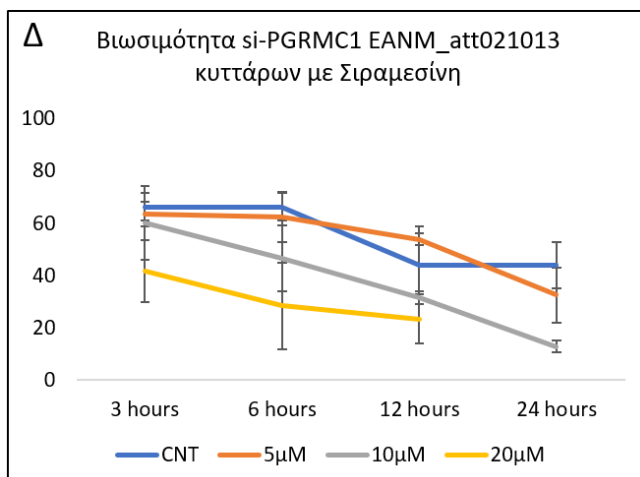
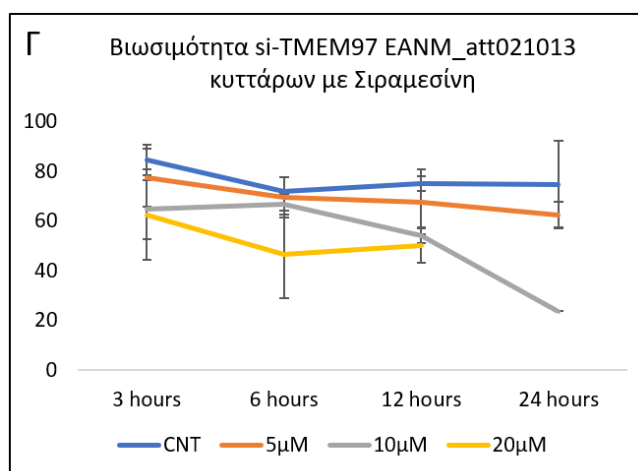
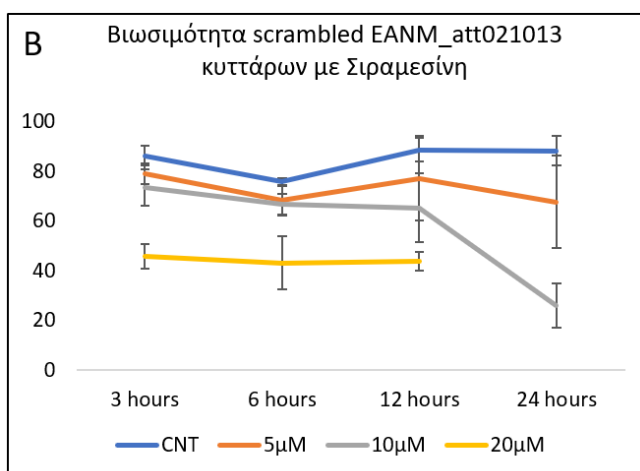
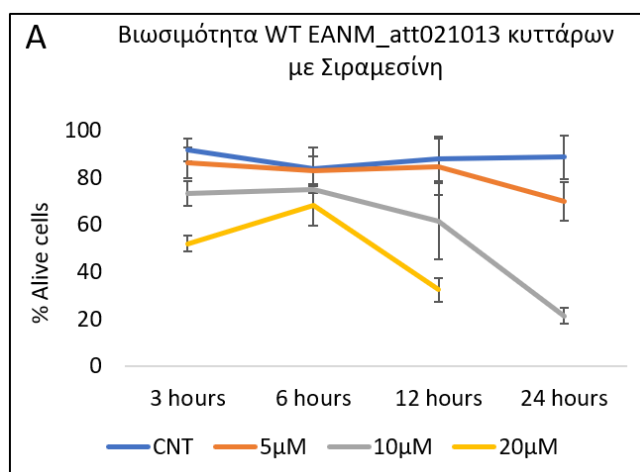


Εικόνα 3.2: Ραβδόγραμμα πυκνομετρίας των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών TMEM97 (μπλε) και PGRMC1 (πορτοκαλί) στις διαφορετικές συνθήκες σε σχέση με την ακτίνη. Κάθε δείχνει τον μέσο όρο από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.2 Βιωσιμότητα παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων μετά από την έκθεση σε έναν σ2R προσδέτη, Σιραμεσίνη

Στα γραφήματα της [Εικόνα 3.3](#) απεικονίζεται η βιωσιμότητα για κάθε μία συνθήκη σε σχέση με τον χρόνο επώασης και τη συγκέντρωση της Σιραμεσίνης. Στην συγκέντρωση των 20μM Σιραμεσίνης παρατηρήθηκε 100% θάνατος στις 24 ώρες επώασης και το αντίστοιχο πείραμα τερματίστηκε στις 12 ώρες.

Στα κύτταρα ελέγχου EANM_att021013 κύτταρα (**WT** και **scrambled**) παρατηρούνται παρόμοια ποσοστά βιωσιμότητας σε όλες τις συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης και σε όλες τις χρονικές στιγμές ([Εικόνα 3.3A](#) και [B](#)). Πιο ειδικά, και στις δύο περιπτώσεις στην συγκέντρωση 5μM παρατηρούμε υψηλό ποσοστό ζωντανών κυττάρων στις 3 ώρες (~80-85%) με μικρές μεταβολές ως και τις 24 ώρες (~70% βιωσιμότητα). Από την άλλη, στη συγκέντρωση 10μM Σιραμεσίνης καταγράφεται σταδιακά μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Συγκεκριμένα στις 3 ώρες παρατηρείται βιωσιμότητα ~73% (WT και scrambled), ενώ στις 6 ώρες το ποσοστό παραμένει ίδιο και στις 2 περιπτώσεις των κυττάρων (~70%). Στις 12 ώρες, τα ποσοστά βιωσιμότητας μειώνονται και στα WT και στα scrambled στο ~60%, και στις 24 ώρες επώασης με 10μM Σιραμεσίνης, τα ποσοστά βιωσιμότητας αγγίζουν το 20%. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 20μM, στις 3 ώρες η βιωσιμότητα είναι ~50% σε κύτταρα άγριου τύπου και σε κύτταρα με scrambled siRNA, ποσοστό που παραμένει σχεδόν σταθερό και στις 6 ώρες επώασης με την ίδια συγκέντρωση (20μM). Στις 12 ώρες τα ποσοστά βιωσιμότητας και στις δύο περιπτώσεις πέφτουν χαμηλότερα από 40%. Τα κύτταρα χωρίς την επίδραση της Σιραμεσίνης (CNT), διατηρούν σταθερά ποσοστά βιωσιμότητας ~90% και στην περίπτωση των κυττάρων EANM_att021013 άγριου τύπου (WT) και των κυττάρων με scrambled siRNA (scrambled).



Εικόνα 3.3: Διαγράμματα βιωσιμότητας (ποσοστό ζωντανών κυττάρων-time point) των καρκινικών κυττάρων EANM_att021013 στις συνθήκες: (A) WT (without transfection), (B) scrambled (C) siTMEM97 (D) siPGRMC1 (E) siDOUBLE. Κάθε σημείο δείχνει τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Όσον αφορά τα επιγενετικά τροποποιημένα κύτταρα:

- Στα κύτταρα **siTMEM97 EANM_att021013**, όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 3.3Γ](#), η απουσία Σιραμεσίνης (CNT) συνοδεύεται από υψηλή αρχική βιωσιμότητα (~85% στις 3 ώρες), με μια ήπια και σταδιακή μείωση που φτάνει στο 74% μετά από 24 ώρες, ακολουθώντας το πρότυπο

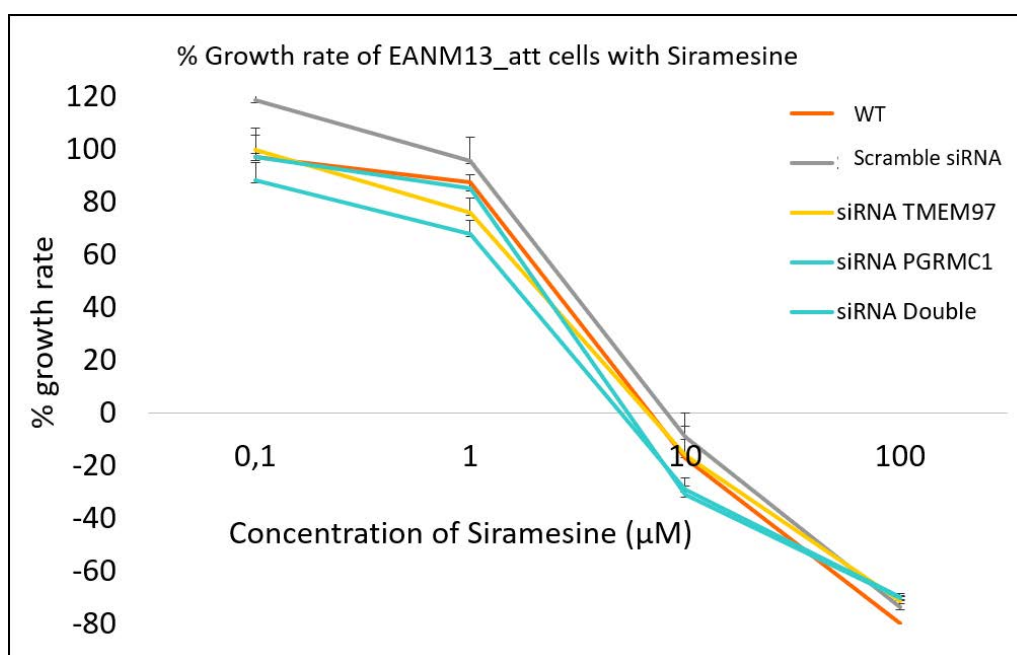
που παρατηρείται και στα κύτταρα άγριου τύπου (WT) και scrambled. Στη συγκέντρωση 5μM Σιραμεσίνης, η βιωσιμότητα ξεκινά στο 77% στις 3 ώρες και μειώνεται ελαφρώς με την πάροδο του χρόνου, καταλήγοντας περίπου στο 62% στις 24 ώρες. Στην ενδιάμεση συγκέντρωση των 10μM αρχίζουν να παρατηρούνται διαφορές. Πιο συγκεκριμένα η βιωσιμότητα των si-TMEM97 κυττάρων ξεκινά από ~62% στις 3 ώρες και παραμένει σχεδόν αμετάβλητη μέχρι και τις 6 ώρες, κάτι το οποίο φαίνεται να αλλάζει στην συνέχεια: στις 12 ώρες μειώνεται στο 55% και στις 24 ώρες καταγράφεται πτώση, με τη βιωσιμότητα να φτάνει στο 23%. Τέλος, στην συγκέντρωση των 20μM Σιραμεσίνης παρατηρείται αρχική βιωσιμότητα, στις 3 ώρες, ίση ~62%, μείωση στο 46% στις 6 ώρες, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μια ήπια ανάκαμψη, με τη βιωσιμότητα να φτάνει το 50% στις 12 ώρες (Εικόνα 3.3Γ)

- β. Στα **siPGRMC1 EANM_att021013** κύτταρα, όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 3.3Δ](#), η απουσία Σιραμεσίνης (CNT) συνοδεύεται από χαμηλότερη αρχική βιωσιμότητα σε σύγκριση με τα προηγούμενα κυτταρικά μοντέλα, με το ποσοστό ζωντανών κυττάρων να ανέρχεται σε περίπου 66% στις 3 και 6 ώρες. Ωστόσο, στις 12 ώρες παρατηρείται αισθητή μείωση της τάξης του 20%, με τη βιωσιμότητα να υποχωρεί στο 43%, ποσοστό που διατηρείται σταθερό και στις 24 ώρες. Σε συγκέντρωση 5μM Σιραμεσίνης, η βιωσιμότητα ξεκινά στο 63% και παραμένει σταθερή έως τις 6 ώρες, με ήπια πτώση στο 53% στις 12 ώρες και σημαντική μείωση στο 32% στις 24 ώρες. Στα 10μM, η επιβίωση των κυττάρων ξεκινά στο 60% στις 3 ώρες και μειώνεται σταδιακά: 46% στις 6 ώρες, 31% στις 12 ώρες και μόλις 12% στις 24 ώρες. Τέλος, στη συγκέντρωση 20μM, η βιωσιμότητα ξεκινά από 40% στις 3 ώρες και μειώνεται προοδευτικά στο 28% στις 6 ώρες και στο 23% στις 12 ώρες ([Εικόνα 3.3Δ](#)).
- γ. Τα **siDOUBLE EANM_att021013** κύτταρα ([Εικόνα 3.3Ε](#)) φαίνεται να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ευαισθησία από όλες τις πειραματικές συνθήκες. Απουσία του φαρμάκου (CNT), η βιωσιμότητα των κυττάρων παραμένει σχετικά σταθερή, με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 63% και 69% σε όλα τα χρονικά σημεία. Με την προσθήκη σιραμεσίνης, η μείωση της βιωσιμότητας είναι ιδιαίτερα απότομη και εξαρτάται έντονα από τη δόση: στη συγκέντρωση 5μM, η βιωσιμότητα ξεκινά στο 69% στις 3 ώρες, μειώνεται στο 55% στις 6 ώρες και καταγράφει δραματική πτώση στο 25% στις 12 ώρες, με μικρή άνοδο στο 27% στις 24 ώρες. Στα 10μM, η αρχική βιωσιμότητα είναι ήδη χαμηλότερη (~50% στις 3 ώρες), μειώνεται στο 43% στις 6 ώρες, φτάνει στο 25% στις 12 ώρες και υποχωρεί περαιτέρω στο 20% στις 24 ώρες. Τέλος, στη συγκέντρωση 20μM, καταγράφεται η χαμηλότερη αρχική βιωσιμότητα (20% στις 3 ώρες), η οποία αυξάνεται ελαφρώς στο 30% στις 6 ώρες και σταθεροποιείται στο 25% στις 12 ώρες ([Εικόνα 3.3Ε](#)).

Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι η Σιραμεσίνη προκαλεί δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας των EANM_att021013 κυττάρων. Επιπροσθέτως, η δράση της Σιραμεσίνης στη συνθήκη της αποσιωπημένης πρωτεΐνης TMEM97 είναι παρόμοια με τις περιπτώσεις των κυττάρων ελέγχου με κανονικά επίπεδα έκφρασης TMEM97. στην περίπτωση σίγησης της PGRMC1 (siPGRMC1, siDOUBLE), τα κύτταρα εμφανίζουν εξαρχής μειωμένη βιωσιμότητα σε σχέση με τα κύτταρα WT, Scrambled & siTMEM97 προφανώς λόγω της σίγησης του συγκεκριμένου υποδοχέα η οποία γίνεται ακόμη μικρότερη κατά την επώαση με Σιραμεσίνη.

3.3 Μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής/κυτταροτοξικής δράσης της Σιραμεσίνης σε συνθήκες σίγησης των TMEM97 ή/και PGRMC1 (SRB assay)

Για τη διερεύνηση της αντιπολλαπλασιαστικής ικανότητας της Σιραμεσίνης στα κύτταρα EANM_att021013 υπό διαφορετικές συνθήκες σίγησης γονιδίων (WT, Scrambled, siTMEM97, siPGRMC1 και siDOUBLE) και σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις (0μM, 0,1μM, 1μM, 10μM και 100μM), πραγματοποιήθηκε μελέτη κυτταροτοξικότητας με τη βοήθεια της χρωστικής SRB. Στην Εικόνα 3.3 φαίνεται η επίδραση της Σιραμεσίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων για κάθε μία από τις πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες για κάθε υπό μελέτη συνθήκη παρουσιάζονται στην [Εικόνα 3.5](#).



Εικόνα 3.4: Διαγράμματα ρυθμού αύξησης των καρκινικών κυττάρων EANM_att021013 στις συνθήκες: (A) WT (χωρίς επιμόλυνση με siRNA), (B) scrambled siRNA (C) siRNA για τον TMEM97 (siRNA TMEM97) (D) siRNA για τον PGRMC1 (siRNA PGRMC1) (E) siRNA για ταυτόχρονη σίγηση των TMEM97 και PGRMC1 (siRNA DOUBLE). Κάθε σημείο δείχνει τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Σύμφωνα με το γράφημα της [Εικόνας 3.4](#), ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων κάθε συνθήκης σε σχέση τα κύτταρα ελέγχου της (δηλαδή ίδιου τύπου κύτταρα απουσίας Σιραμεσίνης), δεν αλλάζει σημαντικά.

Πιο ειδικά, στην περίπτωση των **κυττάρων άγριου τύπου** (WT), στις συγκεντρώσεις 0,1μM και 1μM ο ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνεται περίπου στα ίδια επίπεδα, ~90%. Στη συγκέντρωση 10μM ο ρυθμός ανάπτυξης πέφτει στα -30% περίπου, ενώ στη συγκέντρωση 100μM Σιραμεσίνης, ο ρυθμός ανάπτυξης των EANM_att021013 κυττάρων πέφτει περίπου στο -80%. Στα **scrambled κύτταρα**, ο ρυθμός ανάπτυξης στις συγκεντρώσεις 0,1μM και 1μM είναι αρκετά υψηλός και κυμαινόμενος στο ~95%. Σε συγκέντρωση 10μM, ο ρυθμός ανάπτυξης πέφτει στα -10%, ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση (100μM), πέφτει ακόμα περισσότερο, αγγίζοντας το -75%.

Αναφορικά με τα επιγενετικώς τροποποιημένα **siTMEM97** κύτταρα, παρατηρούμε ότι τα ποσοστά ανάπτυξης είναι περίπου τα ίδια με τα κύτταρα scrambled: σε 0,1μM ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ο

μέγιστος (100%), σε συγκέντρωση 1μM πέφτει στο ~75%, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 10 μM και 100μM, το ποσοστό είναι ίσο με -15% και -70% αντίστοιχα. Από την άλλη, τα κύτταρα **siPGRMC1** ξεκινάνε στην 0,1μM συγκέντρωση Σιραμεσίνης με 97% ανάπτυξη, η οποία μειώνεται κατά 10% σε συγκέντρωση 1μM. Στις συγκεντρώσεις 10μM και 100μM, ο ρυθμός ανάπτυξης έχει μειωθεί περαιτέρω, φτάνοντας στο -30% και -70% αντίστοιχα.

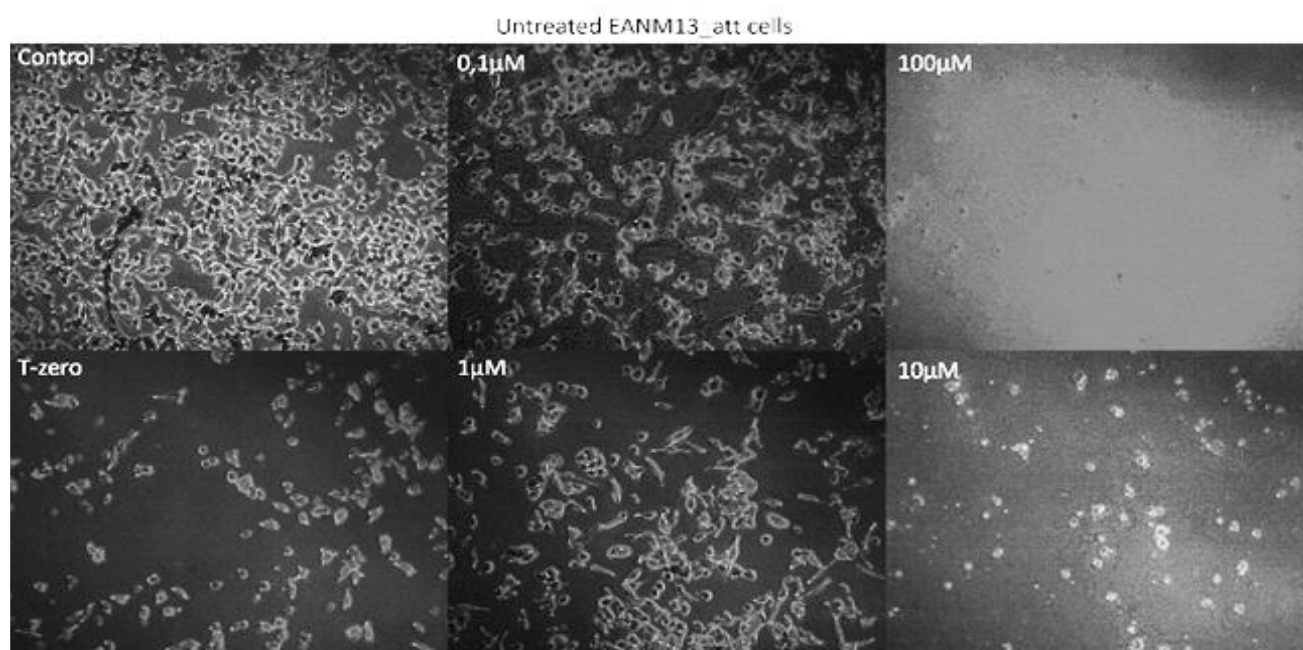
Τέλος, τα κύτταρα με διπλή σίγηση (**siDOUBLE**), ξεκινάνε με το μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης, στο 88%. Στην συνέχεια, σε συγκέντρωση 1μM, το ποσοστό αυτό μειώνεται επιπλέον, φτάνοντας το 67%, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 10μM και 100μM παρατηρούνται ίδια ποσοστά με αυτά των κυττάρων **siPGRMC1** στις αντίστοιχες συνθήκες (-30% και -70% αντίστοιχα).

Με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης που παρουσιάζεται στο γράφημα παραπάνω ([Εικόνας 3.4](#)), υπολογίστηκαν οι παράμετροι GI50 δηλαδή η συγκέντρωση της ουσίας που οδηγεί σε 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, TGI, που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση όπου εμφανίζεται ολική αναστολή της ανάπτυξης και LC50, το οποίο αντιστοιχεί στην συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων .

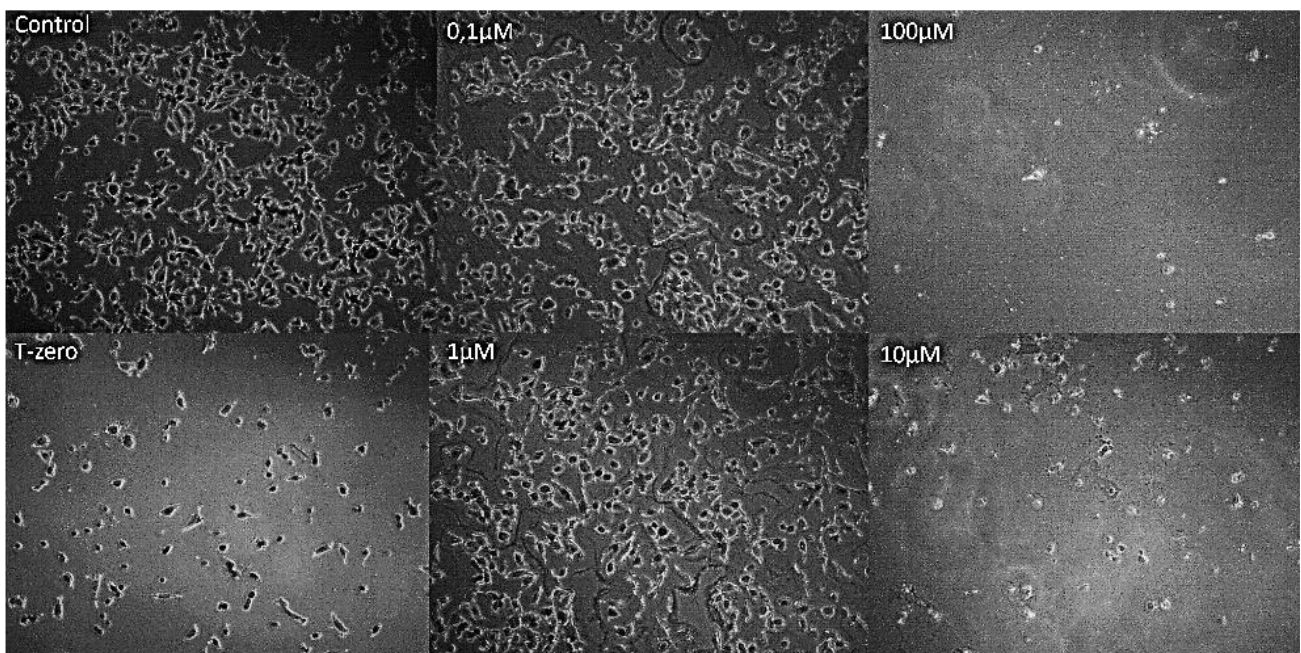
Πίνακας 3.1: : In vitro δράση της Σιραμεσίνης σε συνθήκες έκφρασης και σίγησης των πρωτεϊνών TMEM97 και PGRMC1 στα κύτταρα EANM_att021013. Παρουσιάζονται οι παράμετροι GI50, TGI και LC50..

	Wild type	Scramble siRNA	siRNA TMEM97	siRNA PGRMC1	siRNA Double
GI50	4,2μM	4,9 μM	3,5 μM	3,7 μM	2,6 μM
TGI	8,5 μM	9,3 μM	8,4 μM	7,6 μM	7,3 μM
LC50	57,2 μM	66,1 μM	64,8 μM	53,4 μM	56,4 μM

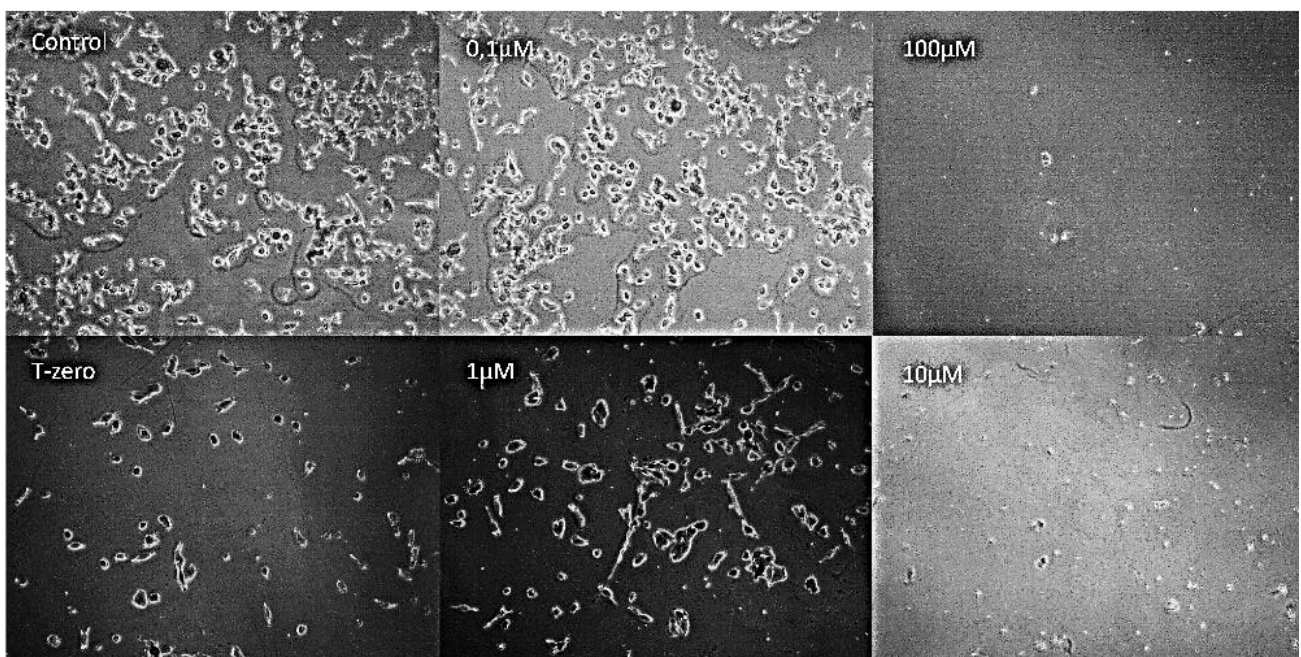
Σύμφωνα με τον [Πίνακα 3.1](#), σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν το GI50, είναι παρόμοιο (2,5-5μM),όπως επίσης παρόμοια φαίνεται να είναι και η τιμή TGI (7,3-9,3μM), αλλά και το LC50 (53-66μM)



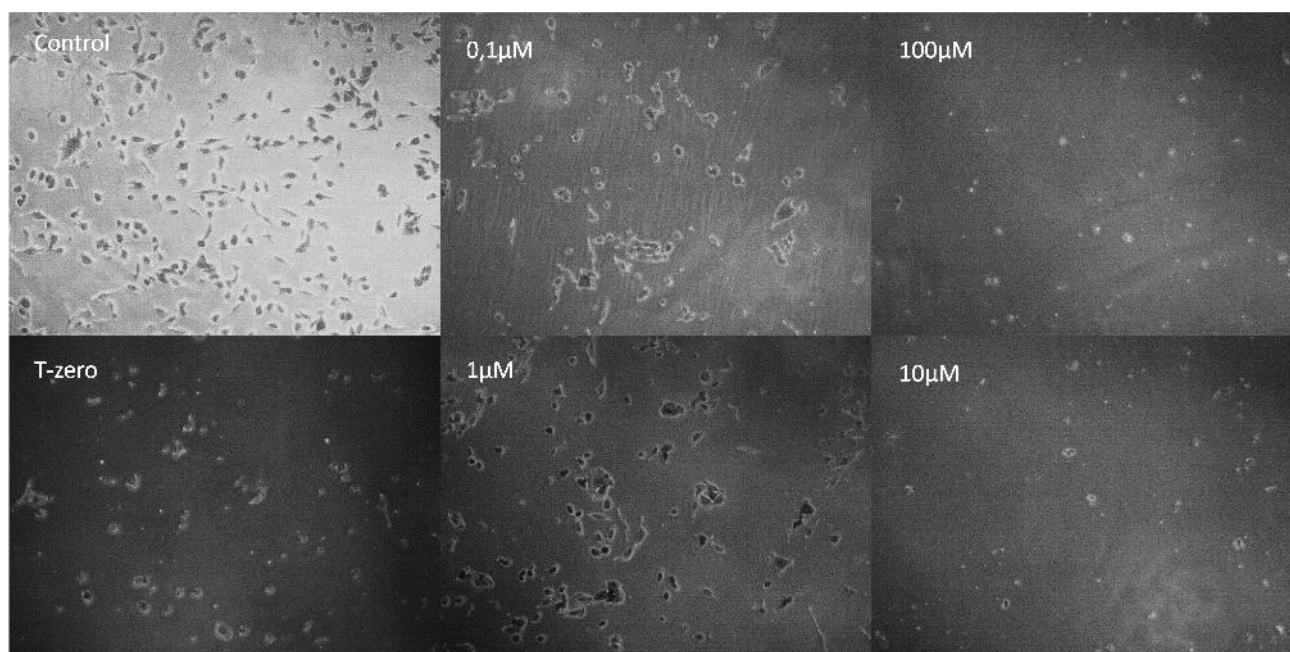
Scramble EANM13_att cells



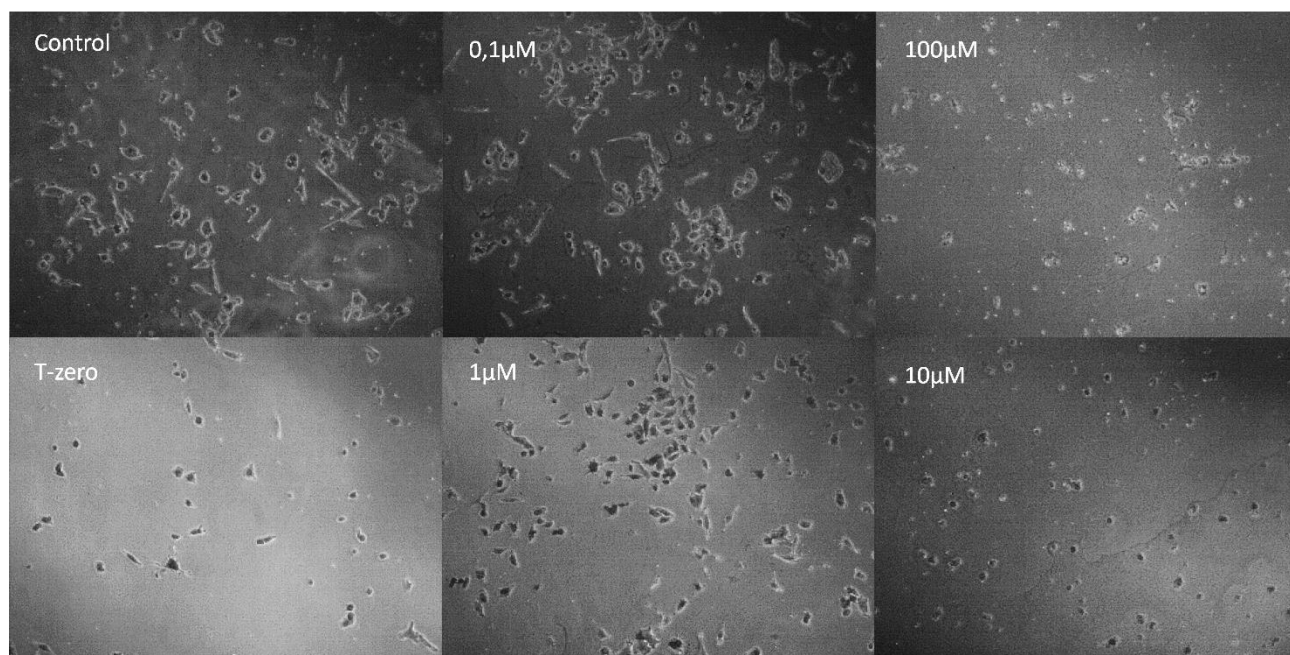
TMEM97 EANM13_att cells



PGRMC1 EANM13_att cells



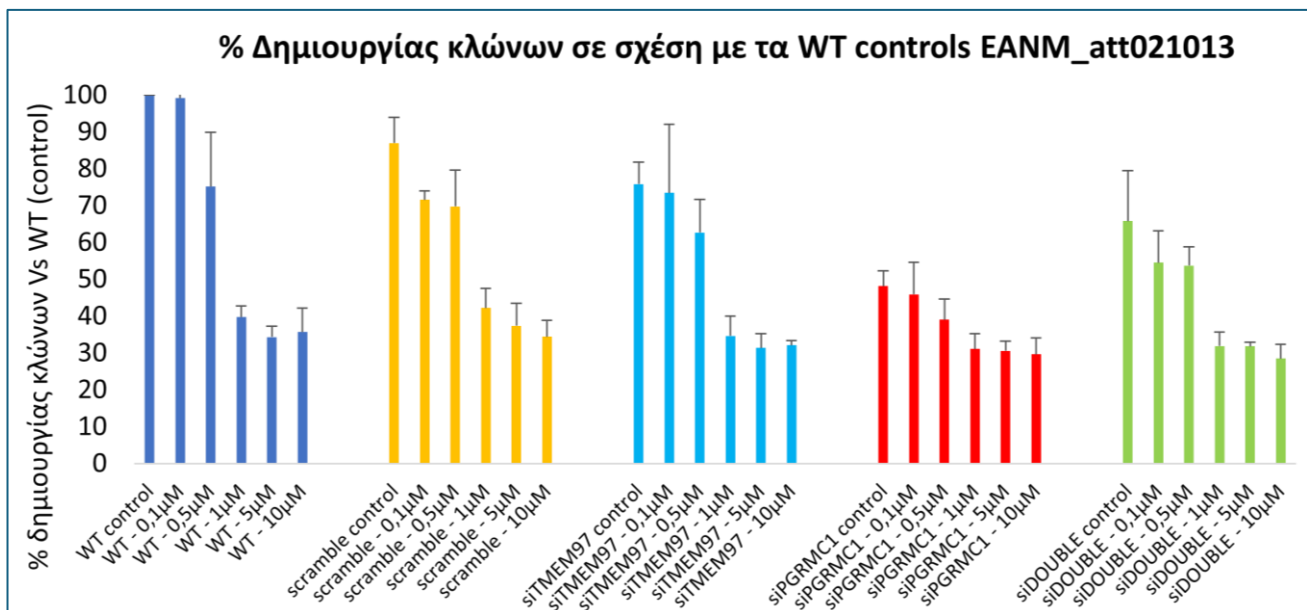
Double (TMEM97 + PGRMC1) EANM13_att cells



Εικόνα 3.5: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφικές απεικονίσεις των κυττάρων: (A) WT-untreated (without transfection), (B) scrambled (C) siTMEM97 (D) siPGRMC1 (E) siDOUBLE σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιραμεσίνης

9.4 Επίδραση στην ικανότητα δημιουργίας αποικιών (clonogenic assay) των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων της σίγησης των TMEM97 ή / και PGRMC1 και της έκθεσης σε σιραμεσίνη

Σύμφωνα με το γράφημα της [Εικόνας 3.6](#), παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της μελέτης της ικανότητας δημιουργίας κλώνων των κυττάρων EANM_att021013 στις διάφορες πειραματικές συνθήκες που ελέγχθηκαν. Το ποσοστό δημιουργίας αποικιών στην περίπτωση των κυττάρων αγρίου τύπου χωρίς παρουσία Σιραμεσίνης (WT control) ορίστηκε ως 100%.



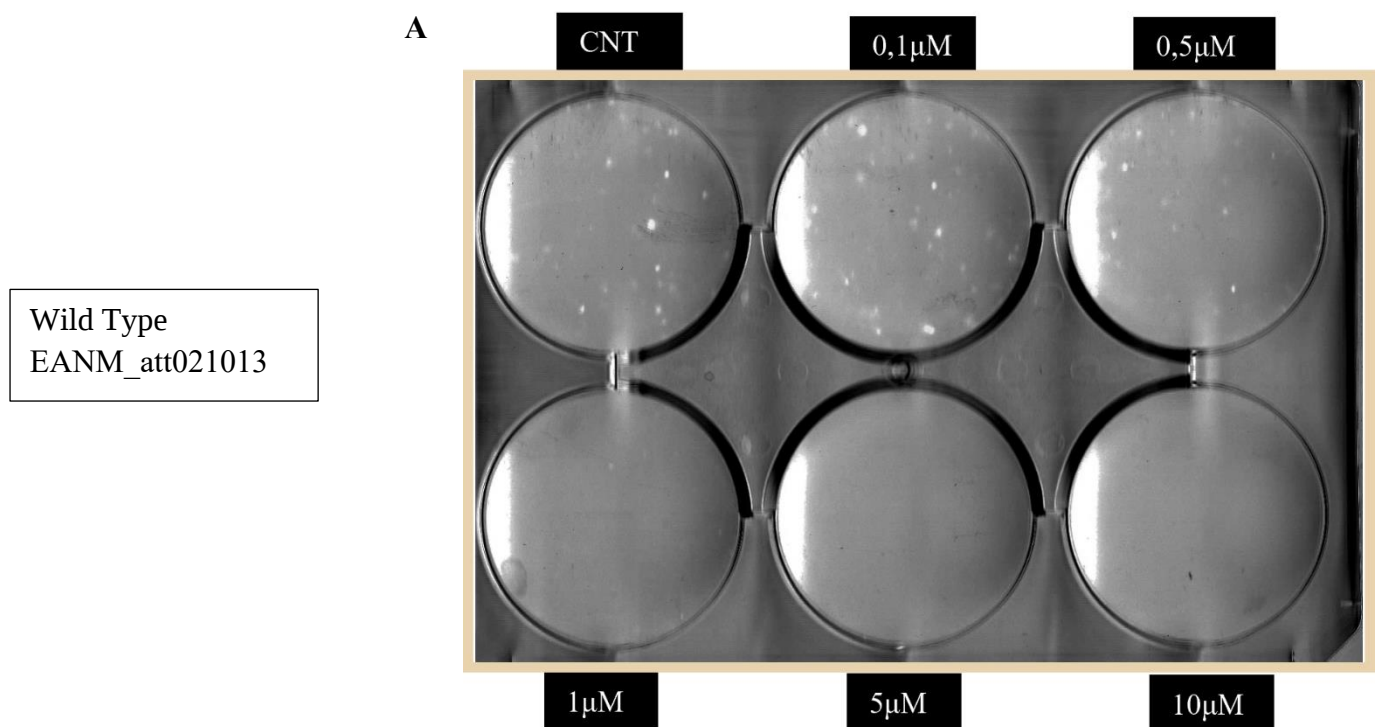
Εικόνα 3.6: Γραφήματα που απεικονίζουν το ποσοστό δημιουργίας κλώνων των κυττάρων EANM_att021013 σε συνθήκες απουσίας/παρουσίας TMEM97 & PGRMC1: wild type, scrambled, siTMEM97, siPGRMC1 & siDOUBLE. Κάθε τύπος κυττάρων (γενετικά τροποποιημένος ή αγρίου τύπου) ελέγχθηκε σε συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης 0,1μM, 0,5μM, 1μM, 5μM και 10μM. Η κάθε συνθήκη (τύπος κυττάρου και συκέντρωση Σιραμεσίνης, συγκρίνεται σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου (WT) απουσία Σιραμεσίνης (control). Κάθε σημείο δείχνει τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Τα ποσοστά δημιουργίας αποικιών των υπόλοιπων συνθηκών υπολογίστηκαν σε σχέση με αυτό το σημείο αναφοράς και απεικονίζονται ως γράφημα στην [Εικόνας 3.6](#). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι:

- α. Στα κύτταρα **αγρίου τύπου EANM_att021013 (WT)** ([Εικόνα 3.7A](#)), παρατηρείται σταδιακή μείωση του ποσοστού δημιουργίας αποικιών με την αύξηση της συκέντρωσης της σιραμεσίνης. Συγκεκριμένα, στα 0,1 μM η δημιουργία αποικιών παραμένει σχεδόν αμετάβλητη (~99%), ενώ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0,5 μM, 1 μM, 5 μM και 10 μM, τα ποσοστά μειώνονται σημαντικά στα 75%, 39%, 34% και 35%, αντίστοιχα.
- β. Στα **scrambled EANM_att021013** κύτταρα ([Εικόνα 3.7B](#)), το ποσοστό δημιουργίας αποικιών χωρίς Σιραμεσίνη είναι μικρότερο (~87%) σε σχέση με τα WT control. Με την προσθήκη 0,1 μM σιραμεσίνης, το ποσοστό πέφτει στο 70%, διατηρώντας σταθερή τιμή και στα 0,5 μM. Στη συνέχεια, στα 1 μM, το ποσοστό μειώνεται σημαντικά στο 42%, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 5 μM και 10 μM, η μείωση συνεχίζεται φτάνοντας σε ποσοστά 37% και 34% αντίστοιχα.

- γ. Στην περίπτωση των **siTMEM97 EANM_att021013** κυττάρων ([Εικόνα 3.7Γ](#)), το control (απουσία Σιραμεσίνης) εμφανίζει ποσοστό δημιουργίας αποικιών περίπου 76%. Με την προσθήκη 0,1 μM σιραμεσίνης, το ποσοστό παραμένει κοντά στο 74%. Στα 0,5 μM και 1 μM , το ποσοστό μειώνεται στα 62% και 34%, αντίστοιχα, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 5 μM και 10 μM παραμένει σταθερό περίπου στο 31%.
- δ. Τα **siPGRMC1 EANM_att021013** κύτταρα ([Εικόνα 3.7Δ](#)) παρουσιάζουν, απουσία Σιραμεσίνης, ποσοστό αποικιών περίπου 48%. Με 0,1 μM και 0,5 μM σιραμεσίνης, το ποσοστό μειώνεται ελαφρώς στο 45% και 40% αντίστοιχα, ενώ στα 1 μM μειώνεται στο 31%. Στις συγκεντρώσεις 5 μM και 10 μM , το ποσοστό παραμένει σταθερό περίπου στο 30%.
- ε. Τέλος, στα **siDOUBLE EANM_att021013** κύτταρα ([Εικόνα 3.7Ε](#)), το control εμφανίζει ποσοστό περίπου 65%. Με 0,1 μM σιραμεσίνης, το ποσοστό μειώνεται στο 54% και παραμένει ίδιο και στα 0,5 μM . Σε συγκέντρωση 1 μM , το ποσοστό πέφτει στο 32%, και παραμένει σχετικά σταθερό και για τις επόμενες συγκεντρώσεις (5 μM και 10 μM) στο 30%.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται η δράση της Σιραμεσίνης να μην εξαρτάται από την κατάσταση των δύο υποδοχέων που μελετήθηκαν, ενώ η σίγηση της PGRMC1 φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα δημιουργίας αποικιών των κυττάρων.

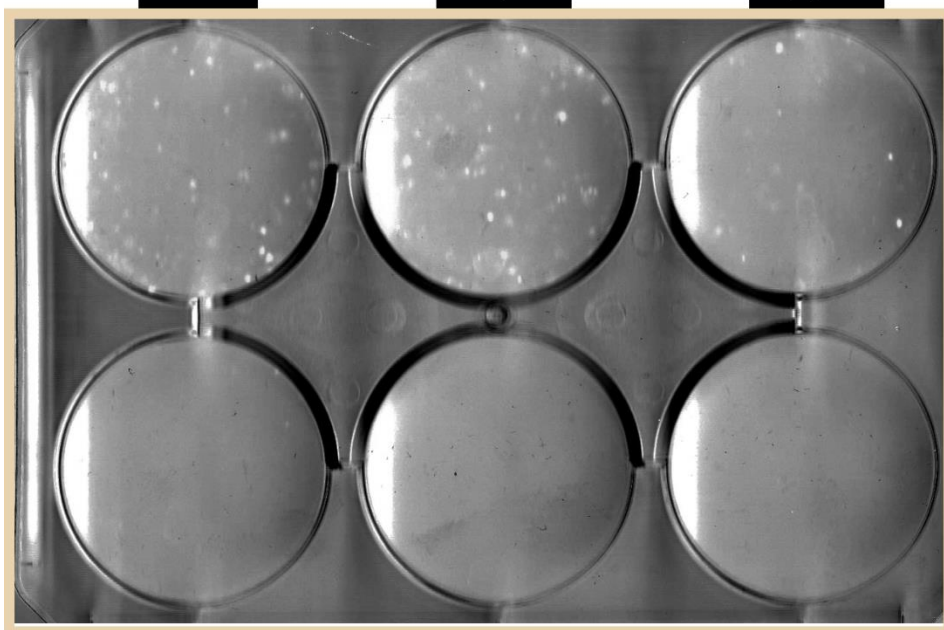


B

CNT

0,1 μ M

0,5 μ M



1 μ M

5 μ M

10 μ M

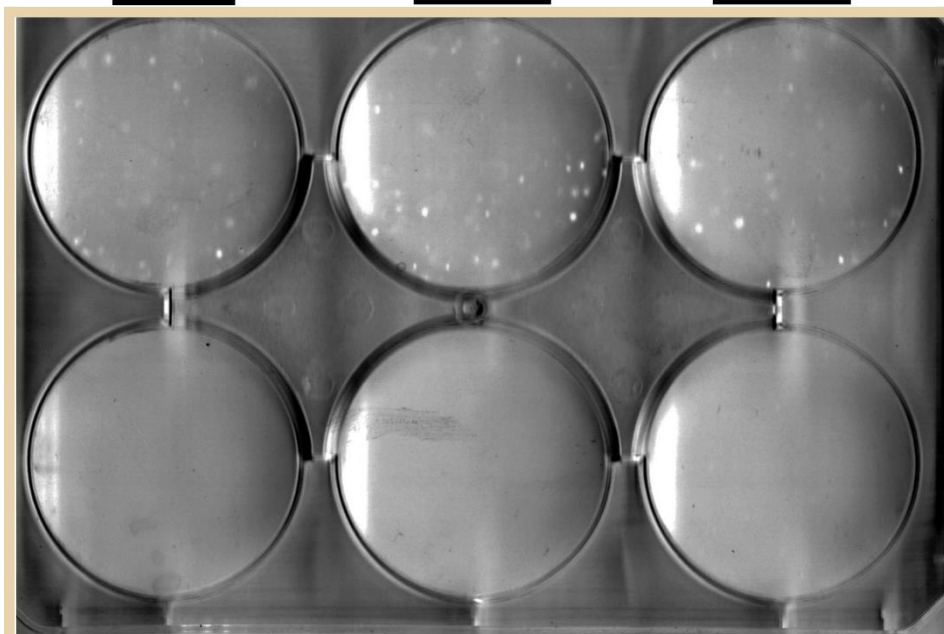
Scrambled
EANM_att021013

Γ

CNT

0,1 μ M

0,5 μ M



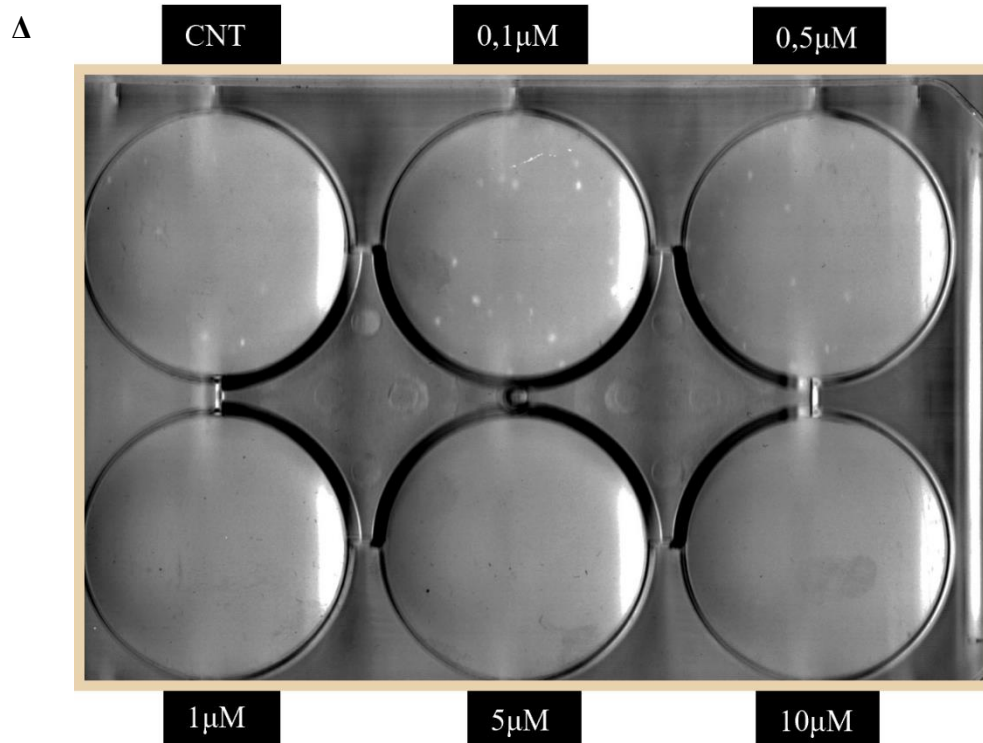
1 μ M

5 μ M

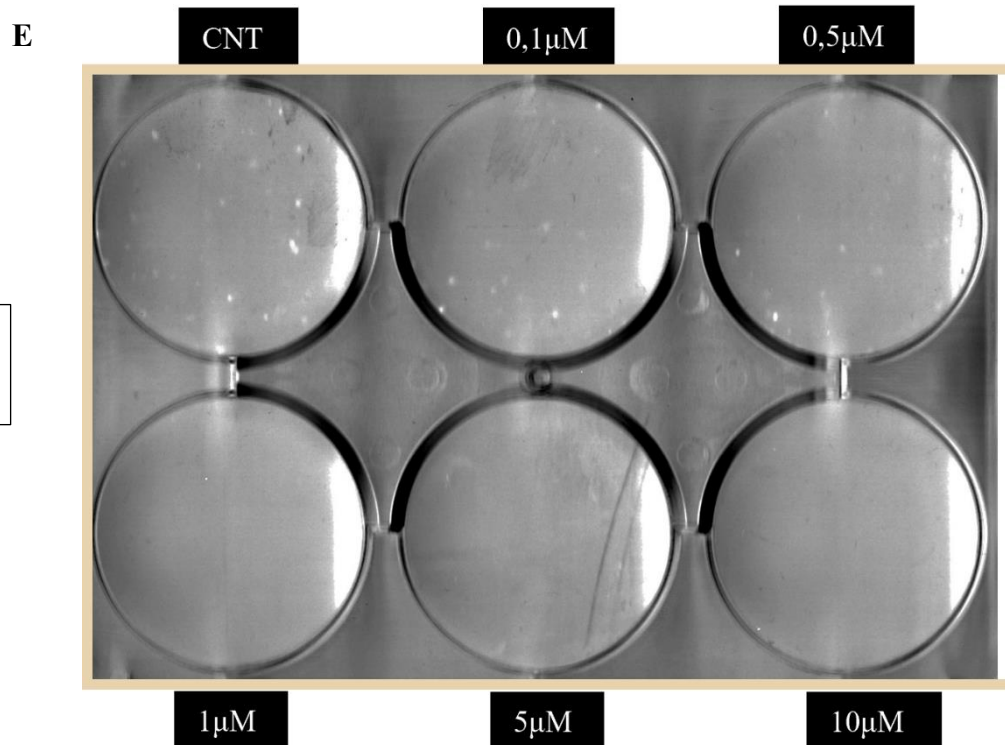
10 μ M

siTmem97
EANM_att021013

siPGRMC1
EANM_att021013



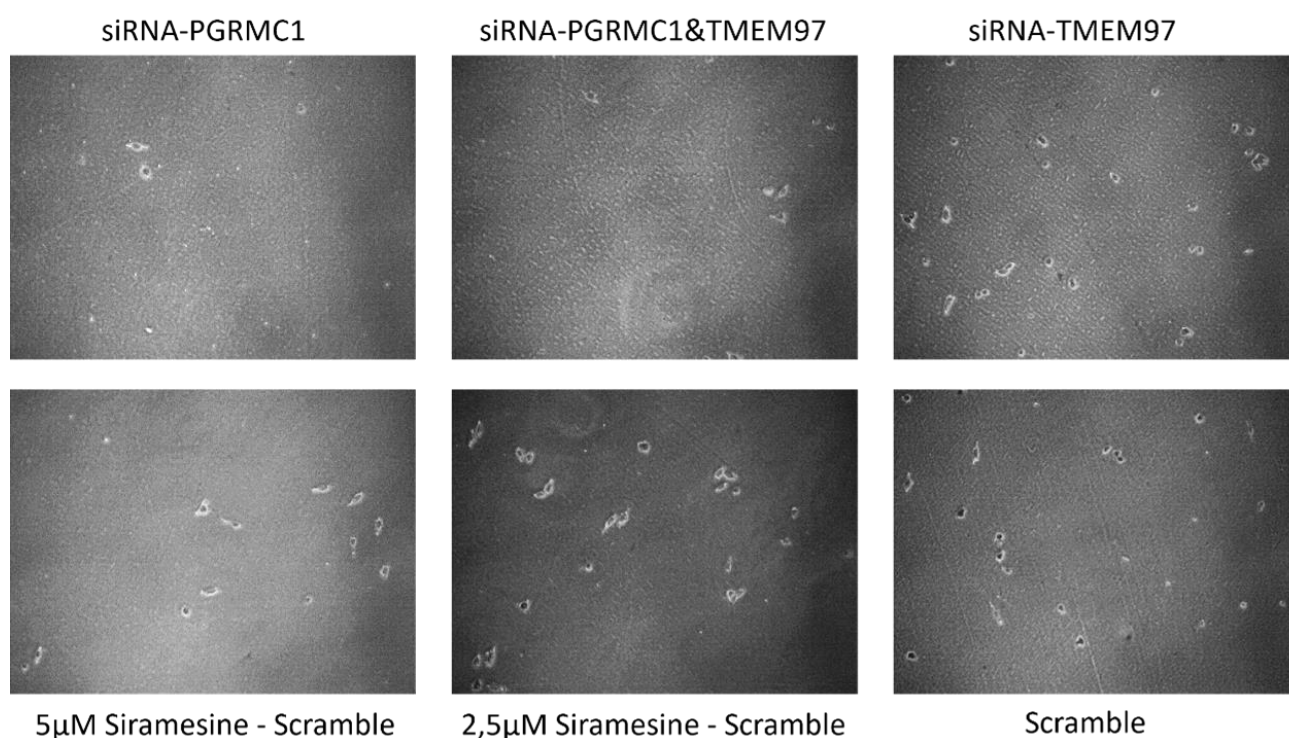
siDOUBLE
EANM_att021013



Εικόνα 3.7 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τον έλεγχο της ικανότητας δημιουργία αποικιών των κυττάρων EANM_att021013 σε συνθήκες απουσίας/παρουσίας TMEM97 & PGRMC1 (WT) κύτταρα απουσία Σιραμεσίνης (control). Κάθε τύπος κυττάρων (γενετικά τροποποιημένος ή αγρίου τύπου) ελέγχθηκε σε συγκεντρώσεις Σιραμεσίνης 0,1μM, 0,5μM, 1μM, 5μM και 10μM. Οι φωτογραφίες είναι αντιπροσωπευτικές από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

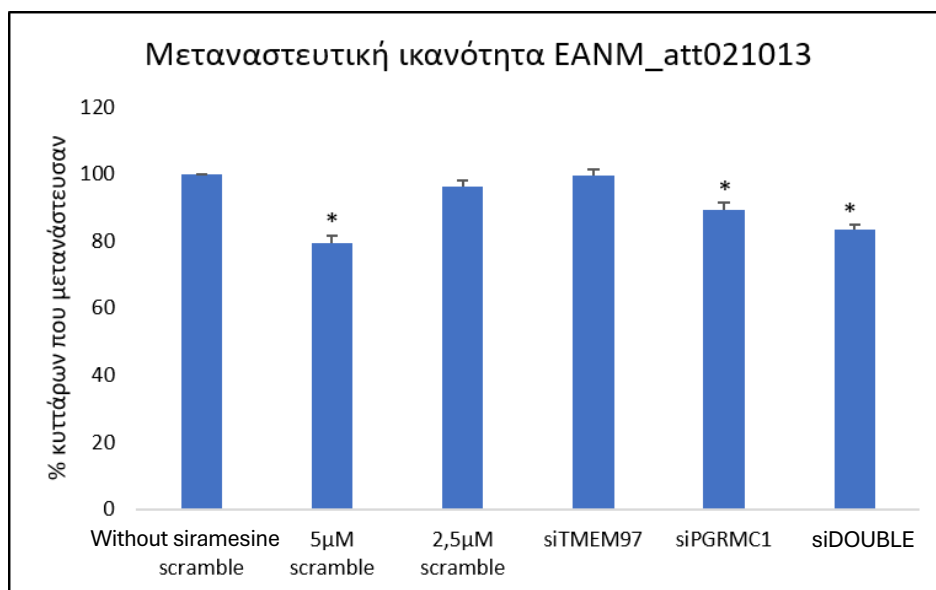
3.5 Μεταναστευτική (migration) και διηθητική (invasion) ικανότητα των κυττάρων EANM_att021013 υπό συνθήκες σίγησης γονιδίων ή έκθεσης σε σιραμεσίνη

Για τη μελέτη της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν και να διηθούν σε παρακείμενους ιστούς εφαρμόστηκε η μέθοδος με χρήση ενθεμάτων με ημιδιαπερατή μεμβράνη με πόρους 8 μm υπό συνθήκες που υπήρχε Matrigel για προσομοίωση εξωκυττάριας ουσίας και υπό συνθήκες χωρίς Matrigel (χημειοταξία). Μελετήθηκε η ικανότητα των EANM_att021013 κυττάρων να μεταναστεύουν και να διηθούν σε συνθήκες με σίγηση του TMEM97 (siRNA-TMEM97), με σίγηση του PGRMC1 (siRNA-PGRMC1), με ταυτόχρονη σίγηση και των δύο πρωτεϊνών (siRNA-PGRMC1&TMEM97) και κυττάρων ελέγχου scrambled siRNA. Επίσης μελετήθηκε και η δράση της Σιραμεσίνης σε συγκεντρώσεις 2,5 μM και 5 μM στα κύτταρα που έλαβαν scrambled siRNA.



Εικόνα 3.8: Φωτογραφική απεικόνιση των κυττάρων που διαπέρασαν το ένθετο και εγκαταστάθηκαν στην επιφάνεια των πηγαδιών χωρίς τη χρήση Matrigel με σκοπό το έλεγχο την μεταναστευτική ικανότητα των EANM_att021013.

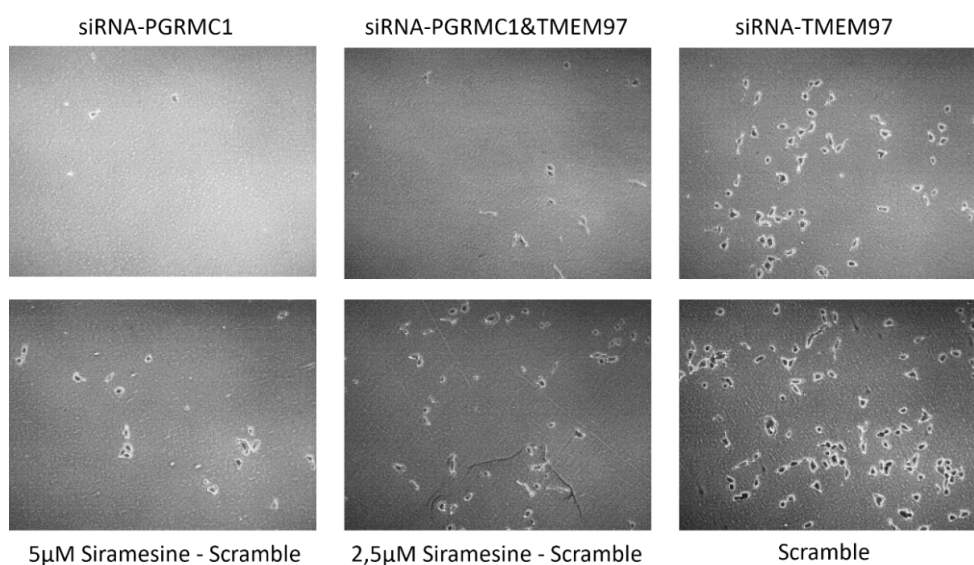
Στην [Εικόνα 3.8](#) φαίνονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του πειράματος μελέτης της μεταναστευτικής ιδιότητας των κυττάρων με χρήση χημειοτακτικού.



Εικόνα 3.9: Ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων EANM_att021013 με το control scrambled. Κάθε ράβδος δείχνει τον μέσο και την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. (* $p < 0.01$ vs scrambled cells).

Όπως φαίνεται και στο γράφημα της [Εικόνας 3.9](#), το ποσοστό μετανάστευσης στην περίπτωση του δείγματος ελέγχου (scrambled) ορίστηκε να είναι 100%. Το ποσοστό μετανάστευσης όταν τα ίδια κύτταρα επωάσθηκαν με Σιραμεσίνη σε συγκεντρώσεις μη τοξικές, 2,5μM και 5μM είναι αντίστοιχα 96% και 79%. Το ποσοστό μετανάστευσης στην περίπτωση που ο TMEM97 είναι σε σίγηση (siRNA-TMEM97) είναι το ίδιο με τα κύτταρα μάρτυρες (99%). Αντίθετα όταν είναι απών ο PGRMC1 (siRNA-PGRMC1) ή έχουν ταυτόχρονα σιγηθεί ο TMEM97 και ο PGRMC1 (siRNA-PGRMC1&TMEM97, siDOUBLE) τα συγκεκριμένα ποσοστά είναι 82% και 83%, αντίστοιχα, διαφέροντας σημαντικά από το δείγμα ελέγχου.

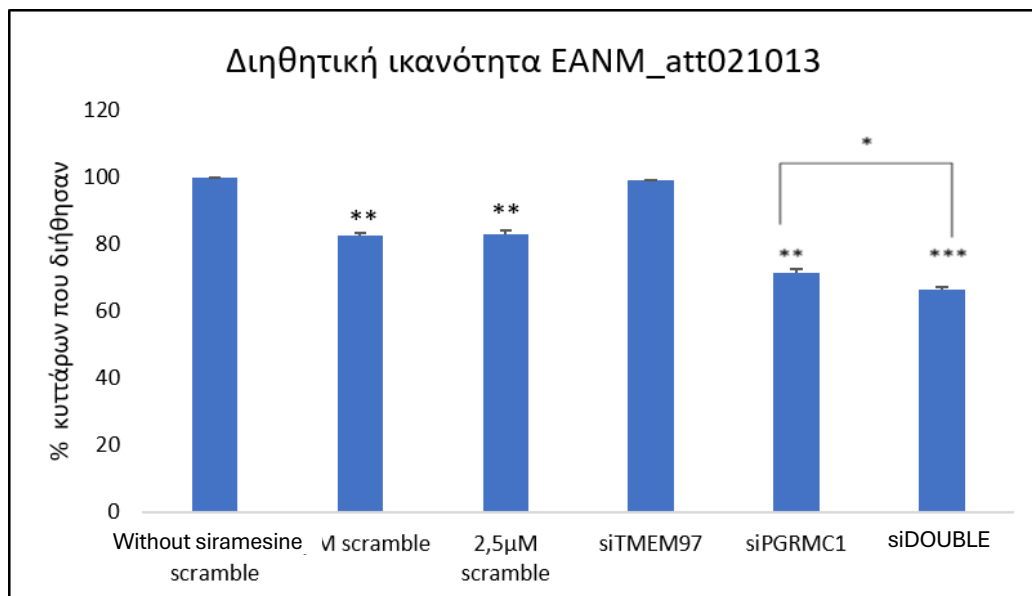
Στην [Εικόνα 3.10](#) φαίνονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του πειράματος μελέτης της διηθητικής και μεταστατικής ιδιότητας των κυττάρων με χρήση Matrigel ως προσομοίωση του φυσικού φραγμού εξωκυττάριας ουσίας, παρουσία χημειοτακτικού παράγοντα.



Εικόνα 3.10: Φωτογραφική απεικόνιση των κυττάρων που διαπέρασαν το insert και το Matrigel και εγκαταστάθηκαν στην επιφάνεια του κάθε πηγαδιού

Όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 3.11](#), το ποσοστό μετανάστευσης όταν τα συγκεκριμένα κύτταρα επωάσθηκαν με Σιραμεσίνη 2,5μM και 5μM είναι αντίστοιχα 82% και 83%, με τις δύο περιπτώσεις να είναι σημαντικά μικρότερες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control, που ορίστηκε ως 100%). Το ποσοστό μετανάστευσης στην περίπτωση που ο TMEM97 είναι σε σίγηση (siRNA-TMEM97) είναι παρόμοιο με των κυττάρων μαρτύρων (98%). Στην περίπτωση που είναι απών ο PGRMC1 (siRNA-PGRMC1) και στην περίπτωση που έχουν ταυτόχρονα σιγηθεί ο TMEM97 και ο PGRMC1 (siRNA-PGRMC1&TMEM97, siDOUBLE) τα συγκεκριμένα ποσοστά είναι 71% και 66%, αντίστοιχα, διαφέροντας σημαντικά από το δείγμα ελέγχου.

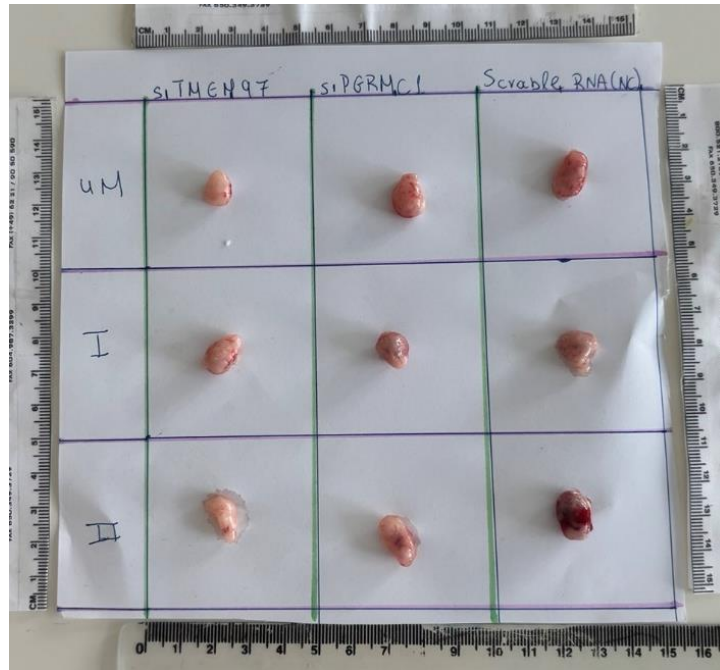
Με βάση τα παραπάνω η σίγηση του PGRMC1 φαίνεται να μειώνει σημαντικά τη μεταναστευτική, διηθητική και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων EANM_att021013 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Επιπλέον, η παρουσία Σιραμεσίνης σε συγκέντρωση 5μM μείωσε σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων ελέγχου (control scramble).



Εικόνα 3.11: Διάγραμμα ποσοτικοποίησης των κυττάρων που εγκαταστάθηκαν στην επιφάνεια των πηγαδιών. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί σύμφωνα με το scrambled, απουσία Σιραμεσίνης. Κάθε ράβδος δείχνει τον μέσο και την τυπική απόκλιση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. ($p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs scrambled)*

9.6 Αποτελέσματα των πειραμάτων in vivo

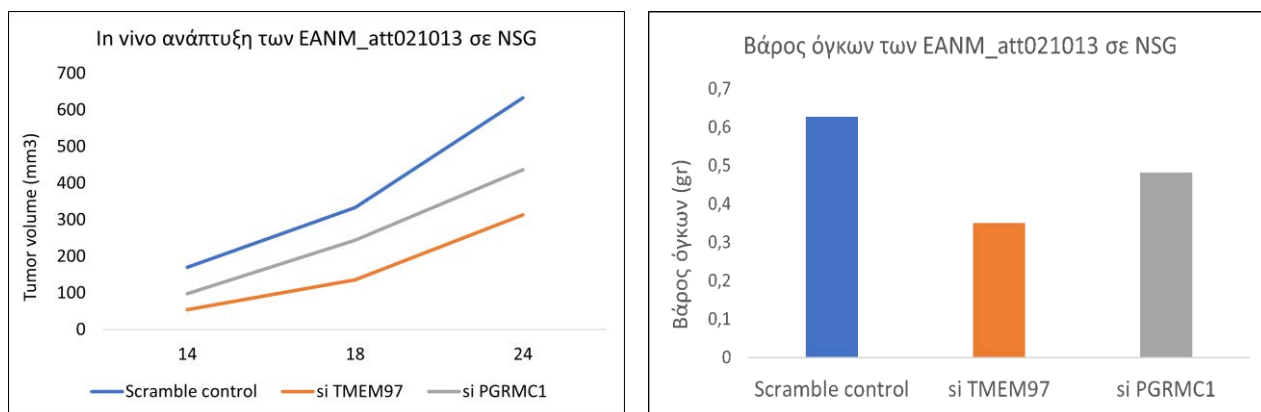
Για την αξιολόγηση της επίδρασης της σίγησης των γονιδίων TMEM97 και PGRMC1 στην *in vivo* καρκινογένεση, κύτταρα EANM_att021013 που είχαν σιγηθεί *in vitro* (siTMEM97 και siPGRMC1) εισήχθηκαν με υποδόρια ένεση σε ανοσοκατασταλμένους μύες NSG. Μετά από την ολοκλήρωση του πειράματος, τα ποντίκια θανατώθηκαν και οι πρωτοπαθείς όγκοι αφαιρέθηκαν και φωτογραφήθηκαν ([Εικόνα 3.12](#)).



Εικόνα 3.12: Μακροσκοπική απεικόνιση πρωτοπαθών όγκων που εξαιρέθηκαν από ποντίκια τα οποία δέχθηκαν υποδόρια ένεση κυττάρων EANM_att021013 με in vitro σίγηση TMEM97 (αριστερά), PGRMC1 (κέντρο) και Scrambled RNA (δεξιά).

Όπως φαίνεται στο γράφημα της [Εικόνας 3.13](#) (αριστερά), η εξέλιξη του όγκου με την πάροδο του χρόνου είναι σαφώς διαφοροποιημένη ανάμεσα στις ομάδες: τα κύτταρα Scrambled (απουσία σιραμεσίνης) εμφανίζουν τη μεγαλύτερη και ταχύτερη αύξηση όγκου, τα siPGRMC1 ακολουθούν με ενδιάμεση ανάπτυξη, ενώ τα siTMEM97 διατηρούν σταθερά τη μικρότερη αύξηση σε όλα τα χρονικά σημεία. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σε καμία από τις πειραματικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκαν μεταστάσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παρεμβάσεις αυτές επηρεάζουν κυρίως την πρωτοπαθή ανάπτυξη του όγκου χωρίς να παρατηρείται εξάπλωση σε απομακρυσμένα όργανα.

Από τη σύγκριση των μετρήσεων όγκου (mm^3) και βάρους (g) των καρκινωμάτων, διαπιστώνεται ότι και οι δύο όγκοι που προήλθαν από σιγημένα κύτταρα παρουσίασαν σαφώς μειωμένη τελική ανάπτυξη σε σχέση με το scrambled. Ειδικότερα, ο όγκος που προήλθε από κύτταρα με σίγηση του TMEM97 (siTMEM97) εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή τόσο σε βάρος (0,36 g) όσο και σε όγκο (320 mm^3), υποδηλώνοντας την ισχυρότερη αναστολή της ανάπτυξης. Αντίθετα, ο όγκος από κύτταρα με σίγηση του PGRMC1 (siPGRMC1) κατέγραψε ενδιάμεσες τιμές, με βάρος 0,49 g και όγκο 450 mm^3 . Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η σίγηση του TMEM97 οδηγεί σε εντονότερη αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε σύγκριση με τη σίγηση του PGRMC1.



Εικόνα 3.13: (Α) In vivo ανάπτυξη των όγκων EANM_att021013 σε ποντίκια NSG: Η γραφική παράσταση απεικονίζει την εξέλιξη του όγκου (σε mm³) με την πάροδο του χρόνου (ημέρες 14, 18 και 24) για τις ομάδες Scrambled control, siTMEM97 και siPGRMC1. (Β) Τελικό βάρος όγκων EANM_att021013 σε ποντίκια NSG (σε γραμμάρια). Κάθε σημείο και κάθε ράβδος απεικονίζει τον μέσο όρο τριών διαφορετικών όγκων ανά συνθήκη

Συμπεράσματα/Συζήτηση

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα διατηρεί την εξαιρετικά επιθετική του φύση χάρη στην ασυμπτωματική του πορεία, την έλλειψη αξιόπιστων πρώιμων βιοδεικτών και τον ταχύτατο σχηματισμό μεταστάσεων. Παρότι κατατάσσεται δωδέκατο σε συχνότητα μεταξύ όλων των καρκίνων, η θνητότητά του είναι δυσανάλογα υψηλή, με ποσοστό πενταετούς επιβίωσης να μην υπερβαίνει το 12%· για αυτόν τον λόγο, συγκαταλέγεται στους πλέον φονικούς καρκίνους παγκοσμίως ευρισκόμενος στην 6^η θέση (Zhao et al., 2024). Η χειρουργική εκτομή του όγκου παραμένει η μόνη θεραπευτική προσέγγιση με δυνατότητα ίασης, ωστόσο εφαρμόζεται σε πολύ περιορισμένο αριθμό ασθενών, καθώς η πλειονότητα διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο ή μεταστατικό στάδιο, όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι εφικτή. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η χημειοθεραπεία αποτελεί τη βασική θεραπευτική επιλογή, αλλά η αποτελεσματικότητά της είναι περιορισμένη λόγω της ανθεκτικότητας των όγκων και των σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών της (McGuigan et al., 2018). Συνεπώς, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων, στοχευμένων αποτελεσματικών και ασφαλών θεραπειών που να διατηρούν την ισχύ τους ακόμη και σε μεταστατικά στάδια, όπου και διαγιγνώσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών.

Οι σίγμα-2 υποδοχείς, αναγνωριζόμενοι πλέον ως TMEM97 (Alon et al., 2017) φαίνεται να αποτελούν έναν νέο, πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο. Οι σ2 υποδοχείς εκφράζονται ευρέως σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς, με ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο, όπου συχνά παρατηρείται υπερέκφρασή τους. Στον παγκρεατικό καρκίνο ο ρόλος τους είναι αντικρουόμενος και εν πολλοίς ανεξερεύνητος, καθώς αν και η έκφραση του TMEM97 στις κυτταρικές σειρές είναι συνήθως αυξημένη, στα κλινικά δείγματα συχνά καταγράφεται υποέκφραση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς (Oyer et al., 2019; Niso et al., 2021; Chandrashekar et al., 2022; Tang et al., 2019).

Αναφορικά με την λειτουργία του, ο TMEM97 διαδραματίζει πολυεπίπεδο ρόλο στην ογκογένεση. Αρχικά, μέσω του σχηματισμού τριμερούς συμπλόκου με τις πρωτεΐνες PGRMC1 και LDLR, ενισχύει σημαντικά την ενδοκύττωση LDL σωματιδίων, αυξάνοντας την πρόσληψη χοληστερόλης από τα καρκινικά κύτταρα (Yang et al., 2020; Thejer et al., 2023). Η χοληστερόλη αυτή είναι απαραίτητη για τη βιογένεση μεμβρανών, τη σταθερότητα των λιπιδιακών σχεδίων και την ενεργοποίηση υποδοχέων όπως ο EGFR και ο IGF-1R, που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφυγή από την απόπτωση (Mollinedo & Gajate, 2020). Επιπλέον, ο TMEM97 φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης ασβεστίου (μέσω SOCE), στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το Akt/mTOR και το Wnt/β-κατενίνης, και στη διαμόρφωση της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), ενισχύοντας τη μεταστατική ικανότητα των όγκων (Cantonero et al., 2020; Cantonero et al., 2021; Son et al., 2024; Zhu et al., 2021; Zhang et al., 2022; Xu et al. 2024).

Στα πλαίσια της ανάγκης για νέους θεραπευτικούς στόχους στον καρκίνο το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί και στην ανάπτυξη εκλεκτικών προσδετών των σίγμα-2 υποδοχέων (σ2 ligands). Οι σ2-ligands περιλαμβάνουν κυρίως συνθετικές ενώσεις, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τη σιραμεσίνη (siramesine), η οποία αποτελεί και την χημική ένωση αναφοράς για την δράση των σ2R

και την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας νέων ανάλογων ενώσεων (Zeng et al., 2014). Η σιραμεσίνη έδειξε ισχυρή αντικαρκινική δράση σε προκλινικές μελέτες, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο μέσω πολλαπλών μηχανισμών όπως η λυσοσωματική αστάθεια, η μιτοχονδριακή βλάβη και η επαγωγή φερόπτωσης (Ostenfeld et al., 2005; Cesen et al., 2013; Ma et al., 2016; Ma et al., 2017). Παρά το γεγονός ότι η δράση της αποδίδεται παραδοσιακά στη σύνδεσή της με τους σ2R, παραμένει ανοιχτό το ερώτημα κατά πόσο οι αντικαρκινικές της ιδιότητες εξαρτώνται αποκλειστικά από την παρουσία του σ2R/TMEM97 ή αν ενεργοποιεί εναλλακτικές οδούς κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητα από αυτόν τον υποδοχέα.

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της αντικαρκινικής δράσης της σιραμεσίνης και των σ2R στον παγκρεατικό καρκίνο. Για τον σκοπό αυτό έγινε σίγηση (siRNA) τόσο του TMEM97 όσο και της συνεργαζόμενης πρωτεΐνης PGRMC1 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, με στόχο να διαπιστωθεί αν η σιραμεσίνη διατηρεί την αντικαρκινική της δράση ακόμη και απουσία αυτών των πρωτεϊνών

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας ανέδειξαν ότι η σιραμεσίνη διατηρεί σε *in vitro* επίπεδο τη δραστηριότητά της έναντι των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων EANM_att021013 ανεξάρτητα από τη σίγηση του υποδοχέα TMEM97. Σε όλα τα πειραματικά μέρη που διεξήχθησαν, η καταστολή της έκφρασης του TMEM97 δεν επηρέασε ουσιαστικά την αποτελεσματικότητα της σιραμεσίνης: η ουσία προκάλεσε σημαντική, δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού, τόσο στα κύτταρα ελέγχου (wild type και scrambled) όσο και στα κύτταρα με σιγημένο TMEM97. Η απουσία διαφορών στη δράση της ένωσης μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών υπογραμμίζει το γεγονός ότι η δράση της σιραμεσίνης δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία των σ2R, αλλά πιθανότατα ενεργοποιεί και εναλλακτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου τουλάχιστον στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα και στις συνθήκες που έγινε η μελέτη.

Έτσι, τα ευρήματά μας φαίνεται να έρχονται σε αντίθεση με την ευρέως αποδεκτή άποψη ότι η σιραμεσίνη ασκεί την αντικαρκινική της δράση αποκλειστικά μέσω των σ2-υποδοχέων/TMEM97 (Fallica et al., 2021; Sereti et al., 2021; Yang et al., 2020; Fotakopoulos et al., 2024). Η αμφισβήτηση αυτής της υπόθεσης δεν αποτελεί καινοφανές εύρημα: η μελέτη των Zeng και των συνεργατών του (2019) – στην οποία πραγματοποιήθηκε knock-out του TMEM97 και του PGRMC1 με την χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 – κατέδειξε ότι η σιραμεσίνη διατηρεί την κυτταροτοξική της δράση ακόμη και μετά από πλήρη σίγηση του σ2-συμπλέγματος, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μηχανισμών κυτταροτοξικότητας ανεξάρτητων από τον υποδοχέα

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μας, πραγματοποιήσαμε σίγηση και της πρωτεΐνης PGRMC1, με την οποία ο TMEM97 σχηματίζει λειτουργικό σύμπλοκο (Yang et al., 2020; Thejer et al., 2023). Τα αποτελέσματα της σίγησης αυτής ήταν ιδιαίτερα αξιοσημείωτα: η απουσία της PGRMC1, ακόμη και χωρίς την παρουσία σιραμεσίνης, είχε έντονα αρνητικές επιπτώσεις στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων EANM_att021013. Συγκεκριμένα, σε όλες τις *in vitro* δοκιμές, τα κύτταρα με σιγημένη την πρωτεΐνη PGRMC1 εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη βιωσιμότητα, πολλαπλασιαστική ικανότητα και ικανότητα μετανάστευσης και διήθησης σε σχέση με τα control ή τα κύτταρα με σιγημένο τον σ2 υποδοχέα (TMEM97), ακόμη και απουσία φαρμακευτικής παρέμβασης.

Αντίθετα, η σίγηση του TMEM97 δεν επηρέασε ουσιαστικά τα βασικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, τα οποία διατήρησαν υψηλή βιωσιμότητα και ικανότητα πολλαπλασιασμού, παρόμοια με τα κύτταρα μάρτυρες. Τα παραπάνω ευρήματα υπογραμμίζουν ότι η PGRMC1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της μεταναστευτικής/διηθητικής ικανότητας των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων EANM_att021013, ανεξάρτητα από την παρουσία του TMEM97 ή της σιραμεσίνης. Η διπλή σίγηση TMEM97 και PGRMC1 είχε επίσης αρνητική επίδραση στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα. Ωστόσο τα αποτελέσματα μάλλον οφείλονται στη σίγηση της PGRMC1, κατά κύριο λόγο, καθώς δεν φάνηκαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο πληθυσμών (siPGRMC1 και siDouble) που να παραπέμπουν σε συνεργιστική δράση, επιβεβαιώνοντας ότι η απώλεια της PGRMC1 αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για τη μείωση της βιωσιμότητας και της λειτουργικότητας των κυττάρων.

Τα ευρήματα αυτά ερμηνεύονται καλύτερα αν επικεντρωθούμε στις πολύπλευρες λειτουργίες του PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) στην καρκινογένεση. Ως πρωτεΐνη-καταλύτης, το PGRMC1 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων—όπως ο EGFR—και σηματοδοτικών μονοπατιών τύπου AKT/mTOR (Pedroza et al., 2020). Παράλληλα, διαμορφώνει το μεταβολικό προφίλ του όγκου ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό λιπιδίων και χοληστερόλης, διατηρώντας την ομοιόσταση της αίμης (heme), του Fe^{2+} και του Ca^{2+} και συντονίζοντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία (Asperger et al., 2020; Gunaratne et al., 2023; McGuire & Espenshade, 2022). Πειράματα των Shih και συνεργατών (2019) έδειξαν ότι η σίγηση του PGRMC1 καταστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κυττάρων στη φάση G1, εύρημα που συνάδει με τα αδημοσίευτα αποτελέσματά μας από κυτταρομετρία ροής. Ως εκ τούτου, η σίγηση του PGRMC1 μειώνει σημαντικά την πολλαπλασιαστική ικανότητα και τη συνολική βιωσιμότητα των κυττάρων. Προς επίρρωση του ιδιαίτερου ρόλου του PGRMC1 στην ογκογένεση, τα πειράματα μετανάστευσης/διήθησης με ένθετα (transwell) ανέδειξαν τον καθοριστικό ρόλο του PGRMC1 στη μετανάστευση και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων, ευθυγραμμίζοντας τα ευρήματά μας με τη βιβλιογραφία που χαρακτηρίζει τον PGRMC1 ως κεντρικό ρυθμιστή της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) (Shih et al., 2019).

Τέλος τα προκαταρκτικά *in vivo* πειράματα ανέδειξαν σημαντικές διαφορές στην ικανότητα δημιουργία όγκων στους διάφορους πληθυσμούς. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί με παροδική σίγηση του TMEM97 οδήγησαν σε καθυστερημένη ανάπτυξη όγκων σε σχέση τόσο με τους όγκους από κύτταρα μάρτυρες (scrambled) όσο και σε σχέση με τη σίγηση της PGRMC1. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως να υποδηλώνει ότι ο TMEM97 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ογκογένεσης και της ανάπτυξης του όγκου *in vivo*, πιθανώς λόγω της εμπλοκής του στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και της αλληλεπίδρασης με το μικροπεριβάλλον του όγκου, παράγοντες που δεν αποτυπώνονται πλήρως στα πειράματα κυτταρικής καλλιέργειας.

Συμπερασματικά στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι οι δύο υποδοχείς μπορεί να εμφανίζουν διαφορική δράση εμπλεκόμενοι σε διαφορετικά χαρακτηριστικά των πρωτογενών παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων ενώ υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η Σιραμεσίνη μπορεί να ασκεί την αντικαρκινική της δράση με μηχανισμούς ανεξάρτητους των σ2R. Ωστόσο, απαιτούνται πολύ πιο αναλυτικές μελέτες για την επιβεβαίωση του ρόλου των δύο υποδοχέων στη δράση της σιραμεσίνης.

αλλά και στην ογκογένεση του παγκρεατικού καρκίνου. Ένα βασικό μειονέκτημα της εν λόγω μελέτης, για παράδειγμα, ήταν η παροδική σίγηση των υποδοχέων, μειονέκτημα το οποίο δεν μας επέτρεψε τη μελέτη σε βάθος χρόνου αλλά και ούτε υπό την χορήγηση σιραμεσίνης. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η μόνιμη σίγηση των υποδοχέων ώστε να διερευνηθεί με μεγαλύτερη αξιοπιστία η παρατήρηση αυτή αλλά και ο ρόλος των υποδοχέων σε *in vivo* επίπεδο με ταυτόχρονη δράση της σιραμεσίνης, τουλάχιστον στον παγκρεατικό καρκίνο.

Βιβλιογραφία

- Alon, A., Lyu, J., Braz, J. M., Tummino, T. A., Craik, V., O'Meara, M. J., Webb, C. M., Radchenko, D. S., Moroz, Y. S., Huang, X. P., Liu, Y., Roth, B. L., Irwin, J. J., Basbaum, A. I., Shoichet, B. K., & Kruse, A. C. (2021). Structures of the σ_2 receptor enable docking for bioactive ligand discovery. *Nature*, 600(7890), 759–764. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04175-x>
- Alon, A., Schmidt, H. R., Wood, M. D., Sahn, J. J., Martin, S. F., & Kruse, A. C. (2017). Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), 7160–7165. doi:10.1073/pnas.1705154114
- Alvarez Fallas, M. E., Pedraza-Arevalo, S., Cujba, A.-M., Manea, T., Lambert, C., Morrugares, R., & Sancho, R. (2021). Stem/progenitor cells in normal physiology and disease of the pancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 538, 111459. doi:10.1016/j.mce.2021.111459
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2025*. Atlanta: American Cancer Society, 2025. Available at <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2025-cancer-facts-figures.html>
- Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, J. T., Kucuk, O., Khan, G. N., Huang, G. S., Mi, S., Lee, H. Y., Reichrath, J., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., Ciriolo, M. R., ... Shin, D. M. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in cancer biology*, 35 Suppl, S55–S77. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.005>
- Artero, M. R., Minery, A., Nedelcev, L., Radanova, M., & Roumenina, L. T. (2025). Complement and the hallmarks of cancer. *Seminars in immunology*, 78, 101950. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2025.101950>
- Asperger, H., Stamm, N., Gierke, B., Pawlak, M., Hofmann, U., Zanger, U. M., Marton, A., Katona, R. L., Buhala, A., Vizler, C., Cieslik, J. P., Ruckhäberle, E., Niederacher, D., Fehm, T., Neubauer, H., & Ludescher, M. (2020). Progesterone receptor membrane component 1 regulates lipid homeostasis and drives oncogenic signaling resulting in breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01312-8>
- Badve, P., & Meier, K. K. (2024). Defining Requirements for Heme Binding in PGRMC1 and Identifying Key Elements that Influence Protein Dimerization. *Biochemistry*, 63(7), 926–938. doi:10.1021/acs.biochem.3c00718

- Bai, Y., Ludescher, M., Poschmann, G., Stühler, K., Wyrich, M., Oles, J., ... & Neubauer, H. (2021). PGRMC1 promotes progesterin-dependent proliferation of breast cancer cells by binding prohibitins resulting in activation of ER α signaling. *Cancers*, 13(22), 5635.
- Barata, I. S., Rueff, J., Kranendonk, M., & Esteves, F. (2024). Pleiotropy of Progesterone Receptor Membrane Component 1 in Modulation of Cytochrome P450 Activity. *Journal of Xenobiotics*, 14(2), 575-603. <https://doi.org/10.3390/jox14020034>
- Bengtsson, A., Andersson, R. & Ansari, D. The actual 5-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma based on real-world data. *Sci Rep* 10, 16425 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73525-y>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Blood cell indices - White blood cell count. (2025). McGill.ca. https://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/bloodlab/WBC_count.htm
- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572751.
- Cahill, M. A. (2017). The evolutionary appearance of signaling motifs in PGRMC1. *Bioscience trends*, 11(2), 179-192.
- Cahill, M. A., Jazayeri, J. A., Catalano, S. M., Toyokuni, S., Kovacevic, Z., & Richardson, D. R. (2016). The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochimica et biophysica acta*, 1866(2), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.07.004>
- Cahill, M. A., Jazayeri, J. A., Catalano, S. M., Toyokuni, S., Kovacevic, Z., & Richardson, D. R. (2016). The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1866(2), 339-349.
- Cancer Today. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population>
- Cantonero, C., Camello, P. J., Abate, C., Berardi, F., Salido, G. M., Rosado, J. A., & Redondo, P. C. (2020). NO1, a New Sigma 2 Receptor/TMEM97 Fluorescent Ligand, Downregulates SOCE and Promotes Apoptosis in the Triple Negative Breast Cancer Cell Lines. *Cancers*, 12(2), 257. <https://doi.org/10.3390/cancers12020257>
- Cantonero, C., Camello, P. J., Salido, G. M., Rosado, J. A., & Redondo, P. C. (2021). TMEM97 facilitates the activation of SOCE by downregulating the association of cholesterol to Orai1 in MDA-MB-231 cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1866(6), 158906. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158906>
- Carrillo, A. (2023, January 18). *Gel Electrophoresis Steps*. Azure Biosystems. <https://azurebiosystems.com/blog/gel-electrophoresis-steps/>

- Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Creighton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 25, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>
- Chen, K., Li, Y., Zhang, X., Ullah, R., Tong, J., & Shen, Y. (2022). The role of the PI3K/AKT signalling pathway in the corneal epithelium: recent updates. *Cell death & disease*, 13(5), 513. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04963-x>
- Chen, Y. J., Knupp, J., Arunagiri, A., Haataja, L., Arvan, P., & Tsai, B. (2021). PGRMC1 acts as a size-selective cargo receptor to drive ER-phagic clearance of mutant prohormones. *Nature communications*, 12(1), 5991. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26225-8>
- Colom-Cadena, M., Toombs, J., Simzer, E., Holt, K., McGeachan, R., Tulloch, J., Jackson, R. J., Catterson, J. H., Spires-Jones, M. P., Rose, J., Waybright, L., Caggiano, A. O., King, D., Gobbo, F., Davies, C., Hooley, M., Dunnett, S., Tempelaar, R., Meftah, S., Tzioras, M., ... Spires-Jones, T. L. (2024). Transmembrane protein 97 is a potential synaptic amyloid beta receptor in human Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 147(1), 32. <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02679-6>
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J., & Ciccarone, V. C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods (San Diego, Calif.)*, 33(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.023>
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., & Gharagouzlo, E. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International journal of biomedical science : IJBS*, 13(2), 48–57.
- De Brito e Cunha, D., Frederico, A. B. T., Azamor, T., Melgaço, J. G., da Costa Neves, P. C., Bom, A. P. D. A., Tilli, T. M., & Missailidis, S. (2022). Biotechnological Evolution of siRNA Molecules: From Bench Tool to the Refined Drug. *Pharmaceuticals*, 15(5), 575. <https://doi.org/10.3390/ph15050575>
- De Castro, I.P. (2019). Cell Metabolism in Cancer: An Energetic Switch. In: Fior, R., Zilhão, R. (eds) *Molecular and Cell Biology of Cancer. Learning Materials in Biosciences*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9_6
- Di Costanzo F, Di Costanzo F, Antonuzzo L, Mazza E, Giommoni E. Optimizing First-Line Chemotherapy in Metastatic Pancreatic Cancer: Efficacy of FOLFIRINOX versus Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine. *Cancers*. 2023, 15(2):416. <https://doi.org/10.3390/cancers15020416>
- Di Lonardo, A., Nasi, S., & Pulciani, S. (2015). Cancer: we should not forget the past. *Journal of Cancer*, 6(1), 29–39. <https://doi.org/10.7150/jca.10336>
- DiMagno E. P. (1999). Pancreatic cancer: clinical presentation, pitfalls and early clues. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 10 Suppl 4, 140–142.

- Ducreux, M., Cuhna, A. S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goéré, D., Seufferlein, T., Haustermans, K., Van Laethem, J. L., Conroy, T., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26 Suppl 5, v56–v68. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv295>
- Eissenberg J. C. (2013). Telomeres, cancer & aging: live long & prosper?. *Missouri medicine*, 110(1), 11–16.
- Enweluzo, C., & Aziz, F. (2013). Pancreatic Cancer and Gastroenterology: A Review. *Gastroenterology research*, 6(3), 81–84. <https://doi.org/10.4021/gr563w>
- Fan, H., Lu, J., Guo, Y., Li, D., Zhang, Z. M., Tsai, Y. H., Pi, W. C., Ahn, J. H., Gong, W., Xiang, Y., Allison, D. F., Geng, H., He, S., Diao, Y., Chen, W. Y., Strahl, B. D., Cai, L., Song, J., & Wang, G. G. (2020). BAHCC1 binds H3K27me3 via a conserved BAH module to mediate gene silencing and oncogenesis. *Nature genetics*, 52(12), 1384–1396. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00729-3>
- Fang, X. (2024). *Role of TMEM97/Σ2 Receptor in Regulating Androgen Receptor Activities in Prostate Cancer (thesis)*. Retrieved from <https://books.google.gr/books?id=t35i0QEACAAJ>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- Fior, R. (2019). Cancer - when Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet. In: Fior, R., Zilhão, R. (eds) *Molecular and Cell Biology of Cancer*. Learning Materials in Biosciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9_1
- Fishback, J. A., Robson, M. J., Xu, Y. T., & Matsumoto, R. R. (2010). Sigma receptors: potential targets for a new class of antidepressant drug. *Pharmacology & therapeutics*, 127(3), 271–282.
- Fountain Life. (n.d.). *Early signs of pancreatic cancer*. Fountain Life. <https://www.fountainlife.com/blog/early-signs-of-pancreatic-cancer>
- Furuhata, R., Kabe, Y., Kanai, A., Sugiura, Y., Tsugawa, H., Sugiyama, E., Hirai, M., Yamamoto, T., Koike, I., Yoshikawa, N., Tanaka, H., Koseki, M., Nakae, J., Matsumoto, M., Nakamura, M., & Suematsu, M. (2020). Progesterone receptor membrane associated component 1 enhances obesity progression in mice by facilitating lipid accumulation in adipocytes. *Communications biology*, 3(1), 479. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01202-x>
- Globocan 2022, <https://gco.iarc.fr/today/en/fact-sheets-cancers>
- Grumolato, L., Aaronson, S. (2017). Positive Mediators of Cell Proliferation in Neoplasia: Growth Factors and Receptors. In: Coleman, W., Tsongalis, G. (eds) *The Molecular Basis of Human Cancer*. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-458-2_9
- Gunaratne, G. S., Kumar, S., Lin-Moshier, Y., Slama, J. T., Brailoiu, E., Patel, S., ... Marchant, J. S. (2023). Progesterone receptor membrane component 1 facilitates Ca²⁺ signal amplification

between endosomes and the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 299(12). doi:10.1016/j.jbc.2023.105378

- Gupta, Amit, Rajput, Deepak, Krishnasamy, Shyam Karuppusamy, Sharma, Oshin, Mishra, Rahul, Tandon, Amoli, Gupta, Sweety1. Clinical presentation and outcomes of pancreatic cancer at a tertiary care hospital in the sub-Himalayan region: A retrospective observational study. *Cancer Research, Statistics, and Treatment* 6(1):p 44-51, Jan–Mar 2023. | DOI: 10.4103/crst.crst_201_22
- Hajdu, S.I. (2011), A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117: 1097-1102. <https://doi.org/10.1002/cncr.25553>
- Han, Qiao and Cao, Wei and Zhang, Yulin and Han, Yu and Li, Xingyang and Wu, Antong and Li, Rui and Zhang, Xin and Lin, Zhongxiao and Redenski, Idan and Srouji, Samer and Wu, Gang and zhang, qingbin, Histatin-1 Enhances Angiogenic Differentiation of Human Endothelial Cells Possibly Via Activation Of Sigma-2 Receptors <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4705209>
- Hanafi, M. S. A. A. (2021). Targeting Sigma-2 Receptor and ZFP91 in Pancreatic Cancer (Doctoral dissertation).
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
- Hanahan, D., & Monje, M. (2023). Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer cell*, 41(3), 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.012>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Izzo, N. J., Yuede, C. M., LaBarbera, K. M., Limegrover, C. S., Rehak, C., Yurko, R., Waybright, L., Look, G., Rishton, G., Safferstein, H., Hamby, M. E., Williams, C., Sadlek, K., Edwards, H. M., Davis, C. S., Grundman, M., Schneider, L. S., DeKosky, S. T., Chelsky, D., Pike, I., ... Catalano, S. M. (2021). Preclinical and clinical biomarker studies of CT1812: A novel approach to Alzheimer's disease modification. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17(8), 1365–1382. <https://doi.org/10.1002/alz.12302>
- Janovská, P., Normant, E., Miskin, H., & Bryja, V. (2020). Targeting Casein Kinase 1 (CK1) in Hematological Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9026. <https://doi.org/10.3390/ijms21239026>
- Jelski, W., & Mroczko, B. (2019). Biochemical diagnostics of pancreatic cancer - Present and future. *Clinica chimica acta, international journal of clinical chemistry*, 498, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.08.013>
- Kabe, Y., Nakane, T., Koike, I., Yamamoto, T., Sugiura, Y., Harada, E., Sugase, K., Shimamura, T., Ohmura, M., Muraoka, K., Yamamoto, A., Uchida, T., Iwata, S., Yamaguchi, Y., Krayukhina, E., Noda, M., Handa, H., Ishimori, K., Uchiyama, S., Kobayashi, T., ... Suematsu, M. (2016). Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation

and chemoresistance. *Nature communications*, 7, 11030.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11030>

- Klawonn, A. M., Nilsson, A., Rådberg, C. F., Lindström, S. H., Ericson, M., Granseth, B., Engblom, D., & Fritz, M. (2017). The Sigma-2 Receptor Selective Agonist Siramesine (Lu 28-179) Decreases Cocaine-Reinforced Pavlovian Learning and Alters Glutamatergic and Dopaminergic Input to the Striatum. *Frontiers in pharmacology*, 8, 714.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00714>
- Kyung-No Son, Sang Min Lee, Dominick Pierre-Jacques, GUNNAM NA, Dhara Shah, Alison Ondrus, Stephanie Cologna, Vinay Kumar Aakalu, 20(S)-OHC modulates gene expression related to cholesterol metabolism and phosphoinositide signaling in human corneal epithelium.. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2024,65(7):1993.
- Largent, B. L., Gundlach, A. L., & Snyder, S. H. (1986). Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 238(2), 739–748.
- Li, J., Shen, H., & Guo, L. W. (2024). Transmembrane protein TMEM97 and epigenetic reader BAHCC1 constitute an axis that supports pro-inflammatory cytokine expression. *Cellular signalling*, 116, 111069. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2024.111069>
- Li, Y., Xie, X., Liao, S., Zeng, Z., Li, S., Xie, B., Huang, Q., Zhou, H., Zhou, C., Lin, J., Huang, Y., & Xu, D. (2022). A011, a novel small-molecule ligand of σ_2 receptor, potently suppresses breast cancer progression via endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 152, 113232.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113232>
- Li, Z., & Rana, T. M. (2012). Molecular Mechanisms of RNA-Triggered Gene Silencing Machineries. *Accounts of Chemical Research*, 45(7), 1122–1131. doi:10.1021/ar200253u
- Lim, P. S., Patil, A., & Sashankar, A. (2023). The pancreas. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 24(10), 644–649. doi:10.1016/j.mpaic.2023.07.006
- Lizama, B. N., Kahle, J., Catalano, S. M., Caggiano, A. O., Grundman, M., & Hamby, M. E. (2023). Sigma-2 Receptors-From Basic Biology to Therapeutic Target: A Focus on Age-Related Degenerative Diseases. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6251.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076251>
- Ma, D., Sun, W., Fu, C., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., Jaspers, R. T., Bolscher, J. G. M., Bikker, F. J., & Wu, G. (2022). GPCR/endocytosis/ERK signaling/S2R is involved in the regulation of the internalization, mitochondria-targeting and -activating properties of human salivary histatin 1. *International journal of oral science*, 14(1), 42. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00181-5>
- Ma, S., Dielschneider, R. F., Henson, E. S., Xiao, W., Choquette, T. R., Blankstein, A. R., Chen, Y., & Gibson, S. B. (2017). Ferroptosis and autophagy induced cell death occur independently

- after siramesine and lapatinib treatment in breast cancer cells. *PloS one*, 12(8), e0182921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182921>
- Ma, S., Henson, E.S., Chen, Y., et al. (2016) Ferroptosis is Induced Following Siramesine and Lapatinib Treatment of Breast Cancer Cells. *Cell Death & Disease*, 7, e2307. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.208>
- Mach, R. H., Zeng, C., & Hawkins, W. G. (2013). The σ_2 receptor: a novel protein for the imaging and treatment of cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 56(18), 7137–7160. <https://doi.org/10.1021/jm301545c>
- Magalhães, A., Dias, S. (2019). Angiogenesis – Vessels Recruitment by Tumor Cells. In: Fior, R., Zilhão, R. (eds) *Molecular and Cell Biology of Cancer*. Learning Materials in Biosciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9_8
- Majeed, C. N., Ma, C. D., Xiao, T., Rudnick, S., & Bonkovsky, H. L. (2022). Spotlight on Givosiran as a Treatment Option for Adults with Acute Hepatic Porphyria: Design, Development, and Place in Therapy. *Drug design, development and therapy*, 16, 1827–1845. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S281631>
- Maletzki, C., Bock, S., Fruh, P., Macius, K., Witt, A., Prall, F., & Linnebacher, M. (2020). NSG mice as hosts for oncological precision medicine. *Laboratory investigation, a journal of technical methods and pathology*, 100(1), 27–37. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0298-6>
- Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E., & Gilbert, P. E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 197(3), 517–532.
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World journal of gastroenterology*, 24(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- McGuire, M. R., & Espenshade, P. J. (2022). PGRMC1: An enigmatic heme-binding protein. *Pharmacology & therapeutics*, 241, 108326. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108326>
- McGuire, M. R., Mukhopadhyay, D., Myers, S. L., Mosher, E. P., Brookheart, R. T., Kammers, K., Sehgal, A., Selen, E. S., Wolfgang, M. J., Bumpus, N. N., & Espenshade, P. J. (2021). Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) binds and stabilizes cytochromes P450 through a heme-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 297(5), 101316. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101316>
- Mollinedo, F., & Gajate, C. (2020). Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *Journal of lipid research*, 61(5), 611–635. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000439>

- Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., & Salic, A. (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nature chemical biology*, 9(9), 557–564. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1290>
- Nguyen, N. T., Jaramillo-Martinez, V., Mathew, M., Suresh, V. V., Sivaprakasam, S., Bhutia, Y. D., & Ganapathy, V. (2023). Sigma Receptors: Novel Regulators of Iron/Heme Homeostasis and Ferroptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14672. <https://doi.org/10.3390/ijms241914672>
- Nicholson, H., Mesangeau, C., McCurdy, C. R., & Bowen, W. D. (2016). Sigma-2 receptors play a role in cellular metabolism: stimulation of glycolytic hallmarks by CM764 in human SK-N-SH neuroblastoma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 356(2), 232–243.
- Niso, M., Kopecka, J., Abatematteo, F. S., Berardi, F., Riganti, C., & Abate, C. (2021). Multifunctional thiosemicarbazones targeting sigma receptors: in vitro and in vivo antitumor activities in pancreatic cancer models. *Cellular oncology (Dordrecht, Netherlands)*, 44(6), 1307–1323. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00638-5>
- Ostenfeld, M. S., Fehrenbacher, N., Høyer-Hansen, M., Thomsen, C., Farkas, T., & Jäättelä, M. (2005). Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer research*, 65(19), 8975–8983. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0269>
- Oyer, H. M., Sanders, C. M., & Kim, F. J. (2019). Small-Molecule Modulators of Sigma1 and Sigma2/TMEM97 in the Context of Cancer: Foundational Concepts and Emerging Themes. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1141. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01141>
- Panegyres K. (2024). The story of how cancer got its name. *Cancer*, 130(20), 3401–3403. <https://doi.org/10.1002/cncr.35428>
- Pedroza, D. A., Rajamanickam, V., Subramani, R., Bencomo, A., Galvez, A., & Lakshmanaswamy, R. (2020). Progesterone receptor membrane component 1 promotes the growth of breast cancers by altering the phosphoproteome and augmenting EGFR/PI3K/AKT signalling. *British journal of cancer*, 123(8), 1326–1335. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0992-6>
- Pedroza, D. A., Subramani, R., Tiula, K., Do, A., Rashiraj, N., Galvez, A., Chatterjee, A., Bencomo, A., Rivera, S., & Lakshmanaswamy, R. (2021). Crosstalk between progesterone receptor membrane component 1 and estrogen receptor α promotes breast cancer cell proliferation. *Laboratory investigation, a journal of technical methods and pathology*, 101(6), 733–744. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00594-6>
- Peluso, J. J., & Pru, J. K. (2014). Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function. *REPRODUCTION*, 147(5), R169-R178. Retrieved Jun 30, 2025, from <https://doi.org/10.1530/REP-13-0582>
- Peluso, J. J., Lodde, V., & Liu, X. (2012). Progesterone regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) sumoylation and transcriptional activity in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology*, 153(8), 3929–3939.

- Pergolizzi, J., Varrassi, G., Coleman, M., Breve, F., Christo, D. K., Christo, P. J., & Moussa, C. (2023). The Sigma Enigma: A Narrative Review of Sigma Receptors. *Cureus*, 15(3), e35756. <https://doi.org/10.7759/cureus.35756>
- Perregaard, J., Moltzen, E. K., Meier, E., & Sánchez, C. (1995). Sigma ligands with subnanomolar affinity and preference for the sigma 2 binding site. 1. 3-(omega-aminoalkyl)-1H-indoles. *Journal of medicinal chemistry*, 38(11), 1998–2008. <https://doi.org/10.1021/jm00011a019>
- Piel, R. B., Iii, Shiferaw, M. T., Vashisht, A. A., Marcero, J. R., Praissman, J. L., Phillips, J. D., ... Medlock, A. E. (2016). A Novel Role for Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): A Partner and Regulator of Ferrochelatase. *Biochemistry*, 55(37), 5204–5217. doi:10.1021/acs.biochem.6b00756
- Póvoa, V., Fior, R. (2019). Cancer Immunoediting and Hijacking of the Immune System. In: Fior, R., Zilhão, R. (eds) *Molecular and Cell Biology of Cancer*. Learning Materials in Biosciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9_7
- Rahib, Lola PhD, Coffin, Tara PhD, Kenner, Barbara PhD. Factors Driving Pancreatic Cancer Survival Rates. *Pancreas* ():10.1097/MPA.0000000000002489, March 19, 2025. | DOI: 10.1097/MPA.0000000000002489
- Riad, A., Zeng, C., Weng, C. C., Winters, H., Xu, K., Makvandi, M., Metz, T., Carlin, S., & Mach, R. H. (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), 16845. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35430-3>
- Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational oncology*, 13(6), 100773. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>
- Rosen, R. D., & Sapra, A. (2023). TNM Classification. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Sabbir, M. G. (2019). Progesterone induced Warburg effect in HEK293 cells is associated with post-translational modifications and proteasomal degradation of progesterone receptor membrane component 1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 191, 105376.
- Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A. C. (2016). Crystal structure of the human $\sigma 1$ receptor. *Nature*, 532(7600), 527–530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>
- Schneck, H., Ruan, X., Seeger, H., Cahill, M. A., Fehm, T., Mueck, A. O., & Neubauer, H. (2013). Membrane-receptor initiated proliferative effects of dienogest in human breast cancer cells. *Gynecological Endocrinology*, 29(2), 160-162.
- Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
- Shih, C. C., Chou, H. C., Chen, Y. J., Kuo, W. H., Chan, C. H., Lin, Y. C., Liao, E. C., Chang, S. J., & Chan, H. L. (2019). Role of PGRMC1 in cell physiology of cervical cancer. *Life sciences*, 231, 116541. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.016>

- Søby, K. K., Mikkelsen, J. D., Meier, E., & Thomsen, C. (2002). Lu 28-179 labels a sigma(2)-site in rat and human brain. *Neuropharmacology*, 43(1), 95–100. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00071-0](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00071-0)
- Son, K.-N., Lee, S. M., Pierre-Jacques, D., Na, G., Shah, D., Ondrus, A., Cologna, S., Aakalu, V. K. (2024). 20(S)-OHC modulates gene expression related to cholesterol metabolism and phosphoinositide signaling in human corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 65(7), 1993–1993.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/science.1102514>
- Sutton, D. (2020). *The ABCs and 123s of Cancer Stages*. Lanermc.org. <https://www.lanermc.org/community/lane-health-blog/the-abcs-and-123s-of-cancer-stages>
- Takchi, R., Prudner, B. C., Vangveravong, S., VanTine, B. A., SPitzer, D., & Hawkins, W. G. (2020). Disruption of cholesterol metabolism via sigma-2 ligands induces cell death in pancreatic cancer. *HPB*, 22, S66. doi:10.1016/j.hpb.2020.04.528
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic acids research*, 47(W1), W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
- Thejer, B. M., Adhikary, P. P., Kaur, A., Teakel, S. L., Van Oosterum, A., Seth, I., Pajic, M., Hannan, K. M., Pavy, M., Poh, P., Jazayeri, J. A., Zaw, T., Pascovici, D., Ludescher, M., Pawlak, M., Cassano, J. C., Turnbull, L., Jazayeri, M., James, A. C., Coorey, C. P., ... Cahill, M. A. (2020). PGRMC1 phosphorylation affects cell shape, motility, glycolysis, mitochondrial form and function, and tumor growth. *BMC molecular and cell biology*, 21(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00256-3>
- Thejer, B. M., Infantino, V., Santarsiero, A., Pappalardo, I., Abatematteo, F. S., Teakel, S., Van Oosterum, A., Mach, R. H., Denora, N., Lee, B. C., Resta, N., Bagnulo, R., Niso, M., Contino, M., Montsch, B., Heffeter, P., Abate, C., & Cahill, M. A. (2023). Sigma-2 Receptor Ligand Binding Modulates Association between TSPO and TMEM97. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6381. <https://doi.org/10.3390/ijms24076381>
- Thomas P. (2022). Membrane Progesterone Receptors (mPRs, PAQRs): Review of Structural and Signaling Characteristics. *Cells*, 11(11), 1785. <https://doi.org/10.3390/cells11111785>
- Vaupel D. B. (1983). Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF 10,047 in the dog. *European journal of pharmacology*, 92(3-4), 269–274. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90297-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(83)90297-2)
- Velázquez Hernández, D. M., Vázquez-Martínez, E. R., & Camacho-Arroyo, I. (2022). The role of progesterone receptor membrane component (PGRMC) in the endometrium. *Steroids*, 184, 109040. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109040>

- Weng, T. Y., Tsai, S. A., & Su, T. P. (2017). Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *Journal of biomedical science*, 24(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0380-6>
- Willibald, M., Bayer, G., Stahlhut, V., Poschmann, G., Stühler, K., Gierke, B., ... & Neubauer, H. (2017). Progesterone receptor membrane component 1 is phosphorylated upon progestin treatment in breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(42), 72480.
- World Health Organization. Health topics: cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- Worldwide cancer data. World Cancer Research Fund. <https://www.wcrf.org/preventing-cancer/cancer-statistics/worldwide-cancer-data/>
- Xu, Y., Tang, Y., Xu, Q., & He, W. (2024). TMEM97 knockdown inhibits 5-fluorouracil resistance by regulating epithelial-mesenchymal transition and ABC transporter expression via inactivating the Akt/mTOR pathway in 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer cells. *Chemical Biology & Drug Design*, 103, e14490. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14490>
- Yang, K., Zeng, C., Wang, C., Sun, M., Yin, D., & Sun, T. (2020). Sigma-2 Receptor—A Potential Target for Cancer/Alzheimer's Disease Treatment via Its Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Molecules*, 25(22), 5439. <https://doi.org/10.3390/molecules25225439>
- Zeng, C., Riad, A., & Mach, R. H. (2020). The Biological Function of Sigma-2 Receptor/TMEM97 and Its Utility in PET Imaging Studies in Cancer. *Cancers*, 12(7), 1877. <https://doi.org/10.3390/cancers12071877>
- Zeng, C., Rothfuss, J. M., Zhang, J., Vangveravong, S., Chu, W., Li, S., Tu, Z., Xu, J., & Mach, R. H. (2014). Functional assays to define agonists and antagonists of the sigma-2 receptor. *Analytical biochemistry*, 448, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.008>
- Zhang, L., Sanagapalli, S., & Stoita, A. (2018). Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 24(19), 2047–2060. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i19.2047>
- Zhang, P., Tian, Q., Gao, H., Zhao, A., Shao, Y., & Yang, J. (2022). Inhibition of MAC30 exerts antitumor effects in nasopharyngeal carcinoma via affecting the Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(7), e23061. doi:10.1002/jbt.23061
- Zhang, Y., Fang, X., Wang, J., & Nie, D. (2023). TMEM97/Sigma 2 Receptor Increases Estrogen Receptor α Activity in Promoting Breast Cancer Cell Growth. *Cancers*, 15(23), 5691. <https://doi.org/10.3390/cancers15235691>
- Zhao, H., Zhang, Y., Liu, H. *et al.* Age-period-cohort analysis of global, regional, and national pancreatic cancer incidence, mortality, and disability-adjusted life years, 1990–2019. *BMC Cancer* 24, 1063 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12885-024-12835-0>
- Zhao, Y., Ruan, X., Cheng, J., Xu, X., Gu, M., & Mueck, A. O. (2023). PGRMC1 promotes triple-negative breast cancer cell growth via suppressing ferroptosis. *Climacteric*, 26(2), 135–142. <https://doi.org/10.1080/13697137.2023.2170225>

- Zhou, J., Chen, Z., Li, J., Deng, Q., Peng, X., & Li, L. (2023). Expression of PGRMC1 in patients with polycystic ovary syndrome and its molecular mechanism for regulating ovarian granulosa cell apoptosis and glucolipid metabolism. *Journal of Central South University. Medical sciences*, 48(4), 538–549. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2023.220315>
- Zhu, H., Su, Z., Ning, J., Zhou, L., Tan, L., Sayed, S., Song, J., Wang, Z., Li, H., Sun, Q., Liu, S., Sha, O., Leng, F., Chen, X., & Lu, D. (2021). Transmembrane protein 97 exhibits oncogenic properties via enhancing LRP6-mediated Wnt signaling in breast cancer. *Cell death & disease*, 12(10), 912. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04211-8>
- Σερέτη, Ε. Α. (2019). Σίγμα υποδοχείς: μελέτη του ρόλου τους στην καρκινογένεση και στην ανάπτυξη νέων έξυπνων στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών. <https://doi.org/10.12681/eadd/46489>