



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

# Πτυχιακή Εργασία

Έκφραση των sigma υποδοχέων σε εγκαθιδρυμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Expression of sigma receptors in established human cancer cell lines.

Καλαϊτσίδου Ελισάβετ  
Λάρισα 2019

## Τριμελής Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Δήμας:

Αναπληρωτής καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Άννα-Μαρία Ψαρρά:

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γρηγόρης Ζωίδης:

Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

## Ευχαριστίες:

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πτυχιακή εργασία στα πλαίσια του προπτυχιακού επιπέδου και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα για την δυνατότητα, να ενταχθώ στο εργαστήριο του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος την Ευαγγελία Σερέτη για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά της.

## Περιεχόμενα:

Περίληψη:.....	4
<b>1. Καρκίνος:</b> .....	6
1.1. Ανάπτυξη του καρκίνου.....	7
1.2. Αιτίες του καρκίνου.....	8
1.3. Διαφορές ανάμεσα στα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα .....	9
1.4. Γονίδια.....	10
1.5. Προσεγγίσεις στην Θεραπεία του καρκίνου.....	11
1.6 Στατιστικά.....	12
<b>2. Sigma υποδοχείς:</b> .....	13
2.1. Sigma1.....	14
2.1.1 Δομή.....	15
2.1.2 Ισομορφές.....	16
2.1.3 Ρόλος.....	16
2.2. Sigma2.....	19
2.2.1 PGRMC1 ως Sigma2.....	19
2.2.2 TMEM97 ως Sigma2.....	20
2.2.3 Ισομορφές του PGRMC1 και του TMEM97.....	21
<b>3. Sigma υποδοχείς και καρκίνος</b> .....	22
<b>4. Αγωνιστές/Ανταγωνιστές των sigma υποδοχέων, ως μελλοντικά φάρμακα</b> .....	23
<b>5. Σκοπός</b> .....	24
<b>6. Πειραματική Διαδικασία</b> .....	24
6.1. Καλλιέργειες.....	24
6.2. Υλικά για καλλιέργειες.....	25
6.3. Μέθοδοι καλλιέργειας.....	26
6.4. Λύση κυττάρων.....	28
6.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	29
6.6. Ανοσοαποτύπωση (Western Blot.....	31
<b>7. Αποτελέσματα:</b> .....	36
7.1. Έλεγχος έκφρασης των Sigma1 υποδοχέων μέσω Western Blot.....	36
7.2. Έλεγχος έκφρασης των Sigma2 υποδοχέων μέσω Western Blot.....	38
<b>8. Συζήτηση</b> .....	42
<b>9. Βιβλιογραφία</b> .....	45

## Περίληψη:

Οι sigma υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1976. Αρχικά είχαν χαρακτηριστεί ως υπότυπος των οπιοειδών, όμως πλέον, έχει επιβεβαιωθεί ότι αποτελούν μη-οπιοειδείς μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες τους sigma1 και του sigma2, με βάση την ικανότητα τους να δεσμεύουν κάποια φάρμακα. Οι sigma1 υποδοχείς παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για (1,3-di-o-tolyl-guanidine, DTG), haloperidol, (+)-benzomorphan και σχετίζονται με G πρωτεΐνες. Σε αντίθεση οι sigma2 υποδοχείς, δεν παρουσιάζουν κάποια συσχέτιση με (+)-benzomorphan και G πρωτεΐνες. [1]

Οι sigma υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην καρδιά, στο ήπαρ καθώς και στους νεφρούς. Ο sigma1 υποδοχέας εντοπίζεται κυρίως στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο(ER) και στην περιοχή επαφής του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER) και του Μιτοχονδρίου, που ονομάζεται MAM (mitochondrion-associated ER membrane). Ο sigma2 υποδοχέας εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα, στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο και στη κυτταρική μεμβράνη. [2]

Η πλειοψηφία των δημοσιεύσεων συσχετίζει τους sigma υποδοχείς με διάφορες διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος όμως, τα τελευταία χρόνια οι μελέτες δείχνουν την αυξημένη έκφραση τους, σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, σχετίζοντας τους περισσότερο με καρκίνο.

Στο πλαίσιο αυτό σκοπός της εργασίας, ήταν η μελέτη της έκφρασης των sigma υποδοχέων σε 18 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας του NCI-60 κυτταρικών σειρών. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει την καλλιέργεια των εξεταζόμενων κυτταρικών σειρών, την απομόνωση των πρωτεϊνών, ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot.

## Abstract:

Sigma receptors are proteins that were first identified in 1976. Initially researchers classified them as a subtype of opioid receptors, but now it has been shown that they are non-opioid proteins.

Two subtypes of sigma receptors have been identified, sigma1 and sigma2. Whereas sigma1 receptor -subtype exhibits high affinity for (1,3-di-o-tolyl-guanidine, DTG), haloperidol, and (+)-benzomorphans and is associated with G proteins, sigma2 show no stereoselectivity for (+)-benzomorphans and G proteins.

Sigma receptors are a membrane-bound proteins distributed in the central nervous system, heart, liver and kidney. The sigma1 receptors are located in the endoplasmic reticulum (ER) and in the Endoplasmic reticulum (ER)-mitochondrion interface, which called MAM (mitochondrion-associated ER membrane). The sigma2 are located in mitochondria, lysosomes, endoplasmic reticulum and plasma membrane.

The majority of publications suggests that Sigma receptors are associated with various disorders of the central nervous system, however, recent studies shown increased expression of sigma receptors in various cancer cell lines.

In this context the purpose of this study, was to shed some light on the expression of sigma receptors in 18 human cancer cell lines of NCI-60 panel. Methods used to fulfill this aim, were cell lines culture, proteins isolation, electrophoresis and Western Blot.

# 1.Καρκίνος:

Η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση κάθε κυττάρου, ρυθμίζονται προσεκτικά, ώστε να εξυπηρετούνται όλες οι ανάγκες του οργανισμού. Ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα κατάρρευσης αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών, οπότε και τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται σε όλο το σώμα παρεμποδίζοντας τελικά την λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων.

Όγκος: ονομάζεται οποιαδήποτε μάζα κυττάρων που σχηματίζεται από μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό. Σημαντικό ζήτημα είναι η διάκριση ανάμεσα στους καλοήθεις και κακοήθεις όγκους.

Καλοήθης όγκος: δεν κάνει μεταστάσεις, δηλαδή περιορίζεται στην αρχική θέση εμφάνισης, χωρίς να εισβάλλει άλλους φυσιολογικούς ιστούς ή να εξαπλώνεται σε άλλα σημεία του σώματος. Μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά.

Κακοήθης όγκος: αναφέρονται ως καρκίνος και είναι επικίνδυνος λόγω της ικανότητας του να προκαλεί μεταστάσεις, δηλαδή μπορεί να εισβάλλει σε άλλους ιστούς και εξαπλώνεται σε άλλα σημεία του σώματος μέσω είτε του κυκλοφορικού, είτε του λεμφικού συστήματος. Επίσης τα κύτταρα παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Ενώ μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά, η εξάπλωση του σε άλλες περιοχές του σώματος, τον καθιστά προβληματικό σε τοπικές θεραπείες, αλλά και στη χημειοθεραπεία ακτινοθεραπεία γενικότερα.

Οι περισσότεροι καρκίνοι/κακοήθεις όγκοι ταξινομούνται με βάση τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχονται, σε:

Καρκινώματα: είναι κακοήθεις όγκοι των επιθηλιακών κυττάρων και αποτελούν περίπου 90% των καρκίνων του ανθρώπου.

Σαρκώματα: είναι συμπαγείς όγκοι του συνδετικού ιστού των μυών, των οστών, των χονδρών και των ινδών ιστών. Εντοπίζεται σπάνια σε ανθρώπους.

Λευχαιμίες/Λεμφώματα: όγκοι που προέρχονται από κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος. Αποτελούν το 8% των κακοήθων όγκων.

Επίσης οι κακοήθεις όγκοι κατατάσσονται σύμφωνα με τα όργανα προέλευσης τους, για παράδειγμα καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα κλπ. [3]

## 1.1.Ανάπτυξη του καρκίνου:

Το κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου, είναι ότι όλα τα κύτταρα ενός όγκου προέρχονται από ένα αρχικό κύτταρο, που πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Δηλαδή, τα κύτταρα ενός όγκου αποτελούν ένα κυτταρικό κλώνο. Βέβαια, αυτό δεν σημαίνει ότι το αρχικό προγονικό κύτταρο από το οποίο προήλθε ο όγκος, απέκτησε εξ 'αρχής όλα τα χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου (αυξανόμενος πολλαπλασιασμός, επιβίωση κλπ). Η ανάπτυξη του καρκίνου σε κυτταρικό επίπεδο, είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων, που περιέχει την μεταλλαγή, τον πολλαπλασιασμό και επιλογή των κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, διείσδυσης, επιβίωσης και μετάστασης.

### Στάδια ανάπτυξης όγκου:

Αρχικά λαμβάνει χώρα η

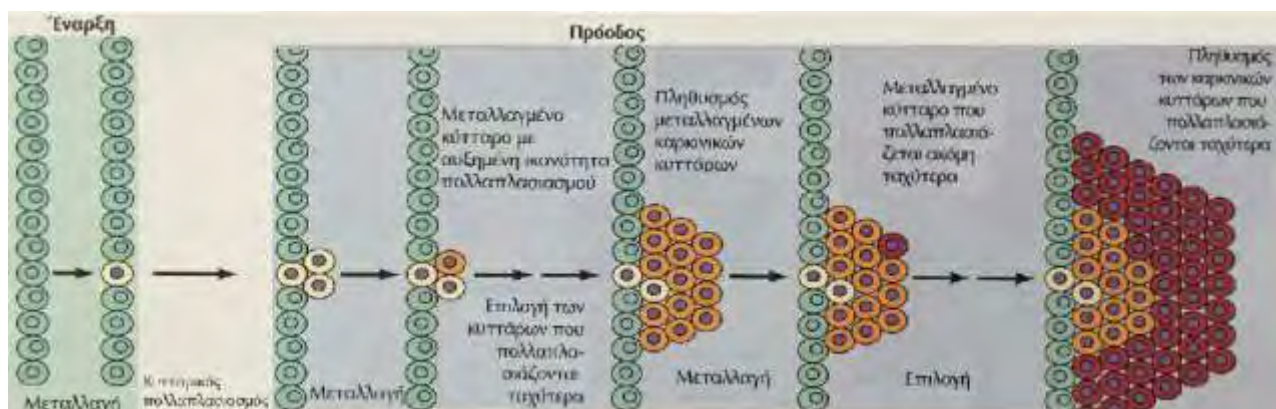
#### Έναρξη της ογκογένεσης (tumor initiation):

Αρχικά εμφανίζεται ένα μεταλλαγμένο κύτταρο, λόγω κάποιων τυχαίων γενετικών αλλαγών. Στη συνέχεια το μεταλλαγμένο κύτταρο αρχίζει να πολλαπλασιάζεται με μη φυσιολογικό ρυθμό. Ως αποτέλεσμα προκύπτει ένας αρχικός πληθυσμός ογκοκυττάρων που σχηματίζουν ένα κλώνο.

Έπειτα ακολουθεί η

#### Πρόοδος της ογκογένεσης (tumor progression):

Κατά την οποία συμβαίνουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις στα κύτταρα του κλώνου. Ένα από τα κύτταρα του κλώνου θα αποκτήσει ορισμένες μεταλλάξεις που του δίνουν συγκριτικό πλεονεκτήματα σε σχέση με τα άλλα, όπως ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και επιβίωσης. Με αποτέλεσμα οι απόγονοι αυτού του κυττάρου να κυριαρχούν μέσα σε έναν πληθυσμό ογκοκυττάρων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιλογή κλώνου. Αυτή η επιλογή συνεχίζεται κατά την διαδικασία ανάπτυξης του όγκου, ώστε ο όγκος να αναπτύσσεται πιο γρήγορα και να γίνεται ολοένα και πιο κακοήθεις.[3]



**Εικόνα 1.**

Στάδια ανάπτυξης ενός όγκου.[1]



## 1.2.Αιτίες του καρκίνου:

Μελέτες σε πειραματόζωα καθώς και επιδημιολογικές παρατηρήσεις της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου σε πληθυσμούς ανθρώπων, οδήγησαν στην ανακάλυψη των ουσιών που προκαλούν καρκίνο (καρκινογόνα). Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου είναι δυνατόν να επηρεαστεί από αρκετούς παράγοντες όπως:

### 1.Χημικά καρκινογόνα:

Τα χημικά καρκινογόνα περιλαμβάνουν τόσο φυσικές όσο και συνθετικές χημικές ενώσεις. Διακρίνονται δύο κατηγορίες χημικών καρκινογόνων

Άμεσα καρκινογόνα: που είναι χημικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA και δρουν ως μεταλλαξιογόνα προκαλώντας μεταλλάξεις. Σε αυτούς περιλαμβάνονται αλκυλιωτικοί παράγοντες.

Προκαρκινογόνα: είναι χημικές ενώσεις που αρχικά πρέπει να τροποποιηθούν μέσω του μεταβολισμού για να μετατραπούν σε ενεργά καρκινογόνα. Οι δραστικές ενώσεις που προκύπτουν μετά την τροποποίηση ονομάζονται τελικά καρκινογόνα, που αποκτούν πλέον την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το DNA και συνεπώς να προκαλούν τις μεταλλάξεις. Σε αυτά περιλαμβάνονται πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, συνθετικές χρωστικές ενώσεις αζώτου, φυσικοί μεταβολίτες και νιτροζαμίνες.

Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα είναι προκαρκινογόνα.[4]

### 2.Ακτινοβολία:

Η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει την δημιουργία μεταλλάξεων, διότι οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες του DNA απορροφούν έντονα το φως στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος. Το αποτέλεσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας, είναι ο σχηματισμός μη φυσιολογικών δεσμών ανάμεσα σε γειτονικές πυριμιδίνες που εντοπίζονται στον ίδιο κλώνο ή σε διαφορετικούς κλώνους της διπλής έλικας του DNA. Κυρίως επάγεται ο σχηματισμός δεσμού ανάμεσα σε γειτονικές θυμίνες, αποδίνοντας διμερή θυμίνης. Ως αποτέλεσμα παρεμποδίζονται κυτταρικοί μηχανισμοί όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή. [5]

### 3.Ιοί

Διάφορες κατηγορίες ιών είναι ικανές να προκαλέσουν την εμφάνιση του καρκίνου, οι ιοί αυτοί ονομάζονται ογκογόνοι ή ογκοϊοί. Οι ιοί την ηπατίτιδας Β και C αποτελούν τα κύρια αίτια εμφάνισης του καρκίνου του ήπατος. Οι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι ακόμη γνωστοί, πιθανόν οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου είτε μέσω πρόκλησης φλεγμονής, είτε μέσω αλληλεπίδρασης ιικών πρωτεϊνών με διάφορες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα η φλεγμονή επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στη συνέχεια την ανάπτυξη του καρκίνου [3]

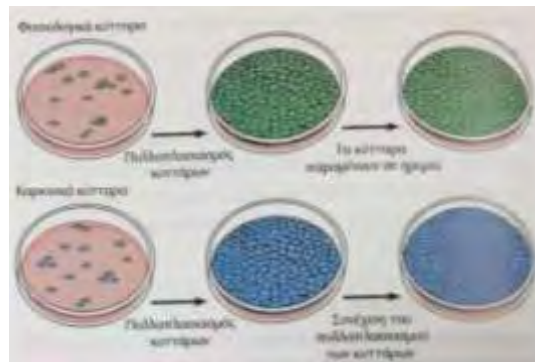
### 3.Ορμόνες

Ορισμένες ορμόνες μπορούν να δράσουν ως επαγωγείς όγκων, ένα παράδειγμα αποτελούν τα οιστρογόνα. Τα οιστρογόνα ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου, επομένως υψηλές συγκεντρώσεις των οιστρογόνων οδηγούν σε πιο έντονο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και κατ' επέκταση ενισχύουν τις πιθανότητες εμφάνισης του καρκίνου του ενδομητρίου στις γυναίκες. [3]

### 1.3. Διαφορές ανάμεσα στα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα:

1. Τα φυσιολογικά κύτταρα εμφανίζουν «αναστολή του πολλαπλασιασμού εξαρτώμενη από την πυκνότητα της καλλιέργειας», δηλαδή πολλαπλασιάζονται μέχρι να φτάσουν τη μέγιστη δυνατή πυκνότητα καλλιέργειας ( η οποία σε ένα βαθμό καθορίζεται και από την διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) και στην συνέχεια τα κύτταρα μεταπίπτουν στη φάση ηρεμίας- G0.[3]

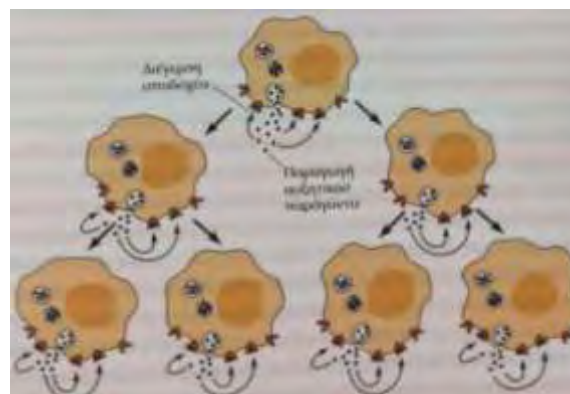
Σε αντίθεση ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, δεν εξαρτάται από τη πυκνότητα της καλλιέργειας καθώς αδυνατούν να ανταποκριθούν στα σήματα καταστολής πολλαπλασιασμού και συνεχίζουν να αναπτύσσονται στην καλλιέργεια, μιμώντας έτσι τον πολλαπλασιασμό *in vivo*. [3]



**Εικόνα 2.**

Αναστολή πολλαπλασιασμού εξαρτώμενη από την πυκνότητα της καλλιέργειας.[1]

2. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν μειωμένες απαιτήσεις εξωκυττάρων αυξητικών παραγόντων σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτή η μειωμένη απαίτηση για αυξητικούς παράγοντες προκύπτει από ανωμαλίες του ενδοκυτταρικού συστήματος σηματοδότησης, είτε από μη ελεγχόμενη ενεργότητα των υποδοχέων. Ορισμένες φορές τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα παράγουν αυξητικούς παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό τους, πυροδοτώντας έτσι μία συνεχή αυτοδιέγερση του πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός των ογκοκυττάρων να εξαρτάται λιγότερο από αυξητικούς παράγοντες που προέρχονται από εξωκυττάρους πηγές.[3]



**Εικόνα 3.**

Αυτοκρινής διέγερση κυτταρικού πολλαπλασιασμού.[1]

3. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης στα γειτονικά τους κύτταρα αλλά και στο υπόστρωμα. Αυτό επιφέρει μορφολογικές διαφορές, δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν πιο στρογγυλοποιημένη περιφέρεια από τα φυσιολογικά κύτταρα.[3]

4. Τα καρκινικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εισβολής σε νέους ιστούς. Δηλαδή, εκκρίνουν διάφορες πεπτιδάσες που πέπτουν τα συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος και επιτρέπουν την διείσδυση στους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς, επάγοντας έτσι τη δημιουργία των μεταστάσεων.[3]

5. Τα καρκινικά κύτταρα επάγουν την αγγειογένεση (σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων), μέσω έκκρισης αυξητικών παραγόντων. Για την ανάπτυξη του όγκου είναι απαραίτητη η δημιουργία νέων αγγείων, προκειμένου να προμηθεύονται τα ογκοκύτταρα με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά.[3]

## 1.4.Γονίδια:

Βασική αίτια του καρκίνου είναι η μεταλλαγή κρίσιμων ρυθμιστικών γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Δύο τύποι γενετικών αλλαγών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη όγκων:

### 1.Ενεργοποίηση ογκογονιδίων:

#### Πρώτο-ογκογονίδια:

Είναι φυσιολογικά κυτταρικά ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν στοιχεία σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση, ώστε η κυτταρική διαίρεση να πραγματοποιείται με ισορροπημένο τρόπο.

#### Ογκογονίδια:

Είναι είτε μεταλλαγμένες μορφές των ομόλογων τους πρώτο-ογκογονιδίων, είτε κωδικοποιούν το ίδιο γονιδιακό προϊόν αλλά σε μη φυσιολογικά επίπεδα. Προκαλούν μη φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ογκογένεση. [5]

Η μετατροπή των πρώτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια οφείλεται σε:

1. Σημειακές μεταλλάξεις
2. Ανωμαλίες στην δομή χρωμοσωμάτων (μετατόπιση)
3. Ελλείματα

#### Διαφορές πρώτο-ογκογονιδίων και ογκογονιδίων:

1. Τα ογκογονίδια εκφράζονται σε μεγαλύτερο επίπεδο από τα πρώτο-ογκογονίδια.
2. Τα ογκογονίδια μερικές φορές μεταγράφονται σε κυτταρικούς τύπους που υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα πρώτο-ογκογονίδια δεν εκφράζονται.
3. Τα ογκογονίδια μερικές φορές κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορές στη δομή και στη λειτουργία, σε σχέση με αυτές που κωδικοποιούνται από πρώτο-ογκογονίδια.

Τα προϊόντα των πρώτο-ογκογονιδίων και των ογκογονιδίων είναι οι ογκοπρωτεΐνες, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης τους ή η υψηλή ενεργότητα οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι ογκοπρωτεΐνες μπορούν να δρουν ως αυξητικοί παράγοντες, (όπως προαναφέρθηκε, τα καρκινικά κύτταρα παράγουν τους αυξητικούς

παράγοντες, στους οποίους ανταποκρίνονται) ως υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ή ως κινάσες. [3+4]

## 2.Καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων:

### Ογκοκατασταλτικά ογκογονίδια:

Είναι τα κυτταρικά γονίδια που υπό φυσιολογικές συνθήκες, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε πολλούς όγκους αυτά τα γονίδια απενεργοποιούνται, με αποτέλεσμα το κύτταρο να χάνει τον αρνητικό ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού τους, επιτρέποντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.[3]

Συνοψίζοντας, μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, είτε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είναι κρίσιμα γεγονότα στην έναρξη και εξέλιξη της ογκογένεσης.

## 1.5.Προσεγγίσεις στην Θεραπεία του καρκίνου:

### 1.Πρόληψη του καρκίνου

Αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου. Αφορά την ταυτοποίηση των ατόμων με κληρονομική προδιάθεση, η οποία μπορεί να οφείλεται στις μεταλλάξεις που αφορούν τόσο ογκογονίδια, όσο και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι δυνατόν να ανιχνευτούν με διάφορες μοριακές τεχνικές, επιτρέποντας την έγκαιρη ταυτοποίηση των ατόμων που παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.[3]

### 2.Έγκαιρη διάγνωση

Με την έγκαιρη διάγνωση των προκαρκινικών σταδίων ανάπτυξης του όγκου, αυξάνεται η πιθανότητα θεραπείας. Δηλαδή, πολλοί όγκοι εφόσον διαγνωστούν προτού εξαπλωθούν σε όλο το σώμα, είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με τοπικές θεραπείες, όπως ακτινοβολία ή εγχείρηση.[3]

### 3.Φάρμακα

Περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για την αντιμετώπιση του καρκίνου, είτε προκαλούν βλάβες στο DNA, είτε εμποδίζουν την αντιγραφή. Συνεπώς, λόγω μη ειδικής τους δράσης παρουσιάζουν αρνητική επίδραση τόσο στα καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναζήτηση νέων φαρμάκων που θα δρουν επιλεκτικά εναντίων των καρκινικών κυττάρων.

Νέες προσεγγίσεις στην θεραπεία του καρκίνου:

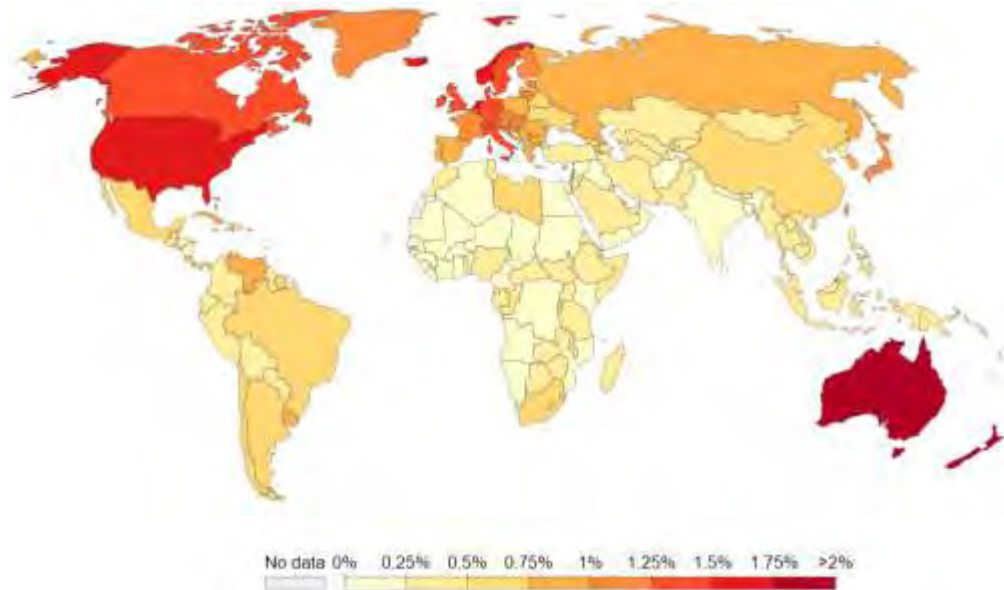
1.Φάρμακα που εμποδίζουν την αγγειογένεση, περιορίζοντας μ 'αυτό το τρόπο την παροχή του οξυγόνου και των θρεπτικών συστατικών στον όγκο, μειώνοντας έτσι την ανάπτυξη του.

2.Φάρμακα που στοχεύουν στα συγκεκριμένα ογκογονίδια, τα οποία κατά περίπτωση ενοχοποιούνται στην ανάπτυξη ενός τύπου καρκίνου. [3]

### 3.Ανοσοθεραπεία

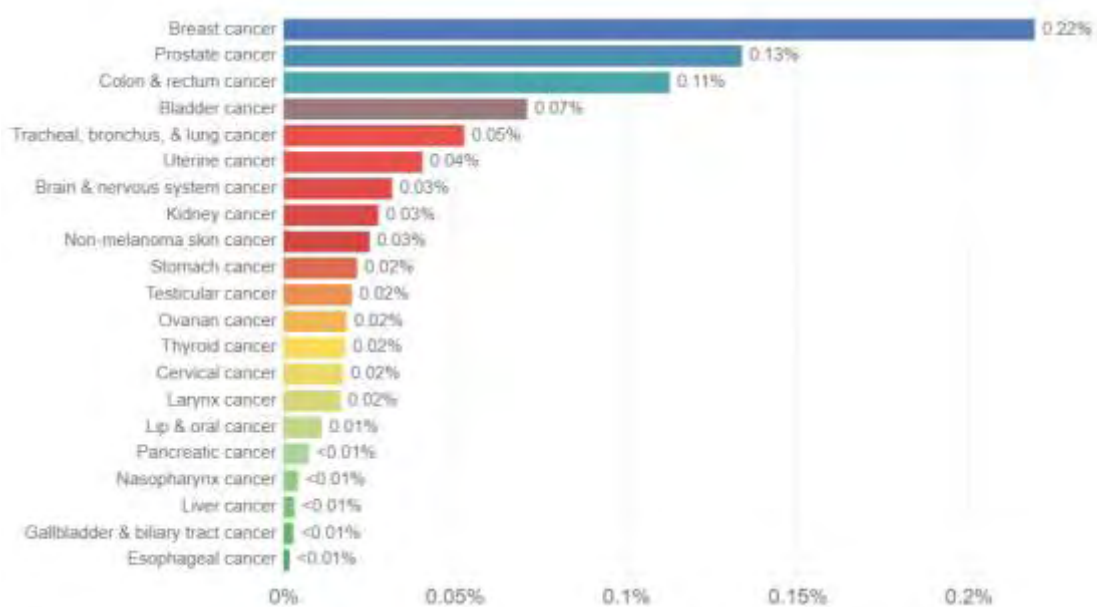
Η ανοσοθεραπεία είναι μια θεραπευτική μέθοδος που έχει ως στόχο, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό να αναγνωρίζει και να καταστρέφει αποτελεσματικά τα καρκινικά κύτταρα.

#### 1.6 Στατιστικά:



**Εικόνα 4.**

Συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σε διάφορες χώρες για το έτος 2016. (Όσο πιο έντονο είναι το χρώμα τόσο μεγαλύτερη η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου) [2]



**Εικόνα 5.**

Συχνότητα εμφάνισης διάφορων μορφών καρκίνου στην Ελλάδα για το έτος 2016. [2]

## 2.Sigma υποδοχείς:

Για πάνω από 40 χρόνια οι επιστήμονες προσπαθούν να κατανοήσουν τους λεγόμενους sigma υποδοχείς. Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου έχουν δημοσιευτεί πολλά άρθρα που εμπλέκουν τις πρωτεΐνες αυτές σε διάφορες διαταραχές και φυσιολογικές διαδικασίες. Παρόλα αυτά οι γνώσεις μας γι' αυτές είναι λίγες και σταδιακά αρχίζουμε να τις κατανοούμε.

Οι sigma υποδοχείς ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1976 από τον Martin και τους συνεργάτες του, ως μία από τις τρεις κατηγορίες των οπιοειδών mu, kappa και sigma. Η κατάταξη αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι ο ανταγωνιστής των οπιοειδών naltrexone, μπορεί να συνδεθεί σε όλους τους υποδοχείς των οπιοειδών, συμπεριλαμβανόμενου και των sigma υποδοχέων. Έτσι οι sigma υποδοχείς κατηγοριοποιήθηκαν στους υποδοχείς οπιοειδών.

Όμως, το 1982 οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το (+) ισομερές της βενζομορφάνης SKF10047 για να καθορίσουν την θέση σύνδεσης του με τους sigma υποδοχείς, με αποτέλεσμα να ταυτοποιήσουν ότι τελικά οι sigma υποδοχείς δεν ανήκουν στην κατηγορία των οπιοειδών, καθώς η θέση πρόσδεσης της βενζομορφάνης στους sigma υποδοχείς, είναι διαφορετική από αυτή των οπιοειδών. [6] Εκτός από αυτά, παρατηρήθηκε ότι ο sigma1 υποδοχέας παρουσιάζει υψηλή προτίμηση για (+) εναντιομέρη των βενζομορφάνων, σε αντίθεση με τα οπιοειδή που προτιμούν τα (-) εναντιομέρη. Το 1983 με μια σειρά πειραμάτων αποδείχτηκε ότι ο ανταγωνιστής των οπιοειδών naltrexone, αδυνατεί να αναστέλλει τη δράση των sigma υποδοχέων, οδηγώντας στην διαφοροποίηση τους από την κατηγορία των οπιοειδών.[7]

Στις αρχές του 1990, οι sigma υποδοχείς είχαν υποδιαιρεθεί σε δύο κατηγορίες τους sigma1 και τους sigma2. Η ταξινόμησή τους αυτή βασίζεται στην διαφορετική ικανότητα δέσμευσης κάποιων φαρμάκων, αλλά και στις ετερογενείς χημικές δομές.

Το 1996 κλωνοποιήθηκε ο sigma1 και η κρυσταλλική του δομή αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά το 2016. Παρατηρήθηκε ότι η δομή του δεν παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με κανένα άλλο υποδοχέα ενώ ο sigma2 κλωνοποιήθηκε πολύ πρόσφατα, το 2017 και η κρυσταλλική του δομή παραμένει ακόμα άγνωστη.[6]

Μελέτες σε ζωικά μοντέλα καθώς και μελέτες in vitro δείχνουν τη στενή σύνδεση των sigma υποδοχέων με τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τη μνήμη, τη μάθηση, τον πόνο, το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και με καρκίνο. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι sigma υποδοχείς εμπλέκονται στις πιο πάνω διεργασίες παραμένει άγνωστος.

Το γεγονός ότι πολλές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα των sigma υποδοχέων, τους έφερε στο επίκεντρο για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

## 2.1.Sigma1:

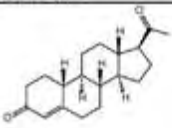
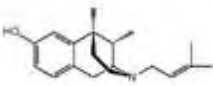
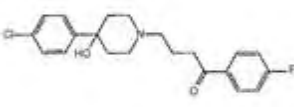
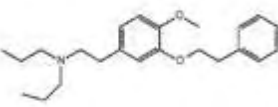
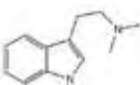
Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον sigma1 (SIGMAR1), εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9p13.3), αποτελείται από 7kbp και εμπεριέχει 4 εξόνια και 3 ιντρόνια. Το πολυπεπτίδιο περιέχει 223 αμινοξέα και το μοριακό του βάρος αντιστοιχεί στα ~25.3 kilodaltons(kDa). [8]

Μεταξύ διαφόρων ειδών οι sigma1 υποδοχείς παρουσιάζουν αυξημένη ομοιότητα (>93%), ταυτόχρονα όμως, δεν παρουσιάζουν ομολογία με καμία άλλη πρωτεΐνη των θηλαστικών. [8]

Η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον sigma1 το 1996, αποκάλυψε ότι δεν μοιάζει με τους κλασσικούς υποδοχείς, καθώς η αλληλουχία του δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με καμία άλλη πρωτεΐνη του ανθρώπινου γονιδιώματος. Όμως, βρέθηκε ότι έχει 30% ομολογία με τη ζυμομυκητική στερόλη C8-C7 Erg2p.[8]

Μέχρι τώρα, δεν έχουν βρεθεί οι ενδογενείς προσδέτες των sigma1, ωστόσο το 1998, νευροστεροειδή όπως η προγεστερόνη, είχε προταθεί ως ενδογενής προσδέτης, ενώ το 2009 είχε προταθεί η N,N-dimethyltryptamine (N,N-DMT). Δεξιόστροφες βενζομορφάνες όπως (+)pentazocine και (+)Nallylnormetazocine χαρακτηρίζονται ως αγωνιστές του sigma1 και παρουσιάζουν αυξημένη συγγένεια. Άλλοι προσδέτες όπως haloperidol και 4-methoxy-3-N,N dipropylbenzeneethanamine (NE-100) χαρακτηρίζονται ως ανταγωνιστές των sigma1 και επίσης παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα πρόσδεσης σε αυτούς. Ψυχοδιεγερτικά και αντικαταθλιπτικά φάρμακα παρουσιάζουν μέτρια έως υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τους sigma1 υποδοχείς. [8]

Πίνακας 1. Προσδέτες των sigma1 υποδοχέων [1]

Class	Compounds	Affinity ( $\mu\text{M}$ )	Structure	Agonist/Antagonist
Steroids	Progesterone	0.024 ( $K_i$ )		Antagonist
Opioids	(+)Pentazocine	0.0046 ( $K_i$ )		Agonist
Antipsychotics	Haloperidol	0.0031 ( $K_i$ )		Antagonist
Other Synthetic Compounds	NE-100	0.004 (IC50)		Antagonist
Psychostimulants	DMT	14.7 ( $K_i$ )		Agonist

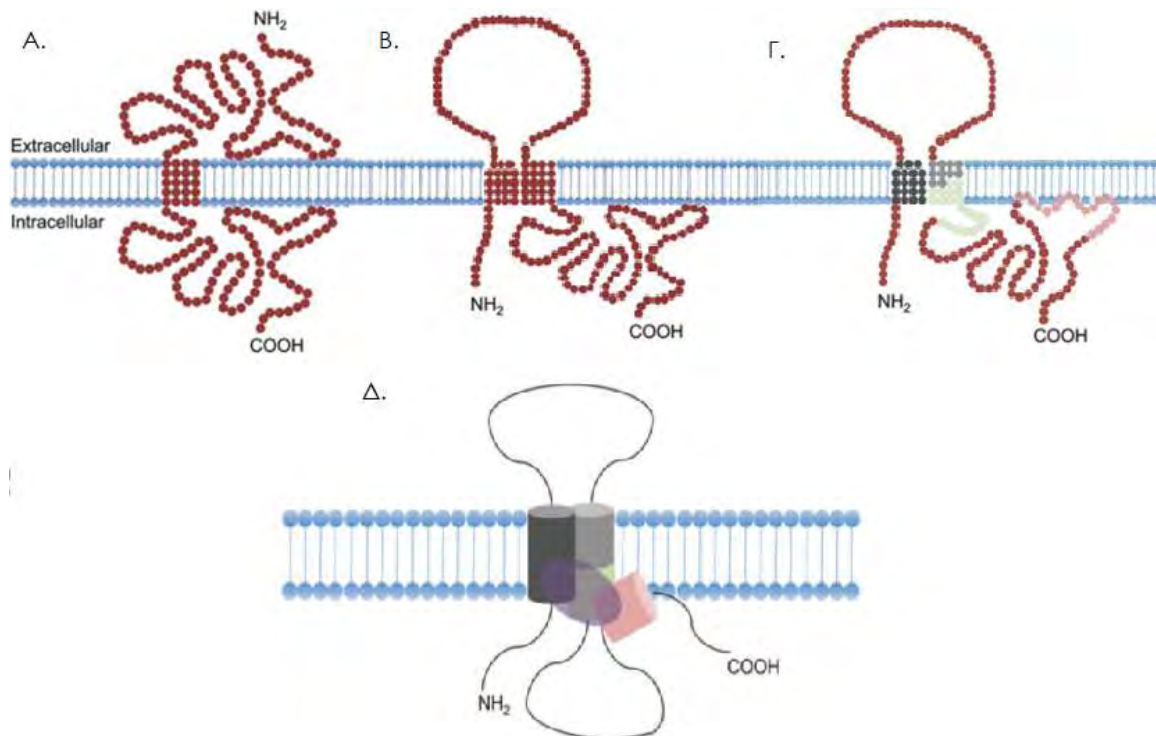
### 2.1.1 Δομή:

Οι μελέτες της δομής του  $\sigma$ 1 υποδοχέα βασίστηκαν στην ανάλυση υδροφοβικότητας.

Αρχικά έδειξαν ότι ο υποδοχέας χαρακτηρίζεται από μία διαμεμβρανική περιοχή, όπως φαίνεται στην εικόνα 6Α, με το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο να εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική περιοχή. Όμως, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν δύο διαμεμβρανικές (υδρόφοβες) περιοχές που ονομάστηκαν TM I και TM II όπως φαίνεται στην εικόνα 6Β.

Τελικά το 2007, αποκαλύφθηκαν δύο ακόμη υδρόφοβες περιοχές που ονομάστηκαν περιοχή δέσμευσης στεροειδών I και II (steroid binding domain like I και II ή SBDL I and II). Η ονομασία αυτή οφείλεται στην ομολογία τους με την στερόλη του ζυμομύκητα. Η περιοχή SBDL I φαίνεται να αλληλεπιδρά με την περιοχή TM II, ενώ η περιοχή SBDL II φαίνεται να εντοπίζεται πλευρικά της διαμεμβρανικής περιοχής και όχι εσωτερικά της μεμβράνης αλλά κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Όπου, η TM I και η TM II περιοχές είναι σκούρο και ανοικτό γκρι αντίστοιχα, ενώ η SIDLE I και η SIDLE II περιοχές είναι ανοικτό πράσινο και ανοικτό ροζ αντίστοιχα (εικόνα 6Γ).

Μια σειρά πειραμάτων έδειξε ότι οι περιοχές TIM, SBDL I και SBDL II αποτελούν την θέση πρόσδεσης για διάφορους προσδέστες. (εικόνα 6Δ: Θέση πρόσδεσης με σκούρο μωβ). [8]



**Εικόνα 6.**  
Προτεινόμενες δομές του  $\sigma$ 1 υποδοχέα. [3]



## 2.1.2 Ισομορφές:

Μέχρι στιγμής είναι γνωστό ότι υπάρχουν πέντε ισομορφές του sigma1 υποδοχέα, που οφείλονται σε εναλλακτικό μάτισμα. [2]

**Πίνακας 2.** Ισομορφές των sigma1 υποδοχέων [2]

Ισομορφές	Χαρακτηριστικά	Μήκος(αα)	Μοριακό βάρος(kDa)
<b>Ισομορφή1(Q99720-1)</b>	Η ισομορφή αυτή, επιλέχθηκε ως «βασική ισομορφή»	233	25,128
<b>Ισομορφή2 (Q99720-2)</b>	Απουσιάζει το τμήμα 31-50	203	22,803
<b>Ισομορφή3 (Q99720-3)</b>	Απουσιάζει το τμήμα 118-148	192	21,483
<b>Ισομορφή4 (Q99720-4)</b>	Αλλαγή αμινοξέων στις θέσεις 103-106: YVLL → ALLG Απουσιάζει το τμήμα 107-223	106	11,992
<b>Ισομορφή5 (Q99720-5)</b>	Απουσιάζουν τα τμήματα 31-52 και 63-76.	187	21,013

Κάθε ισομορφή παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια στους διάφορους προσδέτες.

## 2.1.3 Ρόλος:

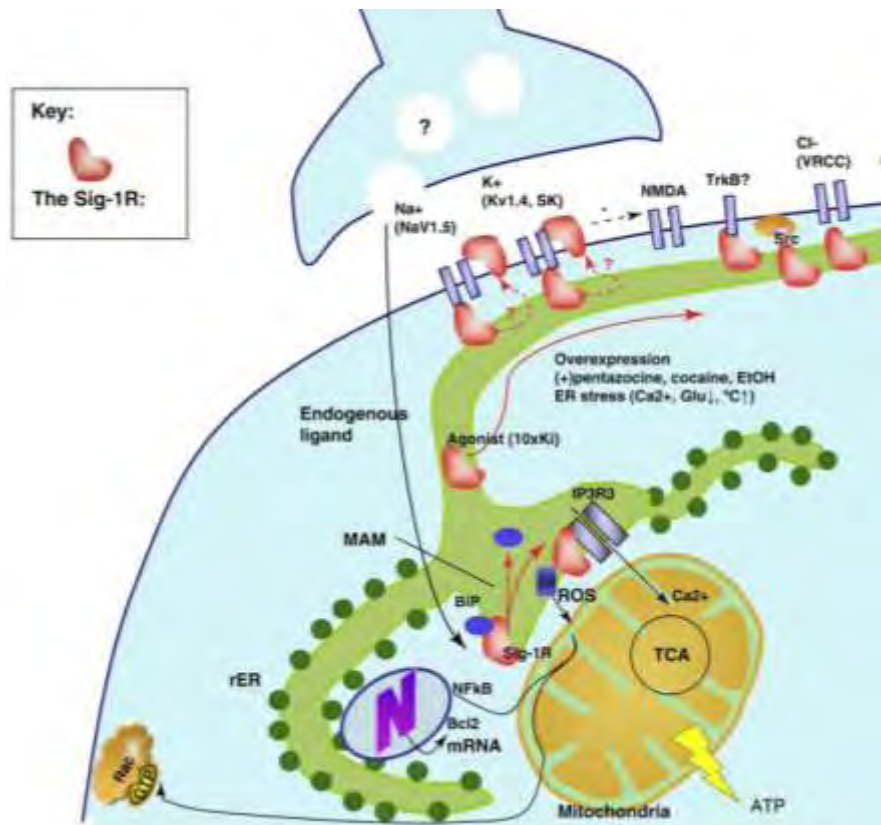
Όπως φαίνεται και στην εικόνα7 οι sigma1 υποδοχείς εντοπίζονται στην περιοχή επαφής του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER) και του Μιτοχονδρίου, που ονομάζεται MAM (mitochondrion-associated ER membrane) όπου εκεί ρυθμίζει την σηματοδότηση ER-μιτοχονδρίου και ER-πυρήνα. [9]

Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι οι sigma1 υποδοχείς μπορούν να μετατοπίζονται στην μεμβράνη του ER κάτω από ορισμένες συνθήκες, όπως η χορήγηση κάποιας φαρμακευτικής ουσίας ή σε καταστάσεις κυτταρικό στρες. Για παράδειγμα, η κατεργασία της κυτταρικής σειράς NG-108 με κοκαΐνη, προκαλεί μετατόπιση των sigma1 υποδοχέων από το ER στο πυρήνα και στον εξωκυττάριο χώρο. Η διέγερση των sigma1 υποδοχέων με παράγοντες που προκαλούν stress, όπως έλλειψη γλυκόζης ή ενδοπλασματικού ασβεστίου, επίσης προκαλεί την μετατόπιση των υποδοχέων από τη MAM. Η υπερέκφραση των sigma1 υποδοχέων, οδηγεί στην μετατόπιση τους, από την περιοχή MAM στην πλασματική μεμβράνη, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης του (+)pentazocine, οδηγεί στην αποδέσμευση των sigma1 υποδοχέων από μια πρωτεΐνη συνοδό του ER, την BiP. Παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιούνται και ρυθμίζονται οι παραπάνω διαδικασίες παραμένει άγνωστος.[9]

Στην περιοχή MAM οι sigma1 υποδοχείς μπορούν να συνδεθούν με τους αγωνιστές τους και να διαχωριστούν από την πρωτεΐνη συνοδό BiP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι sigma1 να ενισχύουν την δράση των IP3R και συγκεκριμένα την μεταφορά του ασβεστίου από το ER στο μιτοχόνδριο, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή του ATP μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (tricarboxylic acid cycle) στο μιτοχόνδριο.[9]

Η διέγερση των sigma1 υποδοχέων μέσω αυξημένης συγκέντρωσης αγωνιστών ή μέσω παραγόντων που προκαλούν stress, οδηγεί στην μετατόπιση των υποδοχέων από την περιοχή MAM προς πλασματική μεμβράνη. Εκεί οι υποδοχείς συνδέονται και αλληλεπιδρούν με διάφορα κανάλια ιόντων (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NMDA), με υποδοχείς (TKB, GPCRs) ή κινάσες.[9]

Οι sigma1 υποδοχείς μπορούν να επάγουν την μείωση των ελεύθερων ριζών (ROS) και αυτό συμβαίνει μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου Bcl2 (μπλοκάρει την απόπτωση και οδηγεί στην επιβίωση) στο πυρήνα, με αποτέλεσμα την προστασία του κυττάρου από την απόπτωση, ενώ ο δεύτερος παρεμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο, το οποίο οδηγεί σε απόπτωση (ενεργοποίηση κασπασών).[9]

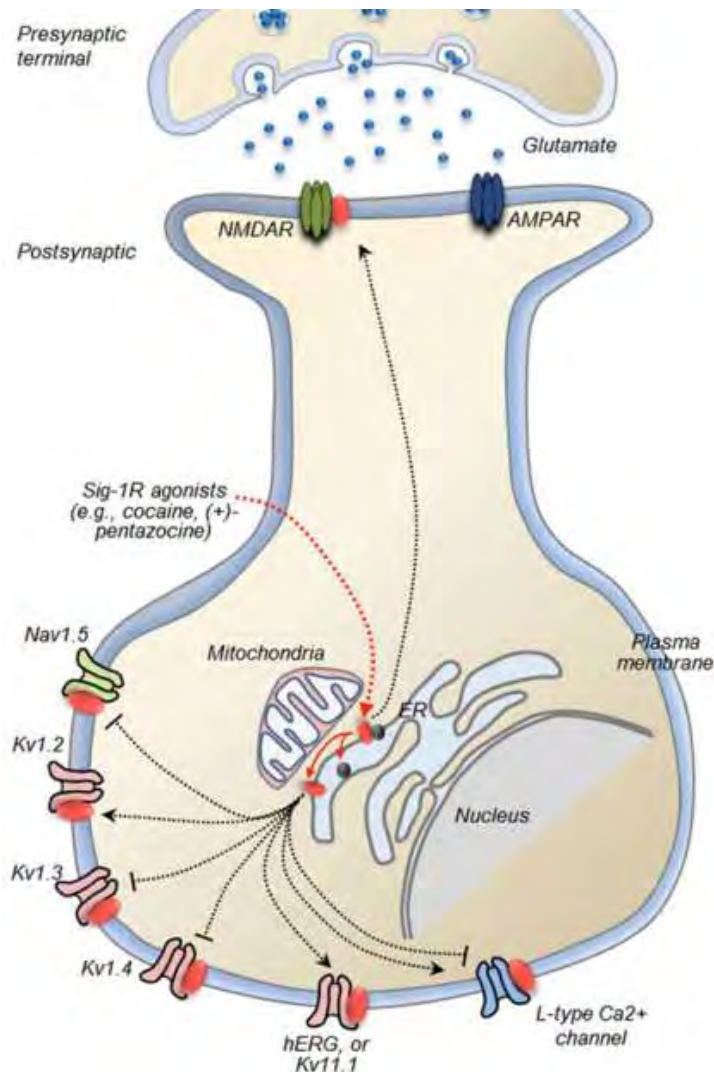


**Εικόνα 7.**  
Πολλαπλοί ρόλοι του sigma1.[4]

Το 2017 δημοσιεύθηκε ένα άρθρο, στο οποίο αναφέρονταν ο ρόλος των  $\sigma_1$  υποδοχέων στα κύτταρα του νευρικού συστήματος, όπου:

Οι  $\sigma_1$  υποδοχείς ρυθμίζουν τα τασσο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων (VIGCs), στα οποία η ροή των ιόντων εξαρτάται από αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης. Στα VIGCs ανήκουν τα κανάλια  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , και  $\text{Ca}^{2+}$ , όπου οι  $\sigma_1$  υποδοχείς μπορούν να αναστέλλουν, αλλά και να επάγουν την δράση των καναλιών  $\text{Ca}^+$ . Επίσης, ο  $\sigma_1$  υποδοχέας οδηγεί σε αναστολή των καναλιών  $\text{Kv} 1.3/\text{Kv}1.4/ \text{Nav}1.5$ , και σε ενεργοποίηση των καναλιών  $\text{Kv} 1.2$ .

Εκτός από αυτά οι  $\sigma_1$  υποδοχείς, ρυθμίζουν τα προσδετο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων (LIGCs), στα οποία η σύνδεση ενός συγκεκριμένου προσδέτη, οδηγεί στο άνοιγμα του καναλιού (κανάλια των οποίων η πύλη ελέγχεται από προσδέτες ονομάζονται υποδοχείς). Στα LIGCs ανήκουν οι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος όπως NMDA και AMPA. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι  $\sigma_1$  υποδοχείς ρυθμίζουν αυτά τα κανάλια είναι ακόμα άγνωστος, αλλά πιθανότατα αυτό συμβαίνει μέσω σύνδεσης και αλληλεπίδρασης του  $\sigma_1$  με τον υποδοχέα NMDA και τον AMPA. [10+11]



Εικόνα 8.

Ρόλοι του  $\sigma_1$  στο νευρικό κύτταρο. [5]

## 2.2.Sigma2:

Ο υποδοχέας sigma2 έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον μας, διότι εμπλέκεται σε διαφορές νευρολογικές ασθένειες όπως η σχιζοφρένεια, το Αλτςχάιμερ καθώς και σε καρκίνο. Παρόλα αυτά οι γνώσεις μας σχετικά μ' αυτή τη πρωτεΐνη είναι ελάχιστες, ενώ το γονίδιο καθώς και η κρυσταλλική του δομή παραμένουν άγνωστες. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 18-25kDa. Μελέτες με χρήση προσδετών δείχνουν ότι οι υποδοχείς sigma2 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε μερικές καρκινικές σειρές.

Οι sigma2 υποδοχείς παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για di-o-tolylguanidine (DTG) και haloperidol, και σε αντίθεση με τους sigma1 υποδοχείς παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια με τις (+) βενζομορφάνες. [12]

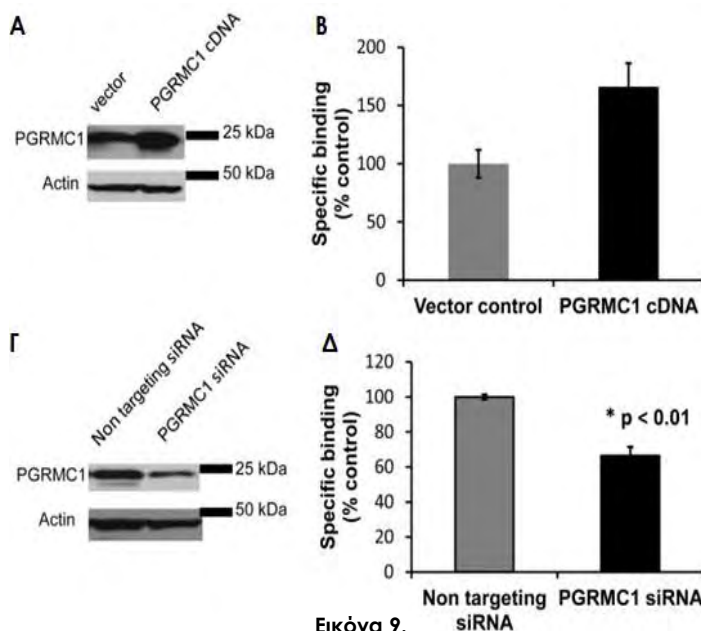
### 2.2.1 PGRMC1 ως Sigma2:

Το 2011 ο sigma2 υποδοχέας ταυτοποιήθηκε ως PGRMC1. Για την αιτιολόγηση αυτής της υπόθεσης, η ερευνητική ομάδα είχε σχεδιάσει ειδικούς προσδέτες για sigma2 υποδοχείς, όπως  $[^3\text{H}]\text{RHM-1}$ ,  $[^{125}\text{I}]\text{RHM-4}$ , και SW120. [13]

Με την υπερέκφραση ή με knockdown του PGRMC1 μετρήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης των ειδικά σχεδιασμένων προσδετών του sigma2.

Η υπερέκφραση του PGRMC1 στα κύτταρα HeLa πραγματοποιήθηκε μέσω μετασχηματισμού cDNA PGRMC1. Αυτό οδήγησε στην αύξηση παραγωγής του PGRMC1, το οποίο επαληθεύτηκε μέσω τεχνικής Western Blot (εικ9Α) και τελικά παρατηρήθηκε κατά 60% αυξημένη πρόσδεση του προσδέτη  $[^{125}\text{I}]\text{RHM-4}$  σε σχέση με το κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί με φορέα control (εικ9Β). [13]

Το knockdown του PGRMC1 μέσω siRNA στα κύτταρα HeLa, οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή του, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της Western Blot (εικ9Γ). Η μειωμένη έκφραση του PGRMC1 είχε ως συνέπεια τη μειωμένη πρόσδεση του προσδέτη  $[^{125}\text{I}]\text{RHM-4}$  (εικ9Δ). Η ίδια πειραματική διαδικασία με τη χρήση του προσδέτη SW120 πραγματοποιήθηκε και στην κυτταρική σειρά HEK 293T, οδηγώντας στα ίδια αποτελέσματα. [13]



Εικόνα 9.

Αποτελέσματα υπερέκφρασης και knockdown του PGRMC1. [6]

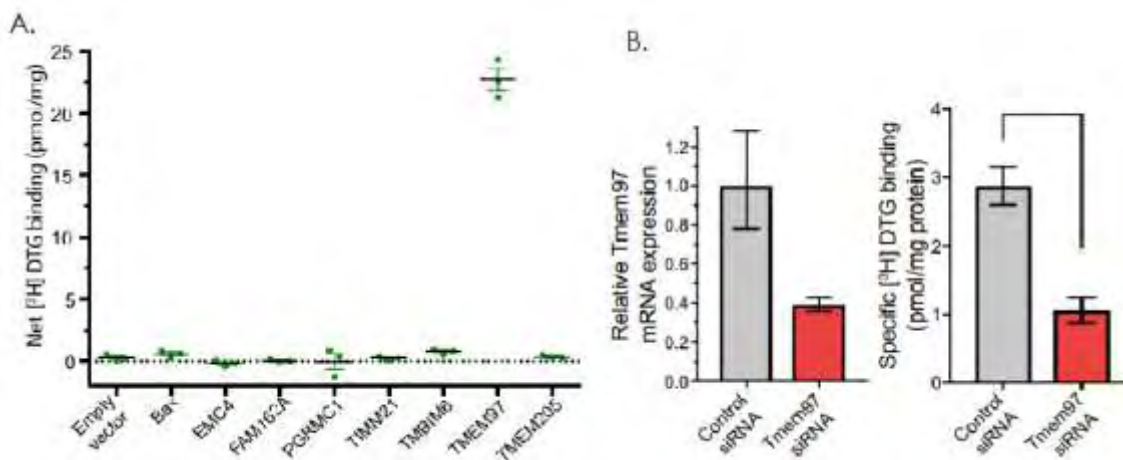
## 2.2.2 TMEM97 ως Sigma2:

Το 2017 μία ανεξάρτητη ομάδα ερευνητών προσδιόρισε ότι ο υποδοχέας sigma2 δεν είναι ο PGRMC1, αλλά ο TMEM97 (γνωστός και ως MAC30) καθώς, η υπερέκφραση του PGRMC1 δεν οδηγεί σε σημαντική αύξηση σύνδεσης των προσδέτων του sigma2. Επίσης το knockdown με siRNA ή το knockout με σύστημα CRISPR- Cas9 του PGRMC1 δεν οδήγησε σε σημαντική μείωση της πρόσδεσης. Με βάση αυτά, η ομάδα υποστήριξε ότι ο υποδοχέας sigma2 και ο PGRMC1 αποτελούν δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια. [12]

Για την ταυτοποίηση του υποδοχέα sigma2, αρχικά απομονώθηκαν αρκετές πρωτεΐνες από το ήπαρ του μوشαριού και από αυτές τις πρωτεΐνες επιλέχθηκαν οι επτά (μέσα στις οποίες ήταν ο PGRMC1 και ο TMEM97). Στη συνέχεια εξετάστηκαν για την ικανότητα τους, να δεσμεύουν τον προσδέτη του sigma2 τον  $[^3\text{H}]$  DTG. Τα αποτελέσματα από την μελέτη των υποψήφιων πρωτεϊνών απεικονίζονται στην εικόνα 10, όπου παρατηρείται σημαντικά αυξημένη ικανότητα δέσμευσης του  $[^3\text{H}]$  DTG από τον TMEM97, σε σχέση με τον PGRMC1 (εικ10A).[12]

Εκτός από αυτό εξετάστηκε κατά πόσο αναστολή της έκφρασης του TMEM97, επηρεάζει την πρόσδεση του  $[^3\text{H}]$  DTG.

Η μείωση της έκφρασης του TMEM97, στη κυτταρική σειρά PC-12 πραγματοποιήθηκε μέσω siRNA και είχε ως αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων του TMEM97 κατά 60%(εικ10B). Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι με την μείωση των επιπέδων του TMEM97 μειώνεται και η πρόσδεση του  $[^3\text{H}]$  DTG (εικ10Γ). [12]



**Εικόνα 10.**

Αποτελέσματα πειραμάτων για ταυτοποίηση του sigma2 ως TMEM97.[6]

Εκτός από αυτά, μελέτες έδειξαν ότι οι sigma2 υποδοχείς έχουν αυξημένη έκφραση σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Ομοίως και ο TMEM97 φαίνεται να υπερεκφράζεται σε καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών, του πνεύμονα και του εντέρου. Επιπλέον, η RNA σίγηση του TMEM97 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων και αντίστοιχα η χρήση των προσδέτων του sigma2 οδηγεί στη μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Όλα τα δεδομένα αυτά, υποστηρίζουν ότι ο TMEM97 αποτελεί τον sigma2 υποδοχέα.[12]

### 2.2.3 Ισομορφές του PGRMC1 και του TMEM97 :

**Πίνακας3.** Ισομορφές του TMEM97 [3]

Ισομορφές	Χαρακτηριστικά	Μήκος(αα)	Μοριακό βάρος(kDa)
<b>Ισομορφή1(Q5BJF2-1)</b>	«βασική ισομορφή»	176	20,848
<b>Ισομορφή2 (Q86XC5)</b>	Πιθανή ισομορφή.	69	8,219
<b>Ισομορφή3 (J3KT68)</b>	Πιθανή ισομορφή.	92	10,976
<b>Ισομορφή4 (J3KTD1)</b>	Πιθανή ισομορφή.	118	13.210

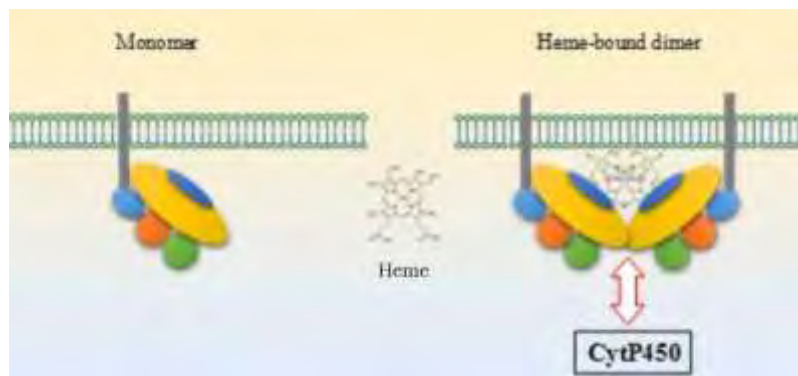
Ο TMEM97(Transmembrane protein 97) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στην κυτταρική μεμβράνη και στον πυρήνα και ρυθμίζει τον μεταφορέα χοληστερόλης NPC1 (Niemann-Pick disease protein type C1).[12]

**Πίνακας4.** Ισομορφές του PGRMC1 [4]

Ισομορφές	Χαρακτηριστικά	Μήκος(αα)	Μοριακό βάρος(kDa)
<b>Ισομορφή1(O00264-1)</b>	«βασική ισομορφή»	195	21,671
<b>Ισομορφή2 (O00264-2)</b>	Το τμήμα 110-162 παρουσιάζει διαφορετική αλληλουχία.	143	15,879

Ο PGRMC1(progesterone receptor membrane component 1) εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στους νεφρούς και στο ήπαρ ενώ εκφράζεται σε χαμηλό βαθμό στο πάγκρεας, στη καρδιά, στον εγκέφαλο και στους πνεύμονες. Εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο.

Το καρβοξυτελικό άκρο του PGRMC1 περιέχει μοτίβο κυτοχρώματος b5, μέσω του οποίου αλληλεπιδρά με την αίμη. Η σύνδεση του PGRMC1 με την αίμη, οδηγεί στον διμερισμό του υποδοχέα και έτσι είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (εικ11). [19+20]



**Εικόνα 11.**  
Διμερισμός του PGRMC1.[7]

Ο PGRMC1 παρουσιάζει υψηλή έκφραση σε διάφορους καρκινικούς τύπους, επομένως αποτελεί σημαντικό βιοδείκτη και θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για αντικαρκινική θεραπεία. [13]

### 3. Sigma υποδοχείς και καρκίνος:

Διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί υπέδειξαν αυξημένη έκφραση των sigma1 και sigma2 υποδοχέων σε διάφορους καρκινικούς τύπους όπως, ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του νεφρού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο καρκίνος του μαστού, το μελάνωμα και ο καρκίνος του προστάτη. [14]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι sigma2 υποδοχείς, καθώς έχουν περίπου 10πλάσια έκφραση σε πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με 'αυτά που βρίσκονται σε ηρεμία. Οι προσδέτες του, μπορούν να οδηγούν σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα μέσω αποπτωτικών και μη αποπτωτικών μηχανισμών. [14]

Επίσης παρατηρήθηκε, ότι οι sigma2 υποδοχείς έχουν σημαντική υπερέκφραση στους 12 από τους 15 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (περίπου κατά 6 φορές). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μελέτες, όπου έγινε προσθήκη των αναστολέων του sigma2 ή η σίγηση του sigma2 με siRNA στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του πνεύμονα, όπως A549 και NCI-H226. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς NCI-H226 οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας. Το πλάσμα των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα επίσης εμπεριέχει αυξημένα επίπεδα του sigma2 σε σχέση με το πλάσμα υγιών άτομα (περίπου κατά 7 φορές)[14]

Επομένως, οι sigma2 υποδοχείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες αλλά και ως θεραπευτικοί στόχοι για τον καρκίνο του πνεύμονα.

Προκειμένου να βρεθεί ο μηχανισμός δράσης των sigma2 υποδοχέων, πραγματοποιήθηκε η αποσιώπηση του, στην καρκινική κυτταρική σειρά A549. Παρατηρήθηκε αναστολή έκφρασης του neutrophil gelatinase-associated lipocalin/lipocalin-2 (NGAL) και μείωση ενεργότητας του matrix metalloproteinase-9 (MMP9).[14]

Το NGAL είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που προσδένεται στο MMP9 και το προστατεύει από την αποικοδόμηση. Η δράση του MMP9 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου. Επώαση του υποδοχέα του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (EGFR), της πρωτεϊνικής κινάση B (Akt) και της κινάση (ERK), με φυσιολογικά κύτταρα και κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση του sigma2, έδειξε ότι ο sigma2 υποδοχέας αυξάνει τα επίπεδα του NGAL μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και του EGFR.(εικ12)[14]

Σημειώθηκε επίσης ότι η αναστολή έκφρασης του sigma2 υποδοχέα μειώνει τα επίπεδα του NGAL πιο αποτελεσματικά, σε σχέση με την αναστολή έκφρασης του EGFR.[14]



Εικόνα 12.

Μονοπάτι δράσης του sigma2 για την επιβίωση του όγκου.[8]

Παρόλο που οι περισσότερες δημοσιεύσεις που αφορούν τους sigma1 υποδοχείς, περιγράφουν την σχέση τους με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξημένη σύνδεση τους με τον καρκίνο. Η σχέση των sigma1 υποδοχέων και του καρκίνου βασίζεται:

1. Στα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης sigma1 και του γονιδίου SIGMAR1 σε όγκους και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

2. Στη χρήση των αναστολέων (ανταγωνιστών) του sigma1 που οδηγούν σε αναστολή ανάπτυξης των καρκινικών κυτταρικών και των όγκων.

Ωστόσο ο ρόλος των sigma1 υποδοχέων στο καρκίνο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος,

Από τότε που βρέθηκε ότι οι sigma υποδοχείς ( και κυρίως ο sigma2) υπερεκφράζονται σε πολλά είδη καρκίνου, τράβηξαν το ενδιαφέρον όχι μόνο ως στόχοι για διάγνωση του καρκίνου, αλλά και ως στόχοι για αντικαρκινική θεραπεία. [14]

## **4. Αγωνιστές/ Ανταγωνιστές των sigma υποδοχέων, ως δυνητικά φάρμακα:**

Αγωνιστής: ουσία που δεσμεύεται στον υποδοχέα, μιμείται τον φυσιολογικό προσδέτη και προκαλεί βιολογικό αποτέλεσμα.

Ανταγωνιστής: ουσία που δεσμεύεται στον υποδοχέα και προκαλεί αναστολή της δράσης, που θα προκαλούσε ο προσδέτης/αγωνιστής. Χωρίζονται σε:

Συναγωνιστικούς: δεσμεύονται στην ίδια θέση με τον προσδέτη/αγωνιστή.

Μη συναγωνιστικούς: δεσμεύονται σε διαφορετική θέση με τον προσδέτη/αγωνιστή

Όπως είχε σημειωθεί παραπάνω, οι sigma υποδοχείς παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση σε ποικίλες κυτταρικές σειρές, επομένως η χρήση διάφορων αγωνιστών/ανταγωνιστών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινική αγωγή.

Οι προσδέτες του sigma υποδοχέων ρυθμίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Οι αγωνιστές του sigma2 επάγουν την απόπτωση, ενώ οι ανταγωνιστές την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Ο βαθμός με τον οποίο αναστέλλεται η κυτταρική ανάπτυξη ή η κυτταρική επιβίωση εξαρτάται από τον βαθμό συγγένειας του προσδέτη με τον υποδοχέα, από την συγκέντρωσή του προσδέτη και από το χρόνο επώασης του προσδέτη.

Σημαντικό στοιχείο που καθιστά τους sigma υποδοχείς ως πιθανή μελλοντική αντικαρκινική θεραπεία, είναι ότι ο συνδυασμός τους με τα ήδη υπάρχοντα αντικαρκινικά φάρμακα, αυξάνει τη φαρμακολογική δράση των δεύτερων και οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά απόπτωσης σε in vivo αλλά και σε in vitro πειράματα. [15]



## 5. Σκοπός

Ο σκοπός της εργασίας, αποτελεί τη μελέτη της έκφρασης των σίγμα υποδοχέων σε 18 εγκαθυδριμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της λίστας NCI-60.

## 6. Πειραματική Διαδικασία

### 6.1. Καλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εγκαθυδριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές:

**Πίνακας 5.** Καρκινικές κυτταρικές σειρές υπό μελέτη [5]

<b>Κυτταρική Σειρά</b>	<b>Καρκινικός Τύπος</b>	<b>Χρόνος Διπλασιασμού (h)</b>
<b>T47D</b>	Breast	45.5
<b>MCF7</b>	Breast	25.4
<b>MB231</b>	Breast	41.9
<b>MB435</b>	Melanoma	25.8
<b>SKMEL28</b>	Melanoma	35.1
<b>NCI ADR-RES</b>	Ovarian	34
<b>OVCAR5</b>	Ovarian	48.8
<b>OVCAR3</b>	Ovarian	34.7
<b>CAKI1</b>	Renal	39
<b>SN12C</b>	Renal	29.5
<b>HCT116</b>	Colon	17.4
<b>HCT15</b>	Colon	20.6
<b>DU145</b>	Prostate	32.2
<b>PC3</b>	Prostate	27.1
<b>H460</b>	Non-Small Cell Lung	23
<b>H23</b>	Non-Small Cell Lung	38
<b>A549</b>	Non-Small Cell Lung	22.9
<b>SF295</b>	Central Nervous System	29.5
<b>Hela</b>	Cervical cancer	24.6

Οι πρώτες 18 καρκινικές κυτταρικές σειρές ανήκουν στην λίστα του NCI-60, ενώ η κυτταρική σειρά Hela χρησιμοποιήθηκε ως σειρά ελέγχου.

Το National Cancer Institute (NCI) δημιούργησε μια λίστα από 60 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (NCI-60) για την πιο εύκολη ανάλυση του μηχανισμού δράσης και τον προσδιορισμό νέων αντικαρκινικών ουσιών. [16]

## 6.2. Υλικά για καλλιέργειες:

### 1.RPMI (Gibco με αριθμό καταλόγου 31870-025)

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια των πιο πάνω καρκινικών κυτταρικών σειρών. Εμπλουτισμένος με

5% Fetal Bovine Serum

1% Antibiotic/Antimycotic

% L-Glutamine

### 2.DMEM (Gibco με αριθμό καταλόγου 41966-029)

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια της T47D καρκινικής κυτταρικής σειράς. Εμπλουτισμένος με

10% Fetal Bovine Serum

1% Antibiotic/Antimycotic

1% L-Glutamine

### 3.Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom με αριθμό καταλόγου S011)

Ο ορός χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού. Περιέχει αυξητικούς παράγοντες που υποβοηθούν την ανάπτυξη και την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια. Πριν την χρήση απενεργοποιείται στο υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά υπό ανάδευση.

### 4.Antibiotic/Antimycotic (Biochrom με αριθμό καταλόγου L0022-100)

Αντιβιοτικό και αντιμυκητιασικό που προστίθεται στο θρεπτικό υλικό για αποφυγή μόλυνσης των κυττάρων.

### 5.L-Glutamine (Gibco με αριθμό καταλόγου 25030-024)

Γλουταμίνη που χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού.

### 6.PBS 10X (Sigma με αριθμό καταλόγου 017K8212)

Ιστονικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για απομάκρυνση υπολειμμάτων του ορού (του θρεπτικού υλικού) πριν από την χρήση της τρυψίνης. Προκειμένου να παρασκευαστεί το PBS 1X από το PBS 10X, το PBS 10X αραιώνεται με αναλογία 1:10 σε water for injection.

### 7.Trypsin 10X (Biochrom με αριθμό καταλόγου L2153)

Θρυψίνη χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια ανάπτυξης τους. Προκειμένου να παραχθεί η Trypsin 1X από Trypsin 10X, η Trypsin 10X αραιώνεται με αναλογία 1:10 σε PBS 1X.

### 8.Freezing Medium

Χρησιμοποιείται για πάγωμα των κυττάρων. Αποτελείται από 90% Fetal Bovine Serum (FBS) και 10% DMSO Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Calbiochem με αριθμό καταλόγου 317275)

### 9.Trypan Blue (Biochrom έχει αριθμό καταλόγου L6323)

Χρωστική που χρησιμοποιείται για χρώση των κυττάρων, κατά την μέτρηση.

### 6.3. Μέθοδοι καλλιέργειας:

#### Συνθήκες:

Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και όλα τα υλικά είναι αποστειρωμένα για αποφυγή όλων των τυχών επιμολύνσεων. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αποστειρωμένες φλάσκες και διατηρούνται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 36.7 °C.

#### Ανανέωση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων:

Το RPMI απομακρύνεται, ακολουθεί πλύση με PBS 1X και προσθήκη καινούργιου RPMI.

Αν η flask είναι 25cm<sup>2</sup> προσθέτουμε 5ml RPMI.

Αν η flask είναι 75cm<sup>2</sup> προσθέτουμε 15ml RPMI.

#### Ανακαλλιέργεια:

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε περίπτωση ανομοιόμορφης ανάπτυξης των κυττάρων π.χ. συσσωματώματα.

1. Απομάκρυνση του RPMI

2. Πλύση με PBS 1X

3. Προσθήκη τρυψίνης (1ml για 25cm<sup>2</sup> flask/ 2ml για 75cm<sup>2</sup> flask) για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα

4. Μεταφορά στο κλίβανο για 3-5λεπτα και έλεγχος στο μικροσκόπιο αν τα κύτταρα ξεκόλλησαν

5. Προσθήκη του RPMI για την απενεργοποίηση της τρυψίνης

6. Μεταφορά της flask στο κλίβανο

#### Εξάπλωση των κυττάρων:

Για να αυξηθεί ο χώρος ανάπτυξης των κυττάρων.

1. Ακολουθούν τα πρώτα 4 βήματα της ανακαλλιέργειας.

2. Προσθήκη του RPMI (ανάλογα σε πόσες flask θα μοιραστούν τα κύτταρα) για την απενεργοποίηση της τρυψίνης

3. Μεταφορά των κυττάρων σε flasks

4. Μεταφορά των flasks στο κλίβανο

#### Πάγωμα κυττάρων:

1. Ακολουθούν τα πρώτα 5 βήματα της ανακαλλιέργειας.

2. Τα κύτταρα της flask συλλέγονται σε κωνικό πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon το οποίο φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 10λεπτά

3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται

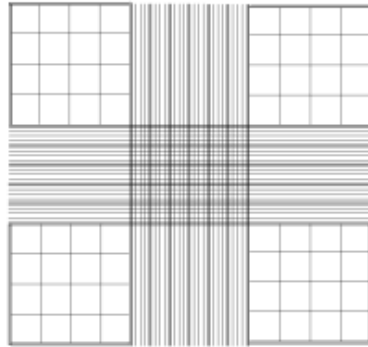
4. Προσθήκη του DMSO στο ίζημα

5. Το ίζημα με DMSO χωρίζεται σε κρυοφιαλίδια (~1ml σε κάθε ).

Η ποσότητα του DMSO που θα προστεθεί στο ίζημα εξαρτάται από την ποσότητα των κυττάρων σ'αυτο (1ml ανά 4 x10<sup>6</sup> κυττάρων)

### Μέτρηση των κυττάρων:

- 1.Ακολουθούν τα πρώτα 5 βήματα της ανακαλλιέργειας.
  - 2.Τα κύτταρα της flask συλλέγονται σε κωνικό πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon, το οποίο αναδεύεται προκειμένου να μην καθιζάνουν τα κύτταρα
  - 3.Μεταφορά σε ένα Eppendorf 90μl από το διάλυμα και 10μl χρωστικής Trypan Blue
  - 4.Μεταφορά 50μl διαλύματος από το Eppendorf σε πλάκα Neubauer
  - 5.Μέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- Μετρούνται τα κύτταρα που εντοπίζονται στα 4 λευκά τετράγωνα και ο αριθμός που προκύπτει διαιρείται με 4 και πολλαπλασιάζεται με 10.000 και με τα ml του διαλύματος στο falcon (βλ.βήμα2).



**Εικόνα 13.**

Πλάκα Neubauer [9]

### Ξεπάγωμα των κυττάρων:

Τα κρύοφιαλίδια με τα κύτταρα τοποθετούνται υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο (37°C) για να ξεπαγώσουν. Το περιεχόμενο κάθε κρύοφιαλίδιου μεταφέρεται σε κωνικό πλαστικό φιαλίδιο τύπου falcon(15ml) και ακολουθεί αργή προσθήκη του RPMI5% (10ml) με βοήθεια της πιπέτας. Στη συνέχεια το falcon με τα κύτταρα φυγοκεντρείται στις 900rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5ml RPMI20%. Τέλος το θρεπτικό υλικό με τα κύτταρα, μεταφέρονται από το falcon σε φλάσκα 25cm<sup>2</sup> και τοποθετούνται στο κλίβανο.

### Συλλογή κυττάρων για Western Blot:

- 1.Ακολουθούν τα πρώτα 5 βήματα της ανακαλλιέργειας.
  - 2.Τα κύτταρα της flask συλλέγονται σε ένα falcon
  - 3.Μέτρηση των κυττάρων και φυγοκέντρηση του falcon σε 1200rpm για 10λεπτά
  - 3.Το υπερκείμενο απομακρύνεται
  - 4.Το falcon με ίζημα αναποδογυρίζεται για να στεγνώσει
  - 5.Αποθήκευση στους -80 °C.
- Για την Western Blot συλλέγονται περίπου 3 x10<sup>6</sup> κύτταρα.

## 6.4. Λύση κυττάρων

Για την ταυτοποίηση μιας ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης, αρχικά απαιτείται η απομόνωση της. Αυτό πραγματοποιείται με τη λύση των κυττάρων, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών από το κύτταρο.

Αρχικό στάδιο είναι η παρασκευή του Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από:

1. Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER)
2. Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )
3. Sodium fluoride (NaF)
4. Protein Inhibitor (PI)
5. Sodium
6.  $\beta$ -glycerol

Η ποσότητα του Lysis Buffer εξαρτάται από την ποσότητα των κυττάρων. Για κάθε  $1 \times 10^6$  κύτταρα απαιτείται 100μl Lysis Buffer.

1. Προσθήκη του Lysis Buffer στο falcon με ίζημα που αποθηκεύεται στους  $-80^\circ\text{C}$  (βλέπε Συλλογή κυττάρων για Western Blot)
  2. Καλό πιπετάρισμα (για να σπάσουν τα συσσωματώματα) και μεταφορά του περιεχόμενου σε erpendorf
  3. Χρήση της σύριγγας (29G) για να σπάσουν τα συσσωματώματα
  4. Φυγοκέντρηση στους 13.000rpm για 30λεπτά
  5. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Erpendorf (το ίζημα πετάτε)
  6. Φυγοκέντρηση στους 13.000rpm για 30λεπτά
  7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Erpendorf (το ίζημα πετάτε)
- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να εξαφανιστεί το ίζημα.
8. Σε περίπτωση που απουσιάζει το ίζημα αλλά παρατηρείται ένα σύννεφο ακολουθούν οι υπέρηχοι
  9. Φυγοκέντρηση στους 13.000rpm για 30λεπτά
  10. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Erpendorf
  11. Αποθήκευση στους  $-80^\circ\text{C}$

## 6.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού Bradford είναι μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη (μπορεί να προσδιορίσει ουσίες από 5 µg) μέθοδος για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης που περιέχεται σε ένα διάλυμα, η οποία βασίζεται στην δημιουργία συμπλόκου χρωστικής – πρωτεΐνης και αλλαγής χρώματος του αντιδραστηρίου.

Χρησιμοποιήθηκε το BCA Protein Assay kit της εταιρίας ThermoScientific( με αριθμό καταλόγου 23227) και 96well plate.

1. Παρασκευή του Lysis Buffer(Βλέπε Λύση Κυττάρων) η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα που απαιτείται για πρότυπη καμπύλη το οποίο αραιώνεται με PBS 1X σε αναλογίες 1:2

2. Παρασκευή του Working Reagent (BCA Protein Assay kit):

Η αναλογίες των A (Cat. Number 23228) και B (Cat. Number 1859078) αντιδραστηρίων του Working Reagent είναι 50:1

3. Αραίωση των δειγμάτων με PBS 1X σε αναλογίες 1:2

4. Μετρήσεις για την Πρότυπη Καμπύλη

Πίνακας 6. Μετρήσεις για Bradford

1ο well με συγκέντρωση 2 mg/ml	25µl αλβουμίνη με συγκέντρωση 2mg/ml
2ο well με συγκέντρωση 1,5 mg/ml	$C1 * V1 = C2 * V2$ $2\text{mg/ml} * V1 = 1,5 \text{ mg/ml} * 140 \mu\text{l}$ $V1 = 105\mu\text{l}$ άρα 105µl από το stock (αλβουμίνης) και (140-105) 35µl του Lysis Buffer.
3ο well με συγκέντρωση 1mg/ml	$1,5\text{mg/ml} * V1 = 1 \text{ mg/ml} * 120 \mu\text{l}$ $V1 = 80\mu\text{l}$ άρα 80µl από το προηγούμενο well και (120-80) 40µl του Lysis Buffer.
4ο well με συγκέντρωση 0,75 mg/ml	$1\text{mg/ml} * V1 = 0,75 \text{ mg/ml} * 100 \mu\text{l}$ $V1 = 75\mu\text{l}$ άρα 75µl από το προηγούμενο well και (100-75) 25µl του Lysis Buffer.
5ο well με συγκέντρωση 0,5 mg/ml	$0,75\text{mg/ml} * V1 = 0,5 \text{ mg/ml} * 90 \mu\text{l}$ $V1 = 60\mu\text{l}$ άρα 60µl από το προηγούμενο well και (90- 60) 30µl του Lysis Buffer.
6ο well με συγκέντρωση 0,25 mg/ml	$0,5\text{mg/ml} * V1 = 0,25 \text{ mg/ml} * 60\mu\text{l}$ $V1 = 30\mu\text{l}$ άρα 30µl από το προηγούμενο well και (60-30) 30µl του Lysis Buffer.
7ο well με συγκέντρωση 0,125 mg/ml	$0,25\text{mg/ml} * V1 = 0,125 \text{ mg/ml} * 40 \mu\text{l}$ $V1 = 20\mu\text{l}$ άρα 20µl από το προηγούμενο well και (40-20) 20µl του Lysis Buffer.
8ο well με συγκέντρωση 0mg/ml	25µl Lysis Buffer

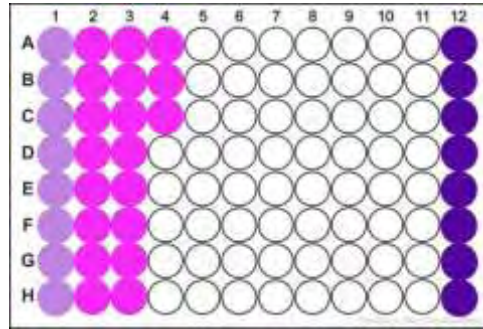
5. Διαχωρισμός του και 96well plate ως εξής:

Σκούρο μωβ: Βοηθητική πρότυπη καμπύλη, περιέχει τις ποσότητες που είχαν υπολογιστεί στο βήμα 4.

Ανοικτό μωβ: Πρότυπη καμπύλη, περιέχει 10μl από την βοηθητική πρότυπη.

Ροζ: Δείγματα, περιέχει 10μl Δείγματος και 10μl PBS1X.

Ανοικτό ροζ: Δείγματα με αραιώση 1:2, περιέχει 10μl από την μπλε στήλη.



**Εικόνα 14.**

Διαχωρισμός των wells στην 96well plate. [10]

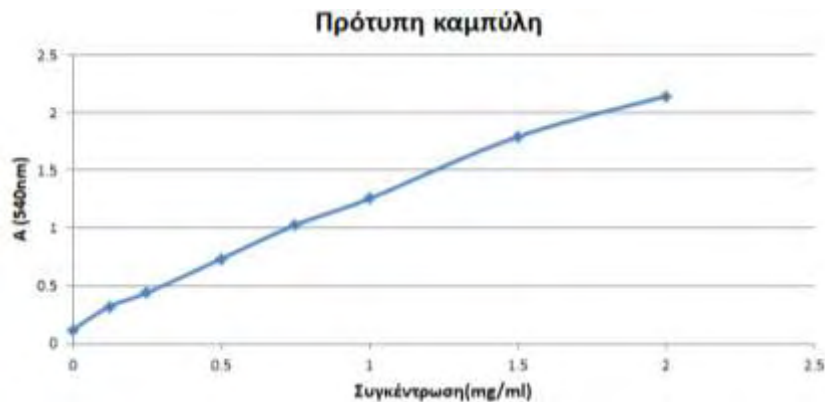
Το 96wells με δείγματα φωτομετρήθηκε και πήραμε τις εξής τιμές:

**Πίνακας 7.**Αποτελέσματα φωτομέτρησης

	A(540nm)		A(540nm)		A(540nm)
MB435	0.734	SKMEL28	1.281	MB231	0.951
SF295	0.664	HeLa	0.684	MCF7	1.016
OVCAR 5	1.084	H23	1.795	PC3	1.133
OVCAR 3	0.599	H460	1.482	DU145	0.788
NCI ADR-RES	0.979	HTC116	0.688	CAKI-1	1.01
T47D	0.676	HTC15	1.154	SN12C	1.279
		A549	0.603		

**Επεξεργασία αποτελεσμάτων:**

Με βάση τις τιμές που λαμβάνουμε από την φωτομέτρησης της αλβουμίνης, δημιουργείται η αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη.



**Εικόνα 15.**

Πρότυπη καμπύλη

Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης και με τα αποτελέσματα φωτομέτρησης των δειγμάτων, υπολογίζεται η ποσότητα του δείγματος και του loading buffer που θα φωρτώθει στην Western Blot.

## 6.6. Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση (Western Blot) αποτελεί μια μέθοδο ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης βιολογικών μακρομορίων, στην οποία τα μόρια που έχουν ήδη διαχωριστεί μεταξύ τους **μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης**, μεταφέρονται σε ένα σταθερό υπόστρωμα, συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου και αφήνουν το αποτύπωμά τους. Η μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανάλυση πρωτεϊνικών μορίων αναφέρεται ως ανοσοαποτύπωση ή ανάλυση κατά Western. Οι πρωτεΐνες που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη ανιχνεύονται στην συνέχεια με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων σε δυο στάδια. Αρχικά η στόχευση της υπό εξέταση πρωτεΐνης, πραγματοποιείται με ειδικό, έναντι αυτής αντίσωμα και έπειτα ακολουθεί η προσθήκη δευτέρου αντισώματος, που αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Η ένταση του σήματος είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της υπό ανάλυση πρωτεΐνης. [17]

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται είναι η συσκευή Mini-PROTEAN® 3 Cell – BIORAD.

### Υλικά για ανοσοαποτύπωση:

Πηκτή πολυακρυλαμίδιου:

Για την ηλεκτροφόρηση απαιτούνται δύο πηκτές με διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου.

1. Πηκτή Επιστοιβαξης (Stacking gel)

η συγκέντρωση της είναι 5%

2. Πηκτή Διαχωρισμού (Resolving Gel) η συγκέντρωση της διαφέρει ανάλογα με το βάρος των πρωτεϊνών που βρίσκονται υπό μελέτη

**Πίνακας 8.** Συνταγή για πηκτή πολυακρυλαμίδιου [6]

Percent Gel	DDI H <sub>2</sub> O (ml)	30% Degassed		*Gel Buffer (ml)	10% w/v SDS (ml)
		Acrylamide/Bis (ml)			
4%	6.1	1.3		2.5	0.1
<b>5%</b>	<b>5.7</b>	<b>1.7</b>		<b>2.5</b>	<b>0.1</b>
6%	5.4	2.0		2.5	0.1
7%	5.1	2.3		2.5	0.1
8%	4.7	2.7		2.5	0.1
9%	4.4	3.0		2.5	0.1
10%	4.1	3.3		2.5	0.1
11%	3.7	3.7		2.5	0.1
12%	3.4	4.0		2.5	0.1
13%	3.1	4.3		2.5	0.1
14%	2.7	4.7		2.5	0.1
15%	2.4	5.0		2.5	0.1
16%	2.1	5.3		2.5	0.1
17%	1.7	5.7		2.5	0.1

\* Resolving Gel Buffer - 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

\* Stacking Gel Buffer - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

**Resolving Gel:** 50 µl 10% APS and  
5 µl TEMED  
**Stacking Gel:** 50 µl 10% APS and  
10 µl TEMED

Τα APS και το TEMED μπαίνουν τελευταία καθώς είναι εκκινητές και επιταχυντές πολυμερισμού



#### APS:

0,1gr APS σε 10ml dH<sub>2</sub>O

#### Ακρυλαμίδη:

29,2gr Ακρυλαμίδη (x1)

0,8gr N,N-methylene bis acrylamide +dH<sub>2</sub>O εως 100ml

#### Running Buffer 1X:

100ml Running Buffer 10X

900ml Ultrapure water

#### Loading Buffer:

Γλυκερίνη

0,5M Tris Cl

Bromophenol Blue 0,2 w/v (

SDS 20% w/v

B- μερκαπτοαιθανόλη

#### Transfer Buffer 1X:

100ml Transfer Buffer 10X

700ml Ultrapure Water

100ml Methanol

#### NaCl 0,9%

9gr NaCl σε 1000ml Ultrapure Water

#### Buffers:

TBS (Tris Buffer Saline) (950ml NaCl 0,9% + 50ml Tris Cl 1M)

TTBS1X (1000ml TBS + 1ml Tween20)

TTBS 5% (TTBS1X + 5% FBS)

#### SDS 10%

10gr Sodium dodecyle Sulfate σε 90ml dH<sub>2</sub>O

#### Διάλυμα Ponceau

0,1gr Ponceau σε 5% Acetic Acid

#### Διάλυμα Coomassie:

0,1 w/v σε 5% v/v acetic acid (συμπληρώνω με dH<sub>2</sub>O)

#### ECL για 10ml

##### Solution A

9ml dH<sub>2</sub>O

0,5ml 2M Tris-HCL ph 8,5

45μl Coumaric (0,15gr Coumaric → DMSO to 10ml) Store -4°C in Dark

100μl Luminal (0,44gr Luminal →DMSO to 10 ml) Store at -20°C in Dark

##### Solution B

9ml dH<sub>2</sub>O

0,5ml 2M Tris-HCL ph 8,5

6μl 30% Hydrogen Peroxide

Ta Solution A και Solution B πριν την χρήση αναμειγνύονται σε ίσες ποσότητες.

## Αντισώματα:

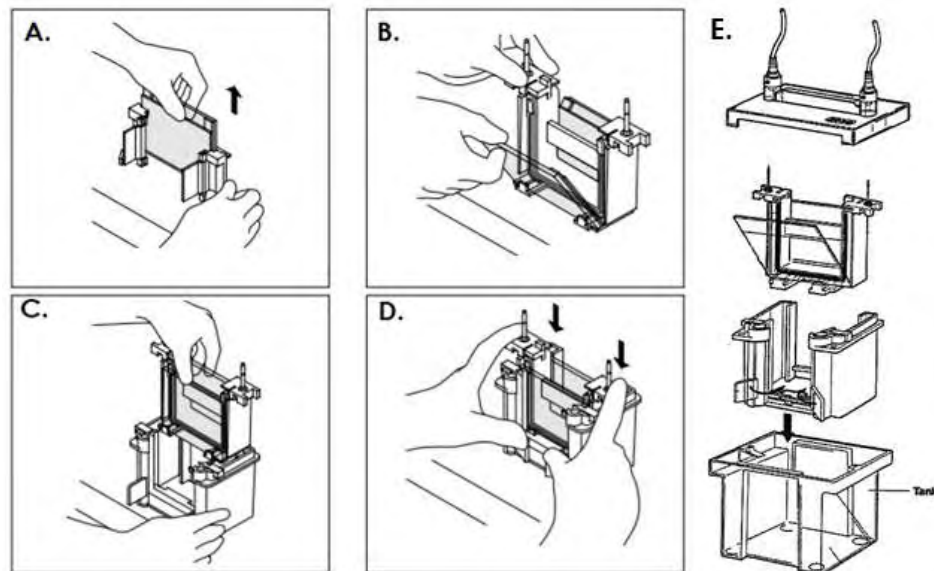
Πίνακας 9. Αντισώματα

Actin 42kDa	1:10 000	Anti-mouse	1:6000	
Sigma1 29kDa	1: 200	Anti-mouse	1:6000	Santa Cruz (F-5):sc-166392
Sigma2(PGRMC1) 25kDa	1:500	Anti-rabbit	1:2000	Cell Signaling # 13856S
TMEM97 24kDa	1:500	Anti-rabbit	1:6000	Novus Biologicals NBP1-30436SS

## Διαδικασία Western Blot:

### Προετοιμασία πηκτής:

Αρχικά, παρασκευάστηκε η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από δυο τμήματα το Stacking (πηκτή επιστοίβαξης) και το Resolving (πηκτή διαχωρισμού). Η πυκνότητα του Stacking είναι πάντα 5%, ενώ του Resolving μπορεί να διαφέρει. Όσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα τόσο πιο αργή είναι η μετακίνηση και τόσο καλύτερος ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με μικρό μοριακό βάρος. Αντίθετα η μικρότερη πυκνότητα της πηκτής οδηγεί σε πιο γρήγορη μετακίνηση των πρωτεϊνών και σε καλύτερο διαχωρισμό πρωτεϊνών με μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου μεταφέρονται στην ειδική κασέτα (εικ.16 A→D) και την συνέχεια στο tank που περιέχει runnig buffer 1X (εικ.16E).[18]

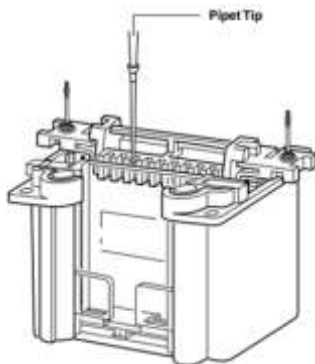


Εικόνα 16.

Στήση συσκευής ηλεκτροφόρησης. [11]

### Προετοιμασία των δειγμάτων:

Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η ποσότητα των δειγμάτων και του loading buffer, τα οποία στην συνέχεια αναμειγνύονται και θερμαίνονται στους 95°C για 5λεπτά, προκειμένου να σπάσουν οι δισουλφιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Μετά την θέρμανση τοποθετούνται στο πάγο για να υγροποιηθούν οι υδρατμοί. Ακολουθεί η φόρτωση του marker και των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής (ο marker τοποθετείται στην άκρη, περιέχει πρωτεϊνές γνωστού μοριακού βάρους, με βάση αυτών γίνεται ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών του δείγματος). Η ηλεκτροφόρηση ξεκινάει στα 100V καθώς τρέχουν στο Stacking και στην συνέχεια αλλάζει στα 200V, αφού τα δείγματα φτάσουν το Resolving. [18]



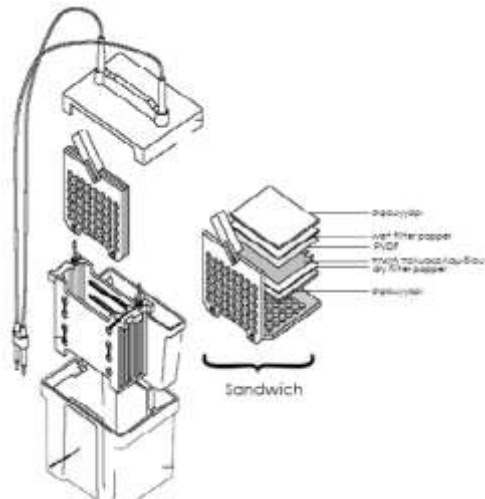
**Εικόνα 17.**

Φόρτωση δειγμάτων. [11]

### Προετοιμασία Transfer:

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη PVDF. Αρχικά συναρμολογείται το «sandwich» που αποτελείται από: σφουγγαράκι, dry filter paper, πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεμβράνη PVDF, wet filter paper, σφουγγαράκι. Στη συνέχεια, το sandwich μεταφέρεται στο tank. Το Transfer πραγματοποιείται στα 100n που αντιστοιχούν στα 250mA και περίπου σε 1ώρα φτάνει τα 350mA( σημαντικό τα mA να αυξηθούν κατά 100 mA), που σηματοδοτεί το τέλος του Transfer.[18]

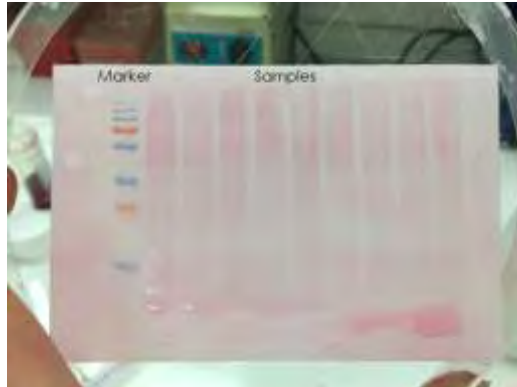
Με το τέλος του Transfer η PVDF μεμβράνη αφαιρείται και ακολουθεί η χρώση της με το Ronceau ενώ, η πηκτή εμβαπτήζεται σε κυανό του Coomassie, προκειμένου να γίνει έλεγχος της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη. Η PVDF μεμβράνη επωάζεται με TTBS 5% για μία ώρα υπο ήπια ανάδευση, προκειμένου να καλυφθούν όλες οι μη ειδικές θέσεις.



**Εικόνα 18.**

Προετοιμασία συσκευής για Transfer.[11]

Μετά το μπλοκάρισμα, η μεμβράνη κόβεται στα κατάλληλα σημεία (με βάση τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που βρίσκονται υπο μελέτη). Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται overnight με το πρωτογενές αντίσωμα, στους 4°C υπό ήπια ανάδευση. Την επόμενη μέρα ακολουθεί η πλύση της μεμβράνης με TTBS1X ( 3φορές για 5λεπτά). Μετά τις πλύσεις η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα υπο ήπια ανάδευση για μία ώρα και μετά ξάνα 3 πλύσεις. Η επιλογή του δευτερογενούς αντισώματος γίνεται με βάση το data-sheet του πρωτογενές αντισώματος.



**Εικόνα 19.**

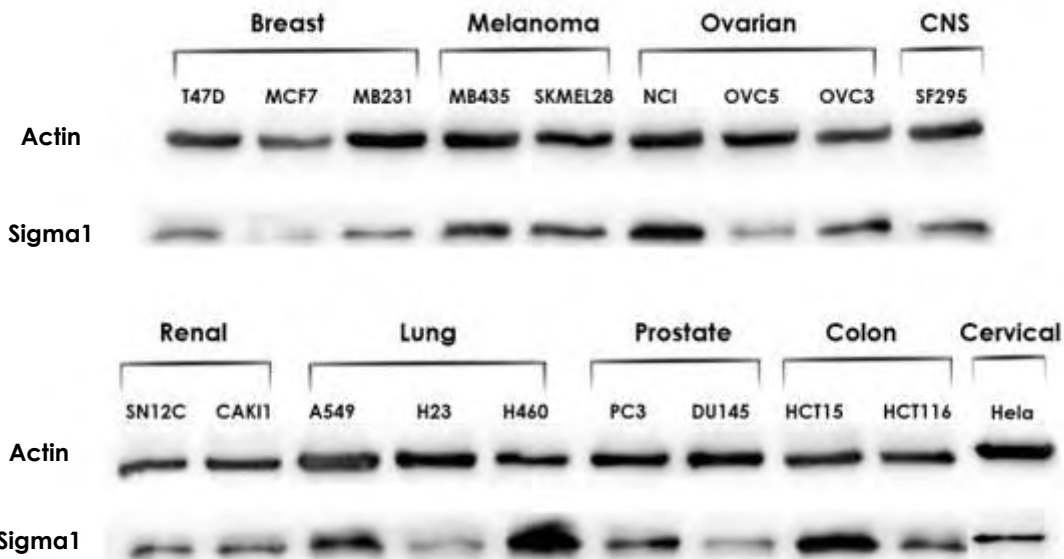
Μεμβράνη εμβαπτισμένη με Poceau .

Τέλος, ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος μέσω του λογισμικού Alliance, με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάζεται για 5λεπτά στο ECL το οποίο παρασκευάζεται με την ανάμειξη του Solution A και Solution B σε ίσες αναλογίες. Στην συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται στο μηχάνημα imager και ακολουθούν κατάλληλες ρυθμίσεις στο λογισμικό π.χ. του χρόνου. Τέλος το αποτέλεσμα εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή.

## 7. Αποτελέσματα:

### 7.1. Έλεγχος έκφρασης των Sigma1 υποδοχέων μέσω Western Blot

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των sigma1 υποδοχέων σε 18 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκε η τεχνική Western Blot, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 20 ενώ ο μέσος όρος έκφρασης . (από τρία ανεξάρτητα πειράματα) παρουσιάζεται στο γράφημα 1.



**Εικόνα 20.**

Αποτελέσματα Western Blot για τον sigma1.

Από τις αναλύσεις προκύπτει ότι τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται στον καρκίνο του μαστού όπως αυτός αντιπροσωπεύεται από τις τρεις κυτταρικές σειρές (T47D, MCF7, MB231) που ελέγχθηκαν καθώς και στους καρκίνους του ΚΝΣ (μια κυτταρική σειρά, SF295), του νεφρού (SN12, CAK11) και στον καρκίνο του προστάτη (PC3, DU145).

Στο μελάνωμα οι δύο κυτταρικές σειρές ( MB435, SKMEL28) παρουσιάζουν μέτρια έκφραση των sigma1 υποδοχέων.

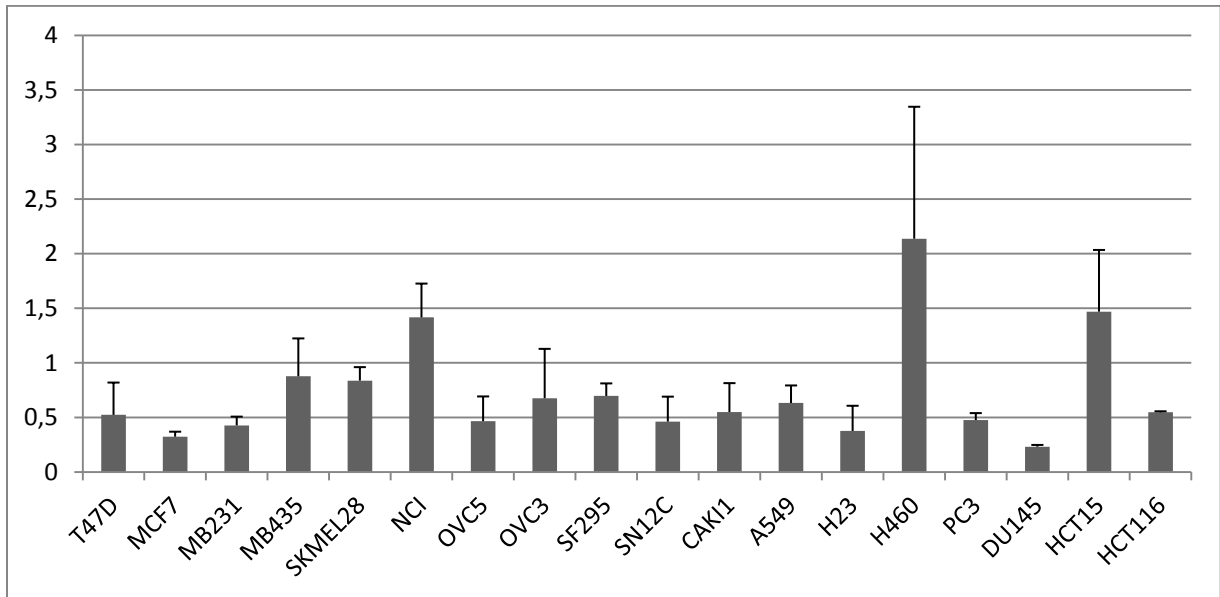
Στον καρκίνο των ωοθηκών η έκφραση των sigma1 υποδοχέων στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές ποικίλει, όπου η σειρά NCI ADR-RES έχει υψηλή έκφραση, ενώ οι κυτταρικές σειρές OVCAR3 και OVCAR5 έχουν μέτρια και χαμηλή αντίστοιχα.

Ποικίλη έκφραση των sigma1 υποδοχέων παρατηρείται και στον καρκίνο του πνεύμονα, όπου η κυτταρική σειρά H460 έχει την υψηλότερη, η A549 μέτρια και η H23 τη χαμηλότερη.

Τέλος στον καρκίνο του παχέος εντέρου η κυτταρική σειρά HCT15 εμφανίζει υψηλή έκφραση των sigma1 υποδοχέων ενώ η σειρά HCT116 χαμηλή.

Η κυτταρική σειρά Hela S3 (καρκίνος του τραχήλου) δεν περιλαμβάνεται στο NCI-60 panel και χρησιμοποιήθηκε ως control

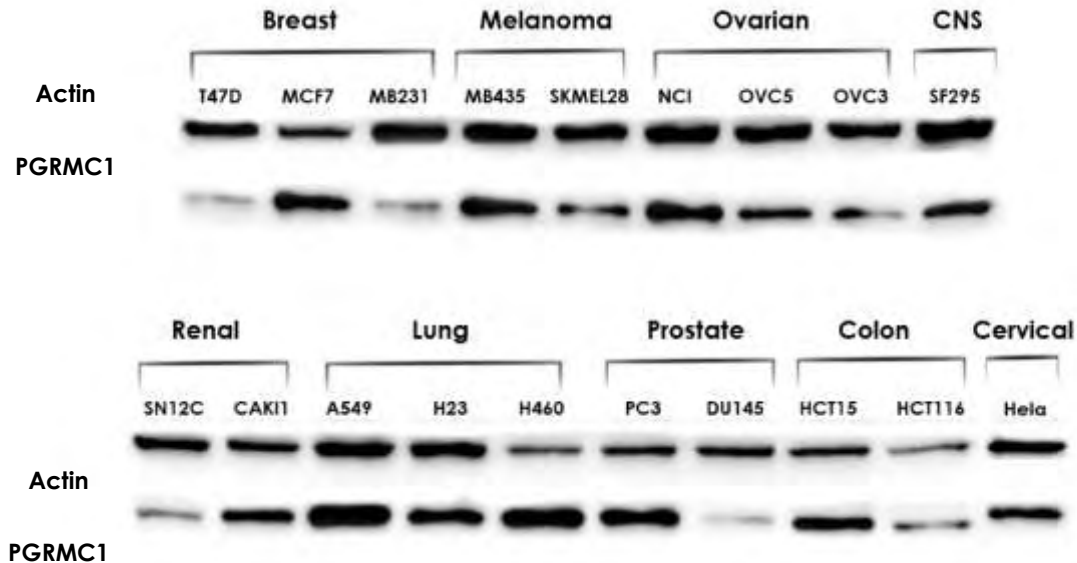
Το παρακάτω γραφήμα αναπρηστά το μέσο όρο έκφρασης των sigma1 υποδοχέων



**Γράφημα 1.**  
Επίπεδα του sigma1 στις κυτταρικές σειρές.

## 7.2. Έλεγχος έκφρασης των Sigma2 υποδοχέων μέσω Western Blot

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του υποδοχέα PGRMC1 σε 18 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκε η τεχνική Western Blot, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 21 ενώ ο μέσος όρος έκφρασης (από τρία ανεξάρτητα πειράματα) παρουσιάζεται στο γράφημα 2.



Εικόνα 21.

Αποτελέσματα Western Blot για τον PGRMC1.

Από τις αναλύσεις προκύπτει ότι στον καρκίνο του μαστού η έκφραση του PGRMC1 στις τρεις κυτταρικές σειρές ποικίλει, όπου η σειρά MCF7 έχει υψηλή έκφραση, ενώ οι κυτταρικές σειρές T47D και MB231 έχουν χαμηλή.

Στο μελάνωμα η κυτταρική σειρά MB435 παρουσιάζει υψηλή έκφραση του PGRMC1 ενώ η κυτταρική σειρά SKMEL28 χαμηλή.

Στον καρκίνο των ωοθηκών η κυτταρική σειρά NCI ADR-RES εμφανίζει υψηλή έκφραση του PGRMC1 ενώ οι κυτταρικές σειρές OVCAR3 και OVCAR5 χαμηλή.

Στον καρκίνο του ΚΝΣ χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά, SF295, η οποία παρουσιάζει μέτρια έκφραση του PGRMC1.

Στον καρκίνο του νεφρού η κυτταρική σειρά SN12 εμφανίζει πολύ χαμηλή έκφραση του PGRMC1 ενώ η κυτταρική σειρά CAK11 παρουσιάζει υψηλή έκφραση.

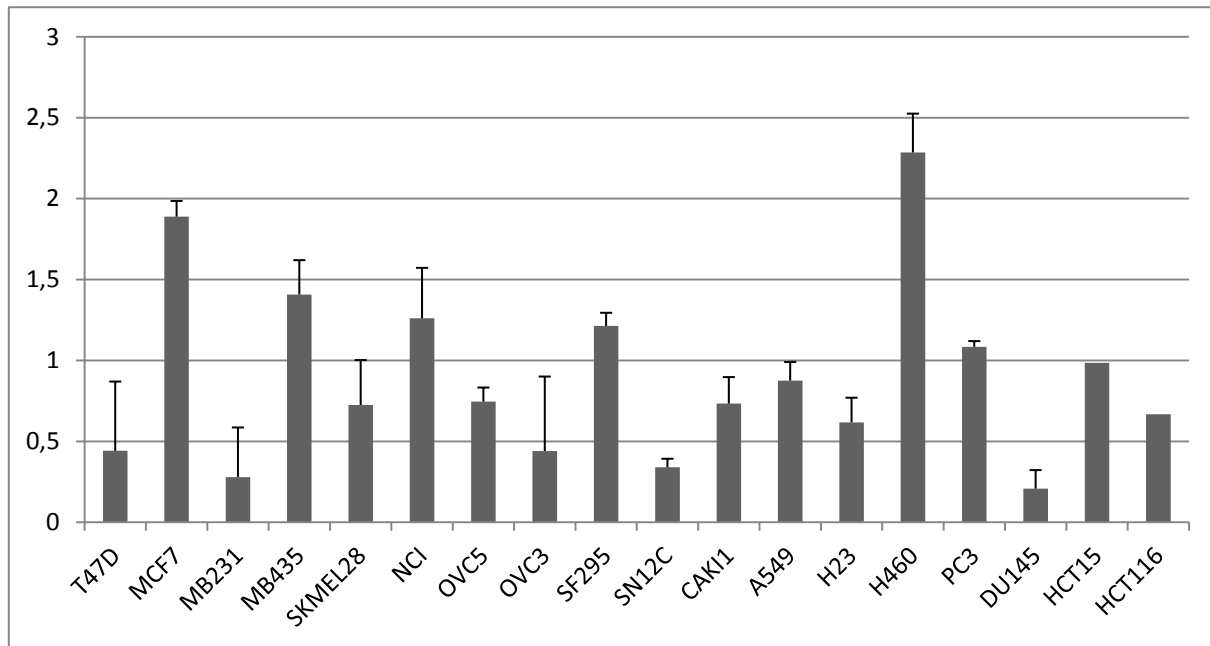
Στον καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται ότι και οι τρεις κυτταρικές σειρές ( A549, H23, H460 ) εμφανίζουν πολύ υψηλή έκφραση του PGRMC1.

Στον καρκίνο του προστάτη η κυτταρική σειρά PC3 εμφανίζει υψηλή έκφραση του PGRMC1, σε αντίθεση η DU145 εμφανίζει πολύ χαμηλή.

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η κυτταρική σειρά HCT15 εμφανίζει υψηλή έκφραση του PGRMC1 ενώ η σειρά HCT116 χαμηλή.

Η κυτταρική σειρά HeLa S3 (καρκίνος του τραχήλου) δεν περιλαμβάνεται στο NCI-60 panel και χρησιμοποιήθηκε ως control.

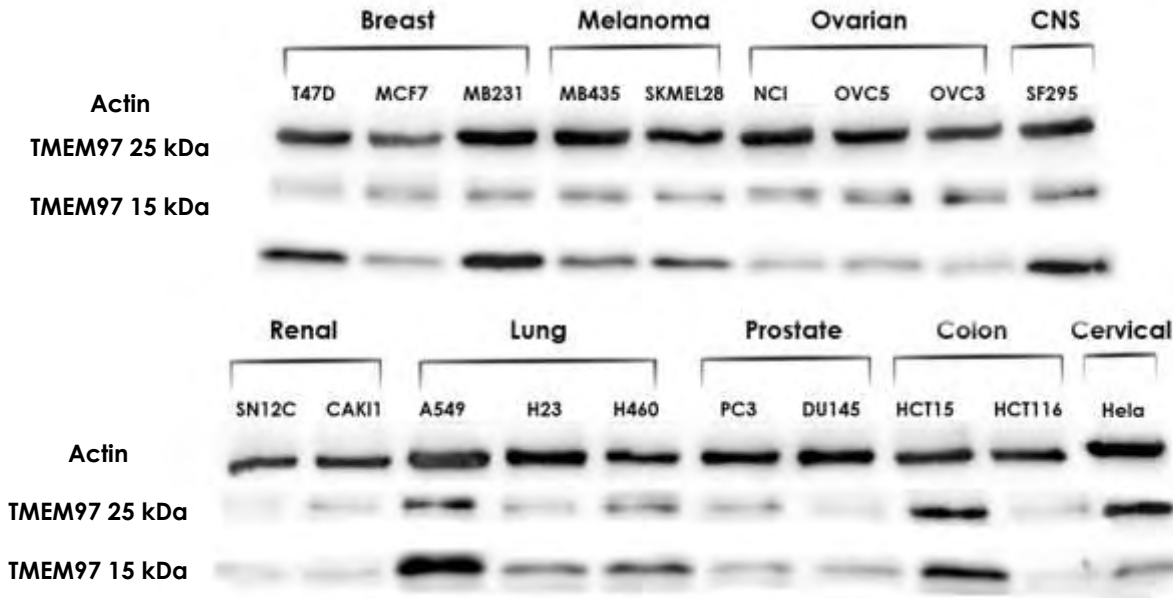
Το παρακάτω γραφήμα αναπρηστά το μέσο όρο έκφρασης του PGRMC1.



**Γράφημα 2.**  
Επίπεδα του sigma1 στις κυτταρικές PGRMC1



Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του sigma2 υποδοχέα και συγκεκριμένα του TMEM97 σε 18 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκε η τεχνική Western Blot, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 22. Το ανίσωμα του TMEM97 προσδένεται σε δύο ισομορφές του (25kDa και 15kDa).



**Εικόνα 22.**  
Αποτελέσματα Western Blot για τον TMEM97.

Από τις αναλύσεις της ανοσοαποτύπωσης προκύπτει ότι τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και των δύο ισομορφών του TMEM97 εμφανίζονται στον καρκίνο των ωοθηκών ο οποίος αντιπροσωπεύεται από τις τρεις κυτταρικές σειρές ( NCI ADR-RES, OVCAR3 και OVCAR5 ) που ελέγχθηκαν καθώς και στους καρκίνους του νεφρού ( SN12, CAK11), του προστάτη ( PC3, DU145 ) και στο μελάνωμα ( MB435, SKMAL28 ).

Στον καρκίνο του μαστού η έκφραση του TMEM97 25kDa στις τρεις κυτταρικές σειρές (T47D, MCF7, MB231) είναι χαμηλή, όμως αυτό δεν ισχύει στην ισομορφή των 15kDa, όπου οι κυτταρικές σειρές T47D και MB231 την εκφράζουν σε υψηλό βαθμό, ενώ η κυτταρική σειρά MCF7 σε χαμηλό.

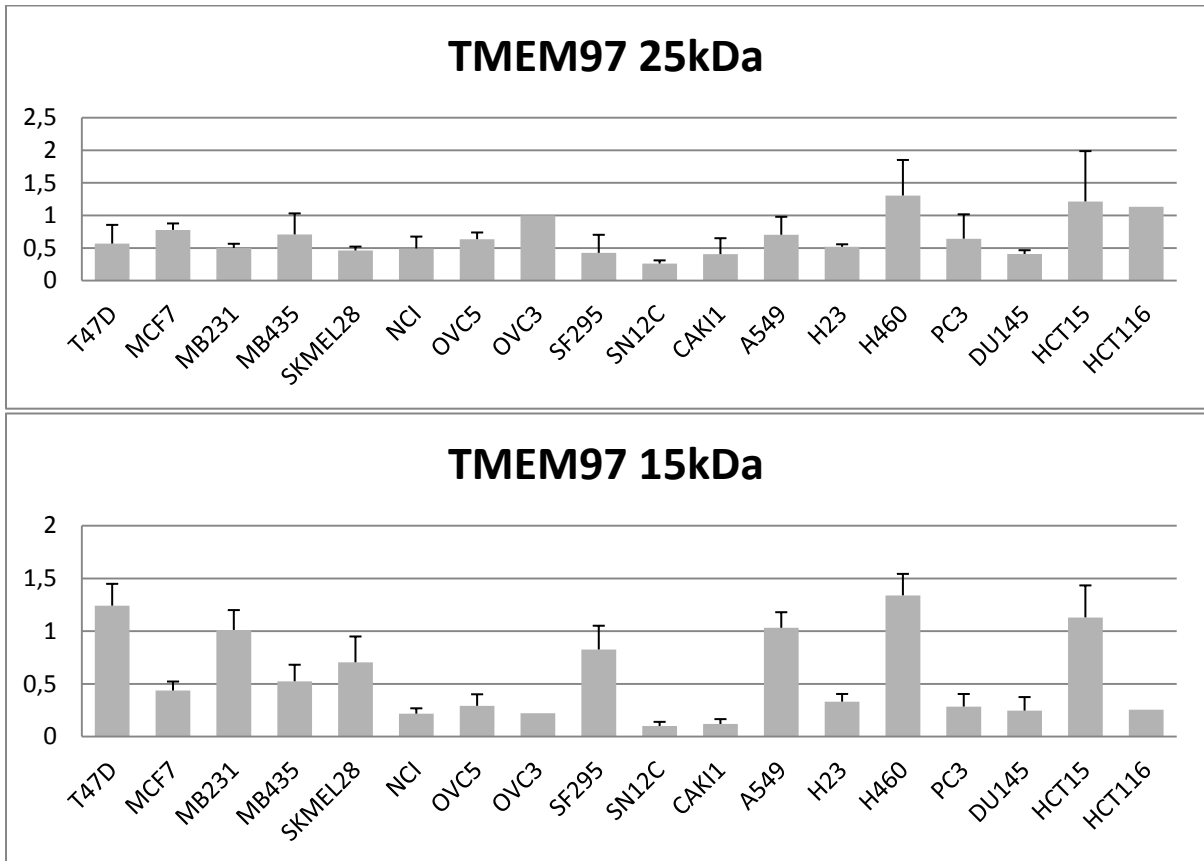
Στον καρκίνο του ΚΝΣ χρησιμοποιήθηκε μια κυτταρική σειρά SF295, η οποία παρουσιάζει χαμηλή έκφραση της ισομορφής που αντιστοιχεί στα 25kDa και υψηλή έκφραση της ισομορφής που αντιστοιχεί στα 15kDa .

Στον καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται ότι η κυτταρική σειρά A549 έχει μέτρια έκφραση της ισομορφής που αντιστοιχεί στα 25kDa και υψηλή έκφραση της ισομορφής που αντιστοιχεί στα 15kDa ενώ οι κυτταρικές σειρές H23 και H460 παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση και των δύο ισομορφών του TMEM97.

Τέλος στον καρκίνο του παχέος εντέρου η κυτταρική σειρά HCT15 εμφανίζει υψηλή έκφραση και των δύο ισομορφών του TMEM97 ενώ η κυτταρική σειρά HCT116 χαμηλή.

Η κυτταρική σειρά Hela S3 (καρκίνος του τραχήλου) δεν περιλαμβάνεται στο NCI-60 panel και χρησιμοποιήθηκε ως control

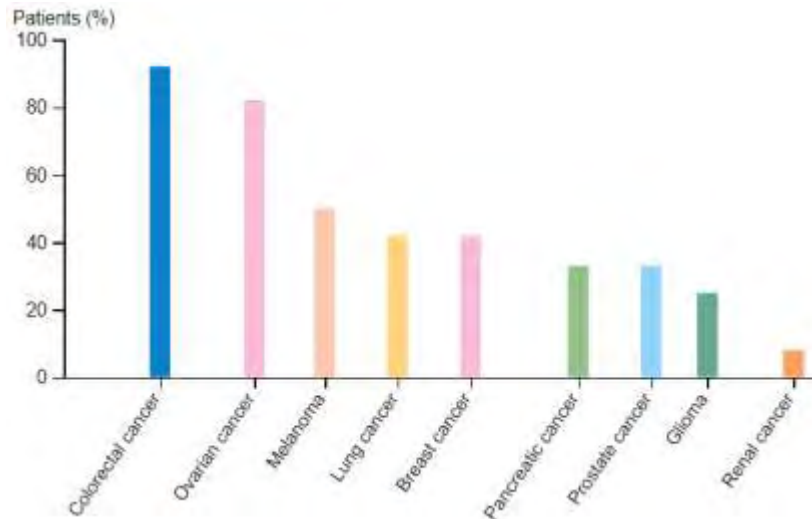
Το παρακάτω γραφήμα αναπληρωτά το μέσο όρο έκφρασης και των δύο ισομορφών του TMEM97 (25kDa και 15kDa).



**Γράφημα3.**  
Επίπεδα του TMEM97 (25kDa και 15kDa) στις  
κυτταρικές σειρές

## 8. Συζήτηση:

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Human Protein Atlas οι sigma1 υποδοχείς έχουν την εξής έκφραση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές:



**Εικόνα 20.**

Δεδομένα της Human Protein Atlas για τον sigma1 υποδοχέα [12]

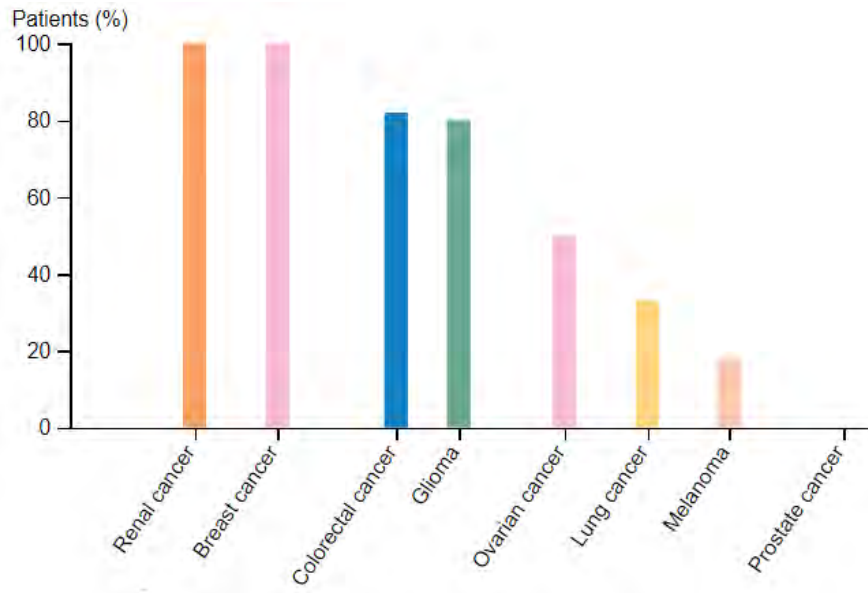
Στα αποτελέσματα που λαμβάνουμε από την τεχνική Western Blot, παρατηρούμε ότι οι sigma1 υποδοχείς έχουν ποικίλη έκφραση σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα δεδομένα από τη βάση Human Protein Atlas:

Οι κυτταρικές σειρές όπως HCT15 (καρκίνος του εντέρου) και NCI (καρκίνος των ωοθηκών), παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης με βάση τα αποτελέσματα Western Blot, συμφωνώντας έτσι με τα δεδομένα του Human Protein Atlas.

Σε αντίθεση, η κυτταρική σειρά H460 (καρκίνος του πνεύμονα) παρόλο που εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης με βάση τη Western Blot, δεν φαίνεται να είναι απόλυτα συμβατή με τα αντίστοιχα δεδομένα από τη βάση Human Protein Atlas.

Οι κυτταρικές σειρές T47D, MB231, MCF7 (καρκίνος του μαστού), DU145, PC3 (καρκίνος του προστάτη) και SN12, CAKI1 (καρκίνος των νεφρών) παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση με βάση τα αποτελέσματα Western Blot, κάτι το οποίο παρατηρούμε και στη βάση Human Protein Atlas.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της Human Protein Atlas οι sigma2/PGRMC1 υποδοχείς έχουν την εξής έκφραση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές:



**Εικόνα 21.**

Δεδομένα της Human Protein Atlas για τον PGRMC1 υποδοχέα [13]

Παρατηρείται αυξημένη έκφραση του PGRMC1 στον καρκίνο των νεφρών, του μαστού και του εντέρου. Ωστόσο, στα αποτελέσματά μας όπως αυτά προκύπτουν με βάση τα Western Blot που πραγματοποιήθηκαν η έκφραση σε αυτούς τους καρκινικούς τύπους είναι ποικίλη. Για παράδειγμα στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, οι διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, παρουσιάζουν χαμηλή αλλά και υψηλή έκφραση, με την MCF7 να έχει την υψηλότερη έκφραση, ενώ η T47D και η MB231 τη χαμηλότερη.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της Human Protein Atlas ο καρκίνος των ωοθηκών, του πνεύμονα, του προστάτη και του μελανώματος παρουσιάζει χαμηλή έκφραση του PGRMC1. Όμως, τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western Blot δείχνουν μέτρια έως και υψηλή έκφραση του PGRMC1.

Όσο αφορά την κυτταρική σειρά SF295 (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα) αυτή παρουσιάζει μέτρια προς υψηλή έκφραση του PGRMC1, κάτι το οποίο συνάδει με τα δεδομένα της Human Protein Atlas.

Σχετικά με τα αποτελέσματα που αφορούν τον TMEM97, η ανάλυση Western Blot, υποδεικνύει ότι κάθε κυτταρική σειρά έχει ένα ξεχωριστό πρότυπο έκφρασης. Μερικές κυτταρικές σειρές φαίνεται να έχουν την τάση να εκφράζουν λιγότερο ή περισσότερο κάποια από τις δύο ισομορφές, ή να εκφράζουν και τις δύο στον ίδιο βαθμό.

Συγκεκριμένα οι κυτταρικές σειρές T47D, MB231, SF295 και A549 εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την ισομορφή των 15kDa, σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά HeLa που εκφράζει περισσότερο την ισομορφή των 25kDa. Η κυτταρική σειρά HCT115 φαίνεται να εκφράζει και τις δύο ισομορφές στον ίδιο βαθμό. Οι υπόλοιπες κυτταρικές σειρές εκφράζουν και τις δύο ισομορφές σε μειωμένο βαθμό.

Συνοψίζοντας όλα τα αποτελέσματα, παρατηρούμε ότι οι sigma υποδοχείς παρουσιάζουν ποικίλη έκφραση σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αυτό δείχνει ότι η χρήση τους, ως μελλοντική θεραπεία, θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματική, σε μερικούς καρκινικούς τύπους και όχι σε όλους. Με βάση τις παρατηρήσεις από την παρούσα μελέτη αλλά και από τη διεθνή βιβλιογραφία παρατηρείται σημαντικό έλλειμμα στην έκφραση των υποδοχέων σε πραγματικές κλινικές συνθήκες δηλαδή σε καρκινικούς όγκους και η συσχέτιση τους με κλινικά δεδομένα όπως χημειοπάτηση, επιβίωση, επιθετικότητα. Έτσι προκύπτει ότι απαιτείται ακόμα περισσότερη ανάλυση, πριν καταλήξουμε στη δυναμική τους χρησιμότητα για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών θεραπειών.

## 9. Βιβλιογραφία:

1. M. Schumacher, R. Guennoun, in *Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)*, 2009
2. Weber, F., & Wünsch, B. (2017). Medicinal Chemistry of  $\sigma_1$  Receptor Ligands: Pharmacophore Models, Synthesis, Structure Affinity Relationships, and Pharmacological Applications. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 51–79. doi:10.1007/164\_2017\_33
3. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2011), Το κύτταρο: Μία μοριακή προσέγγιση. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
4. Peter J. Russell,( 2013), *iGenetics: Μια μεντελική προσέγγιση*. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
5. Burton E. Tropp, (2014), Βασικές αρχές μοριακής βιολογίας. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
6. Kim, F. J. (2017). Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1–11. doi:10.1007/164\_2017\_41
7. Kruse, A. (2016). Structural Insights into Sigma1 Function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 13–25. doi:10.1007/164\_2016\_95
8. Laurini, E., Marson, D., Fermeglia, M., & Pricl, S. (2017). 3D Homology Model of Sigma1 Receptor. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 27–50. doi:10.1007/164\_2017\_35
9. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., & Ruoho, A. E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12), 557–566. doi:10.1016/j.tips.2010.08.007
10. Kourrich, S. (2017). Sigma-1 Receptor and Neuronal Excitability. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 109–130. doi:10.1007/164\_2017\_8
11. Αιμιλία Ζίφα, (2017), Διακυτταρική επικοινωνία Μεταγωγή σήματος. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας
12. 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  $\sigma_2$ receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(27), 7160–7165. doi:10.1073/pnas.1705154114
13. Xu, J., Zeng, C., Chu, W., Pan, F., Rothfuss, J. M., Zhang, F., ... Mach, R. H. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nature Communications*, 2(1). doi:10.1038/ncomms1386
14. Van Waarde, A., Rybczynska, A. A., Ramakrishnan, N. K., Ishiwata, K., Elsinga, P. H., & Dierckx, R. A. J. O. (2015). Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), 2703–2714. doi:10.1016/j.bbamem.2014.08.022
15. Kashiwagi, H., McDunn, J. E., Simon, P. O., Goedegebuure, P. S., Xu, J., Jones, L., ... Hawkins, W. G. (2007). Selective sigma-2 ligands preferentially bind to pancreatic adenocarcinomas: applications in diagnostic imaging and therapy. *Molecular Cancer*, 6(1), 48. doi:10.1186/1476-4598-6-48

16. [https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/cell\\_list.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm)
17. Πουλάς Κωνσταντίνος, (2015), Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών, Συνδεσμος Ελληνικων Ακαδημαϊκων Βιβλιοθηκων
18. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>
19. 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) -*
20. Cahill, M. A., Jazayeri, J. A., Kovacevic, Z., & Richardson, D. R. (2016). PGRMC1 regulation by phosphorylation: potential new insights in controlling biological activity. *Oncotarget*, 7(32). doi:10.18632/oncotarget.10691

## ΕΙΚΟΝΕΣ:

1. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2011), Το κύτταρο: Μία μοριακή προσέγγιση. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
2. <https://ourworldindata.org/cancer>
3. Laurini, E., Marson, D., Fermeglia, M., & Pricl, S. (2017). 3D Homology Model of Sigma1 Receptor. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 27–50. doi:10.1007/164\_2017\_35
4. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., & Ruoho, A. E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12), 557–566. doi:10.1016/j.tips.2010.08.007
5. Kourrich, S. (2017). Sigma-1 Receptor and Neuronal Excitability. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 109–130. doi:10.1007/164\_2017\_8
6. Xu, J., Zeng, C., Chu, W., Pan, F., Rothfuss, J. M., Zhang, F., ... Mach, R. H. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nature Communications*, 2(1). doi:10.1038/ncomms1386
7. 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. doi:10.1016/j.bbcan.2016.07.004
8. Van Waarde, A., Rybczynska, A. A., Ramakrishnan, N. K., Ishiwata, K., Elsinga, P. H., & Dierckx, R. A. J. O. (2015). Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), 2703–2714. doi:10.1016/j.bbamem.2014.08.022
9. [https://www.researchgate.net/figure/The-Neubauer-chamber-grid\\_fig1\\_256436846](https://www.researchgate.net/figure/The-Neubauer-chamber-grid_fig1_256436846)
10. <http://seogreat.info/96-well-plate-template.html/96-well-plate-template-excel-spreadsheet-collections>
11. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>
12. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147955-SIGMAR1/pathology>
13. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000101856-PGRMC1/pathology>

## Πίνακες:

1. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., & Ruoho, A. E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. Trends in Pharmacological Sciences, 31(12), 557–566. doi:10.1016/j.tips.2010.08.007
2. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99720#sequences>
3. <https://www.uniprot.org/uniprot/O00264>
4. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q5BJF2>
5. [https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/cell\\_list.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm)
6. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>