



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*“Έκφραση των sigma υποδοχέων σε ασθενείς με
καρκίνο του παγκρέατος. “*

*“Expression of sigma receptors in patients with
pancreatic cancer. “*

ΚΟΤΖΙΑΚΟΖΙΔΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Λάρισα 2019

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο.

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Δήμας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζωίδης Γρηγόρης, Επ. καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Δήμα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας καθώς και για την υπομονή και εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Σερέτη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που ήταν πλάι μου σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα κατά την διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. ΠΑΓΚΡΕΑΣ	6
1.1. Ανατομία και φυσιολογία παγκρέατος.....	6
1.2. Εκκριτική λειτουργία της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος.....	7
1.3. Εκκριτική λειτουργία της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος.....	9
2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	10
2.1. Γενικές πληροφορίες.....	10
2.2. Κατηγοριοποίηση όγκων.....	11
2.3. Γενετική βάση του καρκίνου.....	11
2.4. Διαφορές φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.....	13
2.5. Καρκινογόνοι παράγοντες.....	14
2.6. Στάδια καρκινογένεσης.....	16
3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	16
3.1. Στατιστικά στοιχεία.....	16
3.2. Κατηγοριοποίηση παγκρεατικού καρκίνου.....	17
3.3. Παράγοντες κινδύνου.....	17
3.4. Στάδια παγκρεατικού καρκίνου.....	17
3.5. Συμπτώματα.....	18
3.6. Διάγνωση.....	19
3.7. Θεραπεία.....	20
4. SIGMA ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	21
4.1. Γενικές πληροφορίες.....	21
4.2. Δομή και λειτουργία των sigma1 υποδοχέων.....	21
4.3. Ο ρόλος του sigma1 σε διαταραχές του ΚΝΣ.....	22
4.4. Ο ρόλος του sigma1 στον καρκίνο.....	25
4.5. Πληροφορίες για sigma2 υποδοχείς.....	28
4.6. Πληροφορίες για PGRMC1.....	29
4.7. Ο ρόλος του PGRMC1.....	29
4.8. Ο ρόλος του PGRMC1 στον καρκίνο.....	30
4.9. TMEM97 και sigma2 υποδοχείς.....	31
4.10. Δομή και λειτουργία του TMEM97.....	32
4.11. Ο ρόλος του TMEM97 στον καρκίνο.....	32
4.12. Νέα δεδομένα σχετικά με τους sigma2 υποδοχείς.....	33
B. ΣΚΟΠΟΣ	35
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΜΜΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	36
1.1. Συνθήκες καλλιέργειας.....	36
1.2. Ανανέωση θρεπτικού μέσου.....	37
1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	37
1.4. Ανανέωση θρεπτικού μέσου και ανακαλλιέργεια κυττάρων που αναπτύσσονται ως εναιώρημα.....	38
1.5. Καταμέτρηση κυττάρων.....	38
1.6. Εξάπλωση κυττάρων.....	39
1.7. Κατάψυξη κυττάρων.....	39

1.8.	Απόψυξη κυττάρων.....	40
2.	<i>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....</i>	40
2.1.	Παρασκευή πήκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου.....	40
2.2.	Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση.....	41
2.3.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	43
3.	<i>ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (WESTERN BLOTTING).....</i>	43
3.1.	Εξισορρόπηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης.....	44
3.2.	Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη.....	44
3.3.	Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων.....	44
3.4.	Επώαση με πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα.....	45
3.5.	Οπτικοποίηση του σήματος.....	45
3.6.	Απομάκρυνση αντισωμάτων.....	46
4.	<i>ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD.....</i>	46
Δ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
1.	<i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ.....</i>	47
1.1.	Μελέτη της έκφρασης του sigma-1 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	47
1.2.	Μελέτη της έκφρασης των sigma-2 υποδοχέων σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	48
1.3.	Μελέτη της έκφρασης του sigma-1 υποδοχέα σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.....	50
1.4.	Μελέτη της έκφρασης των sigma-2 υποδοχέων σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.....	52
Ε.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
ΣΤ.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι sigma υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αρχικά κατηγοριοποιήθηκαν στους υποδοχείς οπιοειδών ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες διαπιστώθηκε πως δεν ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Μία σειρά μελετών οδήγησε στον διαχωρισμό τους σε sigma-1 και sigma-2 υποδοχείς λόγω της διαφορετικής ικανότητας σύνδεσης τους με διάφορους προσδέτες. Το γονίδιο του sigma-1 υποδοχέα έχει κλωνοποιηθεί ενώ κάτι τέτοιο δεν έχει συμβεί για τον sigma-2 και για το λόγω αυτό έχουν αναπτυχθεί δύο διαφορετικές θεωρίες σχετικά με αυτόν. Η μία θεωρία υποστηρίζει πως ο sigma-2 είναι ο PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) ενώ η άλλη υποστηρίζει πως είναι ο TMEM97 (Transmembrane Protein 97). Οι sigma υποδοχείς έχουν συσχετιστεί με διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις λόγω της εμπλοκής τους σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ειδικότερα, μελέτες υποστηρίζουν την υπερέκφραση αυτών των υποδοχέων σε διάφορους τύπους καρκίνου γεγονός που αποτελεί ένα ενδεικτικό για την μελέτη των υποδοχέων αυτών στον καρκίνο του παγκρέατος. Ο καρκίνος του παγκρέατος συγκαταλέγεται στην κατηγορία των πιο επικίνδυνων και θανατηφόρων μορφών καρκίνου. Για το λόγω αυτό στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των sigma υποδοχέων με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι υποδοχείς αυτοί εμπλέκονται στην ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου. Έτσι λοιπόν, μελετήθηκε η έκφραση των sigma υποδοχέων σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν πως ο sigma-1 έχει μία τάση υπερέκφρασης στον παγκρεατικό καρκίνο ενώ η έκφραση του PGRMC1 και του TMEM97 φαίνεται να μειώνεται ή μην μεταβάλλεται.

ABSTRACT

Sigma receptors are transmembrane proteins that were initially categorized into opioid receptors, however, in recent decades they were found not to be in this class. A number of studies led to their separation into sigma-1 and sigma-2 receptors due to their different binding capabilities with various ligands. The sigma-1 receptor gene has been cloned, but this has not happened for sigma-2 and for this reason two different theories have been developed about it. One theory argues that sigma-2 is PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) while the other claims to be TMEM97 (Transmembrane Protein 97). Sigma receptors have been associated with various physiological and pathological conditions due to their involvement in various signaling pathways. In particular, studies support the overexpression of these receptors in various types of cancer resulting in the study of these receptors in pancreatic cancer. Pancreatic cancer is one of the most dangerous and deadly forms of cancer. Therefore, in this project, protein expression of sigma receptor were studied by the Western blot to determine whether these receptors are involved in the development of pancreatic cancer. Thus, the expression of sigma receptors in pancreatic cancer cell lines as well as in pancreatic cancer patients was studied, with the results suggesting that sigma-1 has an overexpression trend in pancreatic cancer, whereas expression of PGRMC1 and TMEM97 appears to be decreasing or not changing.

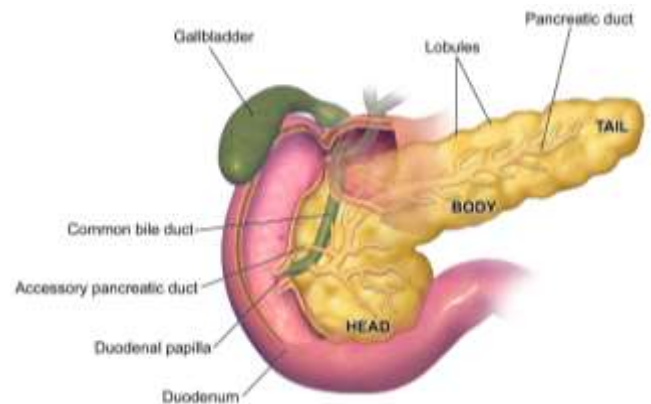
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΠΑΓΚΡΕΑΣ

1.1. Ανατομία και φυσιολογία παγκρέατος

Το πάγκρεας αποτελεί το δεύτερο σε μέγεθος μεικτό αδένιο του γαστρεντερικού συστήματος μετά το ήπαρ. Έχει μέγεθος 13-15cm και το βάρος του κυμαίνεται μεταξύ 65-100gr. Εντοπίζεται πάνω στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, στο επίπεδο του Ο1-Ο2 σπονδύλου. Εκτείνεται σχεδόν οριζοντίως από το δωδεκαδάκτυλο έως την πύλη του σπληνός.

Διαχωρίζεται σύμφωνα με τα μακροσκοπικά του χαρακτηριστικά σε 3 διακριτά μέρη όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1: την κεφαλή που αποτελεί το παχύτερο τμήμα του παγκρέατος και βρίσκεται μέσα στη δωδεκαδακτυλική αγκύλη, το σώμα που αποτελεί το μεσαίο τμήμα του οργάνου και βρίσκεται μπροστά από τη σπονδυλική στήλη και την ουρά που αποτελεί το στενότερο τμήμα και γειτνιάζει με το σπλήνα. Επιπλέον ταξινομείται στην ομάδα των ετεροκρινών αδένων καθώς διαθέτει εξωκρινή αλλά και ενδοκρινή μοίρα. Η εξωκρινής μοίρα αποτελεί το 99% του βάρους του αδένιο ενώ η ενδοκρινής μοίρα το υπόλοιπο 1%.



Εικόνα 1: Ανατομία παγκρέατος. [38]

Το εξωκρινές τμήμα του παγκρέατος διαθέτει εκατομμύρια αδενοκυψέλες, μεγάλους και μικρούς εκφορητικούς πόρους και καλυκοειδή κύτταρα. Οι αδενοκυψέλες επενδύονται με εξωκρινικά αδενικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την έκκριση παγκρεατικών πεπτικών ενζύμων συμβάλλοντας στη διάσπαση πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων και νουκλεϊκών οξέων. Οι αδενοκυψέλες εκβάλλουν αρχικά σε ένα σύστημα μικρών πόρων (εμβόλιμοι πόροι) οι οποίοι σταδιακά συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν μεγάλο παγκρεατικό πόρο που καταλήγει στον πεπτικό σωλήνα και συγκεκριμένα στο δωδεκαδάκτυλο. Οι μεγάλοι και μικροί εκφορητικοί πόροι εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα διττανθρακικού νατρίου με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σύνθετο προϊόν που περιέχει πεπτικά ένζυμα και διττανθρακικό νάτριο που φέρεται μέσω του παγκρεατικού πόρου, ο οποίος συνδέεται με τον χοληδόχο πόρο, αμέσως πριν από την εκβολή του προς το δωδεκαδάκτυλο, με τη θηλή του Vater (φήμα του Vater) που περιβάλλεται από τον σφιγκτήρα του Oddi. Τα καλυκοειδή κύτταρα του αδένιο εκκρίνουν υψηλού μοριακού βάρους όξινες γλυκοπρωτεΐνες, γνωστές ως βλεννίνες. Οι βλεννίνες αφού ενυδατωθούν σχηματίζουν βλέννη η οποία συμβάλλει στη λίπανση, στην ενυδάτωση, στη μηχανική προστασία των κυττάρων και στην αποφυγή παγκρεατικών λοιμώξεων.

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι αδενοκυψέλες αποτελούνται από πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα που φέρουν ένα καλά αναπτυγμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και άφθονα εκκριτικά κοκκία που λειτουργούν ως αποθηκευτικές δεξαμενές εκκρινόμενων πρωτεϊνών που έπειτα από κάποια νευρο-ορμονική διέγερση του οργάνου, απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους μέσω εξωκύτωσης. Τα κύτταρα των παγκρεατικών πόρων είναι και αυτά πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα με σημαντικό βαθμό μορφολογικής ετερογένειας κατά μήκος του δικτύου των πόρων και εξειδικεύονται στη μεταφορά ηλεκτρολυτών μέσω ειδικών μεμβρανικών μεταφορέων.

Το εξωκρινές, όμως, τμήμα του παγκρέατος εκτός από αδενοκυψέλες και πόρους χαρακτηρίζεται και από εκτενή νεύρωση και πολυάριθμα αιμοφόρα αγγεία. Δέχεται μεταγαγγλιακές παρασυμπαθητικές και συμπαθητικές νευρικές ίνες από τις οποίες απελευθερώνονται χολινεργικοί και αδρενεργικοί νευροδιαβιβαστές. Οι νευροδιαβιβαστές συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων των αδενοκυψέλων και των πόρων συνεισφέροντας στην αυτόνομη ρύθμιση της έκκρισης της εξωκρινούς μοίρας του οργάνου. Το εκτεταμένο αγγειακό σύστημα παρέχει οξυγόνο αλλά και θρεπτικές ουσίες στον αδένα καθώς και ορμόνες που ελέγχουν την εκκριτική του λειτουργία.

Αντίθετα, η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από μικρές δέσμες κυττάρων που ονομάζονται νησίδια του Langerhans. Το πάγκρεας του ανθρώπου φέρει 1 έως 2 εκατομμύρια τέτοιων νησιδίων, καθένα από τα οποία έχει διάμετρο περίπου 0,3mm. Τα νησίδια του Langerhans είναι οργανωμένα γύρω από μικρά τριχοειδή στα οποία εκκρίνουν τις ορμόνες τους. Τα νησίδια περιέχουν 3 κύριους τύπους κυττάρων, τα άλφα, τα βήτα και τα δέλτα κύτταρα καθώς και έναν τέταρτο τύπο κυττάρων, τα F κύτταρα τα οποία εντοπίζονται σε σημαντικά μικρότερο αριθμό. Κάθε κυτταρικός τύπος φέρει διακριτά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Τα άλφα κύτταρα αποτελούν περίπου το 25% του συνόλου των κυττάρων και ο ρόλος τους έγκειται στην παραγωγή και έκκριση γλυκαγόνης. Τα βήτα κύτταρα αποτελούν το 60%, εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο κέντρο των νησιδίων και είναι υπεύθυνα για την έκκριση ινσουλίνης και αμυλίνης. Τέλος τα κύτταρα δέλτα αποτελούν το 10% και εκκρίνουν σωματοστατίνη ενώ τα κύτταρα F εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. [1], [2], [3]

1.2. Εκκριτική λειτουργία της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος

Η παρουσία χυμού στο άνω τμήμα του λεπτού εντέρου διεγείρει την έκκριση του παγκρεατικού υγρού, τα χαρακτηριστικά του οποίου καθορίζονται ως ένα βαθμό από το είδος της τροφής που περιέχεται στο χυμό. Το παγκρεατικό υγρό περιέχει μια πληθώρα πεπτικών ενζύμων τα οποία συμμετέχουν στην πέψη των θρεπτικών συστατικών της τροφής ενώ σε αυτό περιέχεται και μεγάλη ποσότητα διττανθρακικών ιόντων τα οποία συμβάλουν στην εξουδετέρωση του όξινου χυμού που μεταφέρεται από τον στόμαχο στο δωδεκαδάκτυλο.

Στα παγκρεατικά ένζυμα που διασπούν μερικώς ή πλήρως τις πρωτεΐνες της τροφής ανήκουν η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η καρβοξυπολυπεπτιδάση, όπου η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη οδηγούν στην παραγωγή πεπτιδίων διαφόρων μεγεθών χωρίς όμως να προκαλούν απελευθέρωση μεμονωμένων αμινοξέων γεγονός το οποίο υφίσταται από την καρβοξυπολυπεπτιδάση. Τα πρωτεολυτικά αυτά ένζυμα συντίθενται στο πάγκρεας ως ζυμογόνα δηλαδή ως ανενεργά προένζυμα τα οποία απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία προκειμένου να μεταβούν στην ενεργή και δραστική τους μορφή. Η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται μόνον μετά την έκκρισή τους στον αυλό του εντέρου με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η καταστροφή του παγκρέατος. Συγκεκριμένα η θρυψίνη παράγεται αρχικά ως θρυψινογόνο (ανενεργή μορφή) στα κύτταρα των αδενοκυψέλων και αφού εκκριθεί στον αυλό του εντέρου υφίσταται τη δράση της εντεροκινάσης με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε θρυψίνη (ενεργή μορφή). Η χυμοθρυψίνη και η καρβοξυπολυπεπτιδάση συντίθενται ως χυμοθρυψινογόνο και προκαρβοξυπολυπεπτιδάση αντίστοιχα τα οποία ενεργοποιούνται αφού υποστούν τη δράση της θρυψίνης.

Οι υδατάνθρακες πέπτονται από τη δράση της παγκρεατικής αμυλάσης η οποία υδρολύει το άμυλο, το γλυκογόνο και πολλούς ακόμα υδατάνθρακες με εξαίρεση την κυτταρίνη οδηγώντας κυρίως στην παραγωγή δισακχαριτών. Τα λιπίδια πέπτονται υπο τη δράση τριών βασικών ενζύμων: της παγκρεατικής λιπάσης, της εστεράσης της χοληστερόλης και της φωσφολιπάσης. Η παγκρεατική λιπάση υδρολύει τα ουδέτερα λίπη προς λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια, η εστεράση της χοληστερόλης υδρολύει τους εστέρες χοληστερόλης ενώ η

φωσφολιπάση ειδικεύεται στην απόσπαση λιπαρών οξέων από φωσφολιπίδια. Τα νουκλειικά οξέα διασπώνται από ειδικές νουκλεάσες οι οποίες υδρολύουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς οδηγώντας στην απελευθέρωση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων. Τέλος, στην κατηγορία των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος ανήκουν η γλυκοπρωτεΐνη 2 (GP2), η λιθοσταθίνη και η πρωτεΐνη που συνδέεται με την παγκρεατίτιδα.

Η έκκριση των παραπάνω πεπτικών ενζύμων διεγείρεται μέσω της ακετυλοχολίνης και της χολοκυστοκινίνης που στοχεύουν τα κύτταρα των αδενοκυψέλων. Η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται κυρίως από τις νευρικές απολήξεις των παρασυμπαθητικών ινών του πνευμονογαστρικού νεύρου ενώ η χολοκυστοκινίνη από τα Ι-κύτταρα του βλεννογόνου του δωδεκαδακτύλου και της άνω μοίρας της νήστιδας. Τα δύο αυτά μόρια επάγουν την έκκριση των πεπτικών ενζύμων από την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος χωρίς όμως να διεγείρουν την έκκριση νερού και διττανθρακικών ιόντων.

Η έκκριση νερού και διττανθρακικών ιόντων διεγείρεται από την εκκριματίνη, ένα πολυπεπτίδιο 27 αμινοξικών καταλοίπων το οποίο απελευθερώνεται από τα S κύτταρα του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας ως απόκριση στην παρουσία όξινου χυμού στο δωδεκαδάκτυλο. Η εκκριματίνη διεγείρει τα κύτταρα των σωληναρίων αλλά όχι των αδενοκυψέλων του παγκρέατος με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται μόνο έκκριση νερού και διττανθρακικών ιόντων. Τα δύο αυτά συστατικά του παγκρεατικού εκκρίματος παράγονται και εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των σωληναρίων και των πόρων του παγκρέατος στοχεύοντας κατά κύριο λόγο στην εξουδετέρωση του υδροχλωρικού οξέος που φέρεται από το στόμαχο προς το δωδεκαδάκτυλο. [1], [2], [3]

1.3. Εκκριτική λειτουργία της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος

Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος είναι υπεύθυνη για την έκκριση τριών εκ των σημαντικότερων ορμονών του ανθρώπου, της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και της σωματοστατίνης. Η σύνθεση αλλά και η έκκριση ινσουλίνης πραγματοποιείται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος και ρυθμίζεται από τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος. Σε περιόδους νηστείας, η έκκριση ινσουλίνης είναι μειωμένη ενώ σε περιόδους σίτισης, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης του αίματος διεγείρουν τα β-κύτταρα προκαλώντας την παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης. Κατά τη λήψη τροφής, η έκκριση ινσουλίνης ρυθμίζεται και μέσω του αυτόνομου νευρικού συστήματος καθώς τα νησίδια δέχονται πλούσια συμπαθητική αλλά και παρασυμπαθητική νευρώση. Οι μετασυναπτικοί συμπαθητικοί νευρώνες του παγκρέατος εκκρίνουν νορεπινεφρίνη, η οποία διεγείρει τους α-αδρενεργικούς υποδοχείς αναστέλλοντας την έκκριση ινσουλίνης. Αντίθετα οι παρασυμπαθητικοί νευρώνες του οργάνου, απελευθερώνουν ακετυλοχολίνη, διεγείροντας την έκκρισή της. Τέλος η ρύθμιση της έκκρισης μπορεί να συμβεί και μέσω της χολοκυστοκινίνης, του γαστρικού ανασταλτικού πεπτιδίου (GIP) και του γλυκαγονοειδούς πεπτιδίου (GLP-1). Η ινσουλίνη διαθέτει 5 κύριες δράσεις: α) προάγει την πρόσληψη γλυκόζης και τη σύνθεση γλυκογόνου, β) διεγείρει τη γλυκόλυση και την οξείδωση των υδατανθράκων, γ) προωθεί τη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπών, δ) ευνοεί την εστεροποίηση και την αποθήκευση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και ε) αναστέλλει τη γλυκογονόλυση, τη γλυκονεογένεση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

Η γλυκαγόνη, μία ακόμη ορμόνη του παγκρέατος, είναι ένα πολυπεπτίδιο 31 αμινοξικών καταλοίπων που συντίθεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans. Η έκκριση της ορμόνης επάγεται από τη λήψη πρωτεϊνών ενώ αναστέλλεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης. Μετά την έκκρισή της η γλυκαγόνη δρα κυρίως στο ήπαρ όπου ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων. Συγκεκριμένα σε περιόδους νηστείας όπου η συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος είναι χαμηλή, η γλυκαγόνη διεγείρει το ήπαρ με αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκόζης και την εξασφάλιση των ενεργειακών αναγκών του εγκεφάλου και των

άλλων ιστών. Αντίθετα σε περιόδους σίτισης, η έκκριση ινσουλίνης αναστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ηπατική παραγωγή γλυκόζης. Εκτός από τις δράσεις της στον ηπατικό μεταβολισμό, η γλυκαγόνη έχει και εξωηπατικές δράσεις καθώς επιταχύνει τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό και την πρωτεόλυση στους μύες.

Εκτός από την ινσουλίνη και τη γλυκαγόνη τα νησίδια του παγκρέατος και συγκεκριμένα τα δ-κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν σωματοστατίνη, ένα πολυπεπτίδιο 14 ή 28 αμινοξικών καταλοίπων. Η σωματοστατίνη δεν παράγεται μόνο από τα νησίδια του παγκρέατος αλλά και από τον υποθάλαμο και τα D κύτταρα του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου. Συγκεκριμένα στον υποθάλαμο κυριαρχεί η μορφή των 14 αμινοξικών καταλοίπων που ονομάζεται ανασταλτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης ενώ από το πάγκρεας παράγεται κυρίως η μορφή των 28 αμινοξικών καταλοίπων. Έτσι λοιπόν, η ορμόνη αυτή υφίσταται σε 2 μορφές όπου η μορφή των 14 αμινοξικών καταλοίπων αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της μορφής των 28 αμινοξικών καταλοίπων. Η ορμόνη διαθέτει ποικίλες δράσεις αναστέλλοντας την έκκριση πολλών άλλων ορμονών μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η αυξητική ορμόνη, η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη, το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP) και η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη. Επιπρόσθετα, περιορίζει την κινητικότητα του στομάχου, του δωδεκαδακτύλου και της χοληδόχου κύστης και ελαττώνει την έκκριση αλλά και την απορρόφηση του γαστρεντερικού σωλήνα. [1], [2], [3]

2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.1. Γενικές πληροφορίες

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο θανατηφόρες ασθένειες της εποχής μας κατέχοντας τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Το 2018 εκτιμάται πως νόσησαν από καρκίνο περίπου 17 εκατομμύρια άνθρωποι ενώ σημειώθηκαν περίπου 9,6 εκατομμύρια θάνατοι εξαιτίας κάποιας μορφής καρκίνου. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες διαφαίνεται πως οι συχνότερες μορφές καρκίνου είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού (για τις γυναίκες), του προστάτη, του εντέρου και του δέρματος. [4]

Ως καρκίνος χαρακτηρίζεται μια ετερογενής ομάδα ασθενειών, η οποία περιλαμβάνει περισσότερους από 100 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Κάθε τύπος καρκίνου έχει διαφορετική παθολογία, διαφορετική απόκριση σε θεραπευτικά μέσα αλλά και διαφορετική επικινδυνότητα. Ο καρκίνος μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε σημείο του σώματος, διαταράσσοντας τη σωστή και αρμονική λειτουργία του. Η ανάπτυξη του καρκίνου ξεκινά από ένα κύτταρο ή μια ομάδα κυττάρων τα οποία έχουν απορρυθμιστεί με αποτέλεσμα να μην αποκρίνονται στα ερεθίσματα που δέχονται και ελέγχουν φυσιολογικά την τύχη όλων των κυττάρων του σώματος.

Η τύχη των κυττάρων καθορίζεται σε μοριακό επίπεδο από την ρύθμιση και έκφραση γονιδίων που συχνά τυγχάνει να υφίστανται βλάβες οι οποίες εάν δεν αποκατασταθούν μπορούν να τροποποιήσουν ή να καταστείλουν τη λειτουργία των γονιδίων και κατά συνέπεια να διαταράξουν την ομαλή λειτουργία των κυττάρων. Οι βλάβες που συσσωρεύονται στα γονίδια χαρακτηρίζονται ως μεταλλάξεις και μπορούν να προκληθούν από ποικίλους παράγοντες. Φυσιολογικά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται με σκοπό την αντικατάσταση γερασμένων ή δυσλειτουργικών κυττάρων τα οποία οδηγούνται σε απόπτωση δηλαδή σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο τυχαίες μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο DNA των κυττάρων και αφορούν διάφορα ρυθμιστικά συστήματα σε συνδυασμό με την ανικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώσουν τέτοιου είδους βλάβες, οδηγούν τα κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Ο

ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό μιας άμορφης μάζας κυττάρων η οποία σταδιακά μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο. Κάθε μάζα κυττάρων ονομάζεται όγκος αλλά ένας όγκος μπορεί να είναι καλοήθης, δηλαδή να μην διεισδύει σε γειτονικούς ιστούς, ή να είναι κακοήθης και να έχει δυνατότητα διείσδυσης σε παρακείμενους ιστούς και όργανα μέσω κυκλοφορικού ή λεμφικού συστήματος. Μόνο οι κακοήθεις όγκοι κατατάσσονται στις περιπτώσεις καρκίνου. Οι μάζες κυττάρων τις περισσότερες φορές σχηματίζουν συμπαγείς όγκους με εξαίρεση την περίπτωση του καρκίνου του αίματος (λευχαιμία). Η εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων μέσα στο σώμα του ασθενούς ονομάζεται μετάσταση. [5], [6]

2.2. Κατηγοριοποίηση όγκων

Οι όγκοι, είτε είναι καλοήθεις είτε κακοήθεις κατηγοριοποιούνται σε 3 κύριες κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων από τα οποία έχουν προέλθει. Έτσι λοιπόν οι όγκοι διακρίνονται σε:

1. Καρκινώματα, τα οποία αποτελούν το 90% των περιπτώσεων καρκίνου και είναι κακοήθεις όγκοι επιθηλιακών κυττάρων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το αδenoκαρκίνωμα, το Squamous cell carcinoma, το μεταβατικό κυτταρικό καρκίνωμα (Transitional cell carcinoma) και το Clear cell carcinoma.

2. Σαρκώματα, που είναι σπανιότερες μορφές καρκίνου και προέρχονται από κύτταρα συνδετικού ιστού μυών, οστών, χόνδρων ή ινωδών ιστών. Σε έναν περαιτέρω διαχωρισμό αυτής της κατηγορίας ανήκουν το σάρκωμα του μαλακού ιστού και το οστεοσάρκωμα.

3. Λευχαιμίες και λεμφώματα, τα οποία αποτελούν το 8% των περιστατικών καρκίνου. Οι λευχαιμίες προέρχονται από προσβολή κυττάρων του αίματος ενώ τα λεμφώματα από προσβολή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. [6]

2.3. Γενετική βάση του καρκίνου

Ο καρκίνος στην πλειοψηφία του αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, ένα νόσημα που για να εκδηλωθεί συνηγορούν γενετικοί αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η γενετική βάση του καρκίνου σχετίζεται με μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε πρωτο-ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια αλλά και γονίδια μεταλλάκτες. Μία μόνο μετάλλαξη σε κάποιο από τα παραπάνω γονίδια συνήθως δεν είναι ικανή να προκαλέσει την εμφάνιση νεοπλασιών αλλά, για να συμβεί αυτό απαιτείται ένας συνδυασμός μεταλλάξεων που θα καταφέρουν να διαταράξουν τον αυστηρό έλεγχο που υπόκεινται τα κύτταρα. Τέτοιες μεταλλάξεις όταν συμβαίνουν σε γαμετικά κύτταρα μπορούν να μεταβιβαστούν στους απογόνους, καθορίζοντας έτσι την κληρονομικότητα της νόσου. Η μετατροπή, λοιπόν, ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό απαιτεί μια σειρά γεγονότων που οδηγούν σε αλλαγές του γενετικού υποβάθρου των κυττάρων με αποτέλεσμα την απορρύθμισή τους και την υιοθέτηση νέων ιδιοτήτων. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως μετασχηματισμός κυττάρων.

Όπως προαναφέρθηκε τρεις είναι οι κατηγορίες γονιδίων που η απορρύθμισή τους οδηγεί στο μετασχηματισμό των κυττάρων. Η πρώτη κατηγορία αφορά πρωτο-ογκογονίδια, δηλαδή γονίδια που εντοπίζονται και εκφράζονται σε φυσιολογικά κύτταρα υπό ένα αυστηρό πρόγραμμα ελέγχου. Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 100 πρωτο-ογκογονίδια τα οποία αποτελούν θετικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου καθώς η έκφρασή τους επάγει την κυτταρική αύξηση και την κυτταρική διαίρεση. Τα πρωτο-ογκογονίδια αυτά κωδικοποιούν διάφορους αυξητικούς παράγοντες, πρωτεϊνικές κινάσες αλλά και μεμβρανικές πρωτεΐνες G. Μια μετάλλαξη σε ένα πρωτο-ογκογονίδιο είναι ικανή να το μετατρέψει σε ογκογονίδιο το οποίο δεν υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο με αποτέλεσμα να επάγει συνεχώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στα πρωτο-ογκογονίδια που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες ανήκουν τα γονίδια *sis* και *int-2*, σε αυτά που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες ανήκουν τα γονίδια *src*, *fgf*, *fps/fes*, *kit*, *pim-1* και *mos* ενώ σε αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες G ανήκουν τα γονίδια *H-ras*, *K-ras* και *gsp*. [9]

Για παράδειγμα στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Ras έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε διάφορους τύπους καρκίνου. Φυσιολογικά η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras επιτυγχάνεται έπειτα από πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα EGF στον υποδοχέα του. Η ενεργή Ras διεγείρει τον καταρράκτη των MAP κινασών με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK και την μετακίνησή της στον πυρήνα όπου εκεί επάγει την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο Elk-1. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες επάγουν στη συνέχεια τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, μεταλλάξεις μπορούν να μετατρέψουν το γονίδιο *ras* σε ογκογονίδιο. Το προϊόν ενός τέτοιου μεταλλαγμένου γονιδίου μπορεί να αδυνατεί να υδρολύσει το GTP σε GDP και έτσι η πρωτεΐνη να παραμένει στην ενεργή της διαμόρφωση, επάγοντας συνεχώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Οι πιο κοινές μετατροπές που συμβαίνουν σε πρωτο-ογκογονίδια και τα μετατρέπουν σε ογκογονίδια είναι:

1. Σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν την αντικατάσταση ζευγών βάσεων. Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις μπορεί να εντοπίζονται είτε στην κωδική περιοχή του πρωτο-ογκογονιδίου είτε σε ρυθμιστικές περιοχές του όπως είναι ο υποκινητής ή ο ενισχυτής του. Τέτοιες μεταλλαγές μπορεί να αυξήσουν την ενεργότητα του γονιδιακού προϊόντος ή την γονιδιακή έκφραση του γενετικού αυτού τόπου. Στην πρώτη περίπτωση τα επίπεδα του γονιδιακού προϊόντος δεν μεταβάλλονται ενώ στη δεύτερη περίπτωση παρατηρείται σημαντική αύξηση.

2. Ελλείμματα τμημάτων της κωδικής περιοχής του πρωτο-ογκογονιδίου ή ρυθμιστικών αλληλουχιών ενός τέτοιου γονιδίου. Αυτού του είδους οι μεταλλαγές επηρεάζουν ποσοτικά αλλά και ποιοτικά τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το ογκογονίδιο *myc* που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το *myc* στη φυσιολογική του μορφή αποτελείται από τρία εξόνια και δύο ιντρόνια ενώ στα καρκινικά κύτταρα συχνά εντοπίζεται με ελλείμματα που αφορούν το πρώτο του εξόνιο και το πρώτο του ιντρόνιο.

3. Μεταβολές του αριθμού των αντιγράφων ενός πρωτο-ογκογονιδίου, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πρωτο-ογκογονίδια με εκατοντάδες φορές μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων σε σχέση με τον αριθμό αντιγράφων τους σε φυσιολογικά κύτταρα. Η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα του προϊόντος του και άρα σε αδιάκοπη διέγερση του κυτταρικού κύκλου και σε εμφάνιση νεοπλασμάτων. [9]

Η δεύτερη κατηγορία γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με την μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η φυσιολογική λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η αναστολή της ανάπτυξης και του κυτταρικού κύκλου γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό καθώς με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στα κύτταρα να επιδιορθώσουν τυχόν βλάβες που εντοπίζονται στο DNA τους. Εάν οι βλάβες αυτές επιδιορθωθούν τότε ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται ενώ εάν δεν υπάρχει τέτοια δυνατότητα το κύτταρο οδηγείται σε καταστροφή προκειμένου να μην παραχθούν κύτταρα τα οποία θα εξελιχθούν σε καρκινικά. Έτσι λοιπόν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια λειτουργούν ως δικλείδες ασφαλείας σε κομβικά σημεία του κυτταρικού κύκλου επιτρέποντας ή αναστέλλοντας την πρόοδό του. Μεταλλαγές που συμβαίνουν σε αυτά τα γονίδια μπορούν να οδηγήσουν στην απενεργοποίηση ή στην εξάλειψή τους με αποτέλεσμα να αίρεται η ανασταλτική τους δράση και τα κύτταρα να διαιρούνται αδιάκοπα ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι βλαβών. Μερικά γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι τα *apc*, *brca1*, *brca2*, *dcc*, *nf1*, *nf2*, *p16*, *rb*, *tp53*, *vhl* και *wt1* που έχει βρεθεί πως σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του ήπατος, του παγκρέατος αλλά και του οφθαλμού.

Η τρίτη κατηγορία γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκίνου είναι τα γονίδια-μεταλλάκτες. Τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή αλλά και στην επιδιόρθωση του DNA,

εξασφαλίζοντας έτσι την ακεραιότητα των κυτταρικών γονιδιωμάτων. Μεταλλάξεις που προκύπτουν σε αυτά έχουν ως συνέπεια την δυσλειτουργία τους ή την απενεργοποίησή τους γεγονός που αυξάνει τη συχνότητα μεταλλαγής άλλων γονιδίων εξαιτίας της αυξημένης συχνότητας λαθών κατά την αντιγραφή του DNA. Έτσι λοιπόν συσσωρεύονται ολοένα και περισσότερες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των νέων κυττάρων, τα οποία σταδιακά μετατρέπονται σε καρκινικά. [9]

2.4 Διαφορές καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό από τα φυσιολογικά καθώς στο γονιδίωμά τους συσσωρεύουν μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν και διαφοροποιούν τις λειτουργίες τους, προσδίδοντάς τους νέες ιδιότητες. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής επιβίωσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Έτσι λοιπόν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών (μη-καρκινικών) κυττάρων.

1. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται αδιάκοπα, γεγονός το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί ακόμα και σε συνθήκες καλλιέργειας. Τα φυσιολογικά κύτταρα σε συνθήκες καλλιέργειας, διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό τους όταν φτάσουν στη μέγιστη δυνατή πυκνότητα, η οποία καθορίζεται κυρίως από την διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων και εισέρχονται στη συνέχεια στη φάση ηρεμίας G_0 . Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα δεν ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα που τους ωθούν στη φάση G_0 με αποτέλεσμα να συνεχίζουν την ανάπτυξή τους ανεξάρτητα από την πυκνότητά τους και τη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων. Η ιδιότητά τους αυτή αιτιολογείται και από το ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μειωμένες απαιτήσεις εξωκυττάρων αυξητικών παραγόντων με αποτέλεσμα να συνεχίζουν τον κυτταρικό τους κύκλο ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα αυξητικών παραγόντων. Οι μειωμένες απαιτήσεις τους σχετίζονται με το ότι τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν τους αυξητικούς παράγοντες που χρειάζονται προκειμένου να διατηρούν συνεχώς ενεργή τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού τους. Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από ένα καρκινικό κύτταρο δρουν αυτοκρινώς, δηλαδή προσδένονται σε υποδοχείς και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια του ίδιου κυττάρου. Επίσης η μειωμένη εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων από αυξητικούς παράγοντες οφείλεται ορισμένες φορές σε ανωμαλίες που παρατηρούνται σε στοιχεία σηματοδοτικών μονοπατιών όπως σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων οι οποίοι παραμένουν ενεργοί ακόμα και απουσία προσδέματος.
2. Ο αέναος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ανικανότητα διαφοροποίησής τους. Φυσιολογικά η διαφοροποίηση των κυττάρων οδηγεί σε διακοπή του πολλαπλασιασμού τους.
3. Η μεγάλη διάρκεια ζωής των καρκινικών κυττάρων μεταξύ άλλων σχετίζεται και με τη ικανότητά τους να μην υπόκεινται στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) ακόμα και αν το γονιδίωμά τους έχει υποστεί βλάβες. Η πρόκληση βλαβών στο DNA των μη καρκινικών κυττάρων ενεργοποιεί αρχικά τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων αυτών και σε περίπτωση που η επιδιόρθωση των βλαβών είναι αδύνατη, τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό αιτιολογεί και την αναποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας και των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, που προκαλούν βλάβες στο DNA, να οδηγήσουν τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο.
4. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Διαθέτουν διαφορετικό σχήμα και μέγεθος καθώς και μεγαλύτερο πυρήνα ενώ επιδέχονται περισσότερες αριθμητικές και μορφολογικές ανωμαλίες στο γενετικό τους υλικό.
5. Τα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, χαρακτηρίζονται από μειωμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών κυττάρων αλλά και μεταξύ καρκινικών κυττάρων και εξωκυττάρου

στρώματος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης μορίων κυτταρικής πρόσφυσης όπως η E-καντχερίνη που είναι μια πρωτεΐνη που συμβάλλει στην πρόσφυση επιθηλιακών κυττάρων. Η μειωμένη όμως πρόσφυση των καρκινικών κυττάρων είναι άμεσα σχετιζόμενη και με τη δημιουργία μεταστάσεων καθώς τα καρκινικά κύτταρα αποσπώνται με ευκολία από την αρχική τους εστία και μεταφέρονται σε παρακείμενους ή απομακρυσμένους ιστούς.

6. Η μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται επίσης και με την ικανότητά τους να εκκρίνουν πρωτεάσες που πέπτουν συστατικά του εξωκυττάρου στρώματος, διευκολύνοντας έτσι τη διείσδυσή τους σε παρακείμενους ιστούς, μία ικανότητα η οποία εκλείπει από τα φυσιολογικά κύτταρα.
7. Ένα χαρακτηριστικό προτέρημα των καρκινικά κύτταρα είναι η δυνατότητα αγγειογένεσης. Τα καρκινικά κύτταρα επάγουν το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων μέσω των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνουν με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η συνεχής παροχή των διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. [6], [7], [8]
8. Τα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν το ένζυμο τελομεράση, η οποία συμβάλλει στη διατήρηση των άκρων των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων (τελομερή) και προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα τη δυνατότητα αντιγραφής του DNA τους χωρίς περιορισμούς. Αναλυτικότερα, κατά τη διάρκεια διαδοχικών κυτταρικών κύκλων το μήκος των τελομερών βραχύνεται με αποτέλεσμα τα χρωμοσώματα σταδιακά να αλλοιώνονται και να διακόπτεται η κυτταρική διαίρεση. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην απουσία της τελομεράσης από τα φυσιολογικά κύτταρα με εξαίρεση τα κύτταρα της γαμετικής σειράς και τα βλαστοκύτταρα. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα επανενεργοποιούν την τελομεράση, εξασφαλίζοντας έτσι τη διατήρηση του μήκους των χρωμοσωμάτων τους. [9]
9. Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να καλύψουν τις αυξημένες ενεργειακές τους ανάγκες τροποποιούν τον ενεργειακό μεταβολισμό τους. Αναλυτικότερα, στα σημεία ανάπτυξης των όγκων συσσωρεύεται ένας μεγάλος αριθμός καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα στην περιοχή αυτή να υπάρχει σημαντική έλλειψη θρεπτικών συστατικών, υποξικές συνθήκες και αυξημένος αριθμός μεταβολικών παραπροϊόντων. Έτσι λοιπόν τα καρκινικά κύτταρα επαναπρογραμματίζουν τον ενεργειακό τους μεταβολισμό και αντί για οξειδωτική φωσφορυλίωση επιτελούν γλυκόλυση. Όμως η γλυκόλυση έχει χαμηλότερη απόδοση σε ATP συγκριτικά με την οξειδωτική φωσφορυλίωση και για το λόγο αυτό τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την πρόσληψη γλυκόζης, αυξάνοντας τον αριθμό των μεταφορέων γλυκόζης (π.χ. GLUT1). Με αυτόν τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα αντισταθμίζουν την παραγωγή ATP.
10. Μια ακόμα ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων που τα κάνει να ξεχωρίζουν και να πλεονεκτούν έναντι των φυσιολογικών, είναι η ικανότητά τους να ξεγελούν το ανοσοποιητικό σύστημα προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους αλλά και να το χρησιμοποιούν προς όφελός τους. Το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της φλεγμονής επιδιώκει την εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων. Η φλεγμονή όμως περιλαμβάνει τη συσσώρευση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, μιας πληθώρας σηματοδοτικών μορίων (π.χ. αυξητικών παραγόντων), ενζύμων αλλά και δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη μετάσταση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. [6], [7], [8]

2.5 Καρκινογόνοι παράγοντες

In vitro και *in vivo* μελέτες έχουν υποδείξει την καρκινογόνο δράση διαφόρων ουσιών, ακτινοβολιών αλλά και ιών. Οι ουσίες που επάγουν την ανάπτυξη καρκίνου ονομάζονται καρκινογόνα και σε αυτές συγκαταλέγονται η αφλατοξίνη που παράγεται από μύκητες και προκαλεί καρκίνο του ήπατος, το βενζο(α)πυρένιο, η διμεθυλονιτροζαμίνη και οι ενώσεις νικελίου που αποτελούν συστατικά του καπνού του τσιγάρου και είναι υπεύθυνα για την πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα, της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγα, του φάρυγγα και του οισοφάγου. Στην κατηγορία των καρκινογόνων ακτινοβολιών ανήκει η

υπεριώδης ακτινοβολία που ευθύνεται για την εμφάνιση καρκίνου του δέρματος, ενώ στην περίπτωση των ιών (ογκογόνοι ιοί ή ογκοϊοί) ανήκουν οι ιοί της ηπατίτιδας Β και C, οι ιοί των θηλωμάτων του ανθρώπου, ο ιός Epstein-Barr και πολλοί άλλοι. Η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ουσίες αλλά και πολλοί ιοί έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση καρκίνου καθώς έχει αποδειχθεί πως καταστρέφουν το DNA, προκαλούν μεταλλάξεις ή επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων συμβάλλοντας στην ανάπτυξη όγκων.

Αναλυτικότερα, διακρίνονται δύο κατηγορίες καρκινογόνων, τα άμεσα καρκινογόνα και τα προκαρκινογόνα. Τα άμεσα καρκινογόνα είναι χημικές ενώσεις που προσδέονται στο DNA και προκαλούν βλάβες σε αυτό ενώ τα προκαρκινογόνα προκειμένου να ασκήσουν την καρκινογόνο δράση τους πρέπει να τροποποιηθούν με τη βοήθεια κυτταρικών ενζύμων που φυσιολογικά συμμετέχουν σε αντιδράσεις υδρόλυσης, οξειδωσης ή αναγωγής.

Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, όπως προαναφέρθηκε, είναι δυνατόν να προκληθεί έπειτα από τη μόλυνσή του από κάποιο ογκογόνο ιό. Οι ιοί αυτοί μπορεί να έχουν ως γονιδίωμα RNA ή DNA και συνεπώς προκαλούν με διαφορετικό μηχανισμό την ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Όλοι οι ογκογόνοι ιοί RNA ανήκουν στην κατηγορία των ρετροϊών και φέρουν στο γονιδίωμά τους, ογκογονίδια τα οποία αποτελούν τροποποιημένες μορφές κυτταρικών γονιδίων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ογκογονίδιο v-sis που αποτελεί τροποποιημένη μορφή της αλυσίδας Β του αυξητικού παράγοντα που παράγεται από τα αιμοπετάλια των θηλαστικών (PDGF). Μερικοί ρετροϊοί είναι ο ιός του σαρκώματος του Rous, ο ιός της λευχαιμίας των αιλουροειδών, ο ογκογόνος ιός του μαστικού αδένου των ποντικών και ο ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV-1). Οι ρετροϊοί που προκαλούν καρκίνο χαρακτηρίζονται ως μεταγωγί ρετροϊοί και δημιουργούνται με τον εξής τρόπο: Αρχικά ένας ρετροϊός μολύνει ένα φυσιολογικό κύτταρο και αντιγράφει το γεννητικό του υλικό με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. Έτσι παράγεται ένα μόριο cDNA, το οποίο μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA και ονομάζεται προϊικό DNA. Το προϊικό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή με τυχαίο τρόπο και ακολουθεί η μεταγραφή του με τη βοήθεια του μεταγραφικού μηχανισμού του ξενιστή. Έτσι παράγονται νέα ιικά RNA τα οποία πακετάρονται στο εσωτερικό νέων ιικών σωματίων τα οποία μπορούν να εξέλθουν από το κύτταρο ξενιστή και να μολύνουν άλλα γειτονικά κύτταρα. Όπως προαναφέρθηκε η ενσωμάτωση του προϊικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή είναι τυχαία με αποτέλεσμα ορισμένες φορές η ενσωμάτωση αυτή να πραγματοποιείται δίπλα από κάποιο πρωτο-ογκογονίδιο του ξενιστή. Επίσης κατά τη διαδικασία της ενσωμάτωσης, ιικά γονίδια χάνονται και τη θέση τους λαμβάνουν γειτονικά γονίδια του ξενιστή. Με αυτόν τον τρόπο παράγονται ιοί που διαθέτουν στο γονιδίωμά τους κάποιο κυτταρικό γονίδιο. Όταν το γονίδιο αυτό είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο τότε οι ιοί ονομάζονται μεταγωγί ρετροϊοί καθώς κατά τη μόλυνση νέων κυττάρων προκαλούν υψηλή έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου που έχουν προσλάβει από τον ξενιστή, προκαλώντας τελικά ογκογένεση.

Από την άλλη πλευρά οι ογκογόνοι ιοί DNA καταφέρνουν να προκαλούν καρκίνο λειτουργώντας με έναν τελείως διαφορετικό μηχανισμό. Οι ιοί αυτοί ολοκληρώνουν τον βιολογικό τους κύκλο εκφράζοντας μία πρωτεΐνη που επάγει την αντιγραφή του γονιδιώματος του κυττάρου ξενιστή. Έτσι ο ιός χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του ξενιστή προκειμένου να συνθέσει τα συστατικά που του είναι απαραίτητα για τη συγκρότηση νέων ιοσωματίων. Παρόλα αυτά ορισμένοι ιοί δεν ακολουθούν τον παραπάνω μηχανισμό δράσης αλλά ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή με αποτέλεσμα να εκφράζεται συνεχώς η πρωτεΐνη που επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και έτσι το κύτταρο ξενιστής να πολλαπλασιάζεται αδιάκοπα. Στην κατηγορία των ογκογόνων ιών DNA ανήκουν ορισμένοι ιοί των θηλωμάτων που προκαλούν καλοήθεις όγκους (ελιές και όζους) αλλά και οι ιοί HPV-16 και HPV-18 που προκαλούν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. [6], [9]

2.6 Στάδια καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε μετατροπή των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια και σε αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ο συνδυασμός πολλών τέτοιων γενετικών αλλαγών συμβάλει στην απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της κυτταρικής επιβίωσης. Η καρκινογένεση εξελίσσεται μέσα από 4 διακριτά στάδια που είναι τα εξής:

1. Το στάδιο της έναρξης, κατά το οποίο συμβαίνουν γενετικές τροποποιήσεις δηλαδή μεταλλάξεις σε γονίδια που είναι κρίσιμα για τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι τυχαία γεγονότα, να συμβαίνουν δηλαδή αυθόρμητα ή να οφείλονται στην έκθεση σε κάποιο μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Οι γενετικές αυτές τροποποιήσεις οδηγούν τελικά σε απορρύθμιση κομβικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν την ομαλή λειτουργία των κυττάρων, οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων.

2. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της προώθησης όπου από το αρχικό μεταλλαγμένο κύτταρο προκύπτουν πολλά νέα θυγατρικά κύτταρα τα οποία δημιουργούν μία κυτταρική μάζα που ονομάζεται υπερπλασία. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα εξακολουθούν να έχουν μια φυσιολογική εμφάνιση.

3. Έπειτα παρατηρείται το στάδιο της εξέλιξης όπου συμβαίνουν ακόμα περισσότερες γενετικές και φαινοτυπικές μεταβολές στα κύτταρα. Το μέγεθος του όγκου αυξάνεται δραματικά και τα κύτταρα σταδιακά αποκτούν διηθητικές και μεταστατικές ικανότητες. Στο στάδιο αυτό ο όγκος χαρακτηρίζεται ως δυσπλασία καθώς τα κύτταρα παύουν πλέον να μοιάζουν με φυσιολογικά και έχουν πλήρως απορρυθμιστεί. Σε περίπτωση που τα δυσπλαστικά κύτταρα αρχίζουν να εξαπλώνονται στη γύρω περιοχή του ιστού χωρίς όμως να μεταναστεύουν απομακρυσμένους ιστούς ή όργανα, χαρακτηρίζονται πλέον ως καρκίνωμα *in situ*.

4. Το τελικό στάδιο της καρκινογένεσης είναι το στάδιο της μετάστασης όπου τα καρκινικά κύτταρα από την αρχική τους θέση μεταναστεύουν σε άλλα σημεία του σώματος μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος και στην περίπτωση αυτή έχουμε τη λεγόμενη κακοήθεια. [10],[11]

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

3.1. Στατιστικά στοιχεία

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την 4^η αιτία θανάτου από καρκίνο. Κατατάσσεται μεταξύ των πιο θανατηφόρων καρκίνων, με ποσοστό θνησιμότητας σημαντικά υψηλό καθώς το ποσοστό επιβίωσης κυμαίνεται περί τα 5 έτη στο 5% του πάσχοντα πληθυσμού. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 2018, διαγνώστηκαν με παγκρεατικό καρκίνο 55.440 άτομα εκ των οποίων 29.200 ήταν άνδρες ενώ 26.240 ήταν γυναίκες. Το ίδιο έτος 44.330 άτομα πέθαναν από τη νόσο αυτή. Υπολογίζεται πως ο καρκίνος του παγκρέατος στις Ηνωμένες Πολιτείες αποτελεί το 3% των καρκίνων ενώ 7% των θανάτων οφείλονται σε κάποιο είδος καρκίνου. Στην Ευρώπη, το 2012, διαπιστώθηκε πως 1.333.362 άτομα πέθαναν από κάποιο είδος καρκίνου μεταξύ των οποίων τα περισσότερα άτομα έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Ειδικότερα στην περίπτωση των ανδρών, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την 1^η αιτία θανάτου από καρκίνο, ακολουθεί ο καρκίνος του παχέος εντέρου (2^η αιτία θανάτου), ο καρκίνος του προστάτη (3^η αιτία θανάτου) ενώ στην 4^η αιτία θανάτου συγκαταλέγεται ο καρκίνος του παγκρέατος. Στην περίπτωση των γυναικών την πρώτη θέση κατέχει ο καρκίνος του μαστού, ακολουθεί ο καρκίνος του πνεύμονα (2^η αιτία θανάτου), ο καρκίνος του παχέος εντέρου (3^η αιτία θανάτου) και ο καρκίνος του παγκρέατος (4^η αιτία θανάτου). Αναμένεται ότι ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του παγκρέατος για το έτος 2018 θα παραμείνει σχετικά σταθερός για τους άνδρες ενώ για τις γυναίκες αναμένεται αύξηση της τάξης του 2,8%. Διαπιστώθηκε επίσης, πως ο καρκίνος του παγκρέατος είναι συνηθέστερος στους άνδρες και εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 45 ετών. [12], [13]

3.2. Κατηγοριοποίηση παγκρεατικού καρκίνου

Ο καρκίνος του παγκρέατος διαχωρίζεται σε 2 κατηγορίες ανάλογα με το τμήμα του οργάνου που προσβάλλεται: α) στον καρκίνο της εξωκρινούς μοίρας και β) στον καρκίνο της ενδοκρινούς μοίρας. Ο καρκίνος της εξωκρινούς μοίρας είναι συνηθέστερος σε σχέση με τον καρκίνο της ενδοκρινούς μοίρας καθώς το εξωκρινές τμήμα του οργάνου καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του. Σημαντικό είναι επίσης ότι αυτό το είδος καρκίνου προσβάλλει συχνότερα τους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες. Το πιο κοινό είδος καρκίνου της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος είναι το παγκρεατικό αδenoκαρκίνωμα ενώ είδη με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης είναι το πλακώδες καρκίνωμα, το αδenoπλακώδες καρκίνωμα, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα, το giant cell carcinoma και το acinar cell carcinoma. Το παγκρεατικό αδenoκαρκίνωμα προσβάλλει συχνότερα τους αγωγούς του παγκρέατος και λιγότερο συχνά τα κύτταρα που παράγουν παγκρεατικά ένζυμα, όπου σε αυτή την περίπτωση ο καρκίνος ονομάζεται καρκίνωμα κυττάρων acinar.

Ο καρκίνος της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος ονομάζεται νευροενδοκρινικό παγκρεατικό καρκίνωμα, αποτελεί μόλις το 5% των καρκίνων που αφορούν το πάγκρεας και κατηγοριοποιείται ανάλογα με το είδος των κυττάρων που προσβάλλει. Ειδικότερα τα πιο κοινά καρκινώματα της ενδοκρινούς μοίρας είναι το ινσουλίωμα που προσβάλλει τα κύτταρα των νησιδίων που παράγουν ινσουλίνη και το γαστρίνωμα που αφορά τα κύτταρα που παράγουν γαστρίνη. Σπανιότερα παρατηρείται προσβολή των κυττάρων που συνθέτουν και εκκρίνουν γλυκαγόνη, σωματοστατίνη, VIP πεπτίδιο και παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. Τα νευροενδοκρινικά παγκρεατικά καρκινώματα μπορεί να είναι καλοήθης ή κακοήθης όγκοι ωστόσο ο διαχωρισμός τους είναι ιδιαίτερα δύσκολος. Κακοήθης θεωρείται συχνά ο όγκος αφού διαπιστωθεί η ικανότητά του να διηθεί και να προσβάλλει γειτονικά όργανα. Επίσης στον καρκίνο του παγκρέατος πολύ συχνά συγκαταλέγεται και ο καρκίνος που αφορά το φύμα του Vater ,αν και αυτό δεν αποτελεί τμήμα μόνο του παγκρέατος αλλά και της χολής, ωστόσο αντιμετωπίζεται με παρόμοιο τρόπο. [14]

3.3. Παράγοντες κινδύνου

Υπάρχει μια πληθώρα παραγόντων που εικάζεται πως συμβάλλουν στην εμφάνιση καρκίνου του παγκρέατος ορισμένοι εκ των οποίων είναι: 1) γενετικοί παράγοντες καθώς 5-10% των ατόμων που πάσχουν έχουν κάποιο συγγενικό πρόσωπο που επίσης πάσχει, 2) ο διαβήτης, 3) το κάπνισμα, 4) η έκθεση σε τοξικά χημικά, 5) η παχυσαρκία και η αδράνεια, καθώς έχει βρεθεί πως άτομα που γυμνάζονται έχουν σημαντικά μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσουν τη νόσο, 6) η ηλικία, καθώς οι πάσχοντες είναι άνω των 45 ετών, 7) το φύλο, με τους άνδρες να πάσχουν συχνότερα από τις γυναίκες 8) η χρόνια παγκρεατίτιδα και οι παγκρεατικές κύστες, 9) η διατροφή, αφού έρευνες σε ζώα έχουν δείξει πως η υπέρμετρη κατανάλωση λιπών και κρέατος μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση της νόσου και 10) το λυκοπένιο και το σελήνιο που όπως φαίνεται τα χαμηλά επίπεδα αυτών μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη παγκρεατικού καρκίνου. [15], [16]

3.4. Στάδια παγκρεατικού καρκίνου

Ο καρκίνος του παγκρέατος διαχωρίζεται σε επιμέρους στάδια ανάλογα με την έκταση εξάπλωσης της νόσου γεγονός που διευκολύνει τη σωστή αντιμετώπισή της. Το σύστημα κατηγοριοποίηση του καρκίνου του παγκρέατος στις Ηνωμένες Πολιτείες προέρχεται από το American Joint Committee on Cancer και το National Comprehensive Cancer Network. Σύμφωνα με το American Joint Committee on Cancer ο διαχωρισμός των σταδίων βασίζεται στο σύστημα TNM, όπου το T (tumor) στάδιο βασίζεται στο μέγεθος του όγκου και στο αν η βλάβη έχει επεκταθεί εκτός του οργάνου ή σε παρακείμενα αιμοφόρα αγγεία. Το στάδιο N (nodes) και M

(metastasized) βασίζεται στην παρουσία ή απουσία μετάστασης σε περιφερειακούς λεμφαδένες ή σε άλλες απομακρυσμένες περιοχές, αντίστοιχα. [16]

Μετά την προαναφερθήσα κατάταξη ακολουθεί μια λεπτομερέστερη και σαφέστερη κατηγοριοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου που είναι η εξής:

- Στάδιο 0: Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί αλλά περιορίζεται μόνο στην ανώτατη στιβάδα κυττάρων των αγωγών του παγκρέατος. Δεν γίνεται αντιληπτός μέσω εξετάσεων απεικόνισης.
- Στάδιο I: Ο καρκίνος δεν έχει διηθήσει γειτονικούς ιστούς αλλά έχει εξαπλωθεί στο πάγκρεας. Εάν η τοπική αυτή εξάπλωση έχει έκταση μικρότερη από 2 εκατοστά τότε το στάδιο ονομάζεται IA ενώ αν είναι μεγαλύτερη από 2 εκατοστά αλλά μικρότερη από 4 εκατοστά, το στάδιο καλείται IB.
- Στάδιο II: Ο όγκος καταλαμβάνει έκταση μεγαλύτερη των 4 εκατοστών στο πάγκρεας ενώ μπορεί να έχει εξαπλωθεί σε γειτονικούς λεμφαδένες, όχι όμως σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος.
- Στάδιο III: Η εξάπλωση του καρκίνου είναι εκτενέστερη, έχουν προσβληθεί μεγάλα αιμοφόρα αγγεία ή/και νεύρα χωρίς όμως να παρατηρείται μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος.
- Στάδιο IV: Έχει προκληθεί μετάσταση σε απομακρυσμένους ιστούς και όργανα.

(Η παραπάνω κατηγοριοποίηση δεν αφορά τα νευροενδοκρινικά παγκρεατικά καρκινώματα.) [16], [17]

3.5. Συμπτώματα

Τα συμπτώματα του παγκρεατικού καρκίνου στα αρχικά στάδια της νόσου τείνουν να είναι ανύπαρκτα με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μόνο σε προχωρημένα στάδια, όταν έχει προσβληθεί μεγάλο μέρος του οργάνου ή όταν πλέον έχει πραγματοποιηθεί μετάσταση. Σε ένα τέτοιο στάδιο, τα συμπτώματα που συχνά εμφανίζονται είναι ίκτερος, κοιλιακός πόνος, πόνος στην πλάτη, φούσκωμα, ναυτία και εμετός. Ο ίκτερος είναι ένα από τα συχνότερα συμπτώματα και οφείλεται στην απόφραξη του χοληδόχου πόρου με συνέπεια να παρεμποδίζεται η διοχέτευση της χολής στο δωδεκαδάκτυλο και τα συστατικά της να συσσωρεύονται στο αίμα οδηγώντας στο κιτρίνισμα του δέρματος και των ματιών καθώς και σε ανοιχτόχρωμα κόπρανα, σκουρόχρωμα ούρα και κνησμό.

Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι τα παραπάνω συμπτώματα εμφανίζονται σε πιο πρώιμα στάδια της νόσου όταν έχει προσβληθεί η κεφαλή του παγκρέατος και όχι το σώμα ή η ουρά του οργάνου. Επιπλέον, σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου και ειδικότερα σε περιπτώσεις μεταστάσεων, οι ασθενείς χάνουν βάρος, έχουν μειωμένη όρεξη, δυσφορία και υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα τους. Το τελευταίο σύμπτωμα οφείλεται στο ότι ο καρκίνος διαταράσσει την ομαλή λειτουργία του οργάνου με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή ινσουλίνης.

Μια ειδική και σπανιότερη μορφή καρκίνου του παγκρέατος είναι το νευροενδοκρινικό παγκρεατικό καρκίνωμα όπου στην περίπτωση αυτή τα συμπτώματα διαφέρουν και σχετίζονται με το είδος των προσβεβλημένων κυττάρων. Για παράδειγμα μπορεί να παρουσιαστεί αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης που οδηγεί σε ζάλη, εφίδρωση, λιποθυμία και άγχος λόγω του χαμηλού σακχάρου του αίματος. Επίσης μπορεί να παρατηρηθούν αυξημένα επίπεδα γλυκαγόνης που οδηγούν σε υπερβολική δίψα, ούρηση, διάρροια και απώλεια βάρους. Υψηλά επίπεδα σωματοστατίνης με παραπλήσια συμπτώματα ή υψηλά επίπεδα γαστρίνης που οδηγούν σε κοιλιακό άλγος, σε απώλεια βάρους και σε στομαχικά έλκη. Τέλος αυξημένα επίπεδα VIP πεπτιδίου οδηγούν σε κοιλιακούς πόνους, διάρροιες και εξάψεις προσώπου. [16]

3.6. Διάγνωση

Η εμφάνιση μιας σειράς συμπτωμάτων και συχνά η παρουσία ενός επιβαρυσμένου οικογενειακού ιστορικού σχετικό με τον καρκίνο του παγκρέατος, πυροδοτεί τις υποψίες του ιατρού για νόσο του ασθενούς από καρκίνο του παγκρέατος. Για τη διαλεύκανση τέτοιων περιπτώσεων ακολουθείται μια σειρά από τεχνικές και μεθόδους διάγνωσης όπως:

- ❖ Η υπολογιστική τομογραφία (CT), μια τεχνική με χαμηλό κόστος, ευρεία χρήση στη διάγνωση του παγκρεατικού καρκίνου και υψηλή ευαισθησία η οποία κυμαίνεται από 76-96% στις περιπτώσεις παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Στην τεχνική αυτή λαμβάνονται εικόνες έπειτα από έκθεση του ασθενούς σε ακτίνες-Χ με αποτέλεσμα σε περιπτώσεις παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος να εντοπίζεται διόγκωση του παγκρεατικού πόρου, ατροφία του οργάνου καθώς και άλλα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά της νόσου. Επίσης, όταν υπάρχει υπόνοια ότι ο ασθενής πάσχει από καρκίνο του παγκρέατος μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ειδικότερες τεχνικές CT όπως ο πολυφασικός σαρωτής CT ή ο σαρωτής παγκρεατικού πρωτοκόλλου CT.
- ❖ Η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), που χρησιμοποιεί ραδιομαγνητικά κύματα προκειμένου να ληφθούν εικόνες από τη γύρω περιοχή του παγκρέατος, από το ήπαρ, τους πνεύμονες και τη χοληδόχο κύστη. Η μέθοδος αυτή έχει αντίστοιχη ευαισθησία με την CT ωστόσο χρησιμοποιείται σπανιότερα και κυρίως σε περιπτώσεις όπου ο ασθενής εμφανίζει αλλεργία κατά τη διάρκεια της CT, πάσχει από νεφρική ανεπάρκεια ή υπάρχουν διφορούμενα ευρήματα. Ειδικότερα σε περιπτώσεις καρκίνου του παγκρέατος χρησιμοποιείται:
 1. Το MR χολαγγειοπαγκρεατογράφημα (MRCP), που αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο για την εξέταση των παγκρεατικών και χολικών πόρων.
 2. Το MR αγγειογράφημα, που περιλαμβάνει τη χορήγηση μιας χρωστικής αντίθεσης και στη συνέχεια τη λήψη εικόνων με τη βοήθεια ακτίνων-Χ. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώνεται εάν η ροή αίματος παρεμποδίζεται ή μπλοκάρεται από κάποιον όγκο καθώς και αν έχουν αναπτυχθεί στην περιοχή του όγκου αιμοφόρα αγγεία που τον τροφοδοτούν.
- ❖ Το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS), στο οποίο γίνεται χρήση ηχοενδοσκοπίων με μηχανικούς ή ηλεκτρονικούς μετατροπής υπερήχων που χαρακτηρίζονται από ένα εύρος συχνοτήτων που κυμαίνεται από 5-20 MHz. Αναλυτικότερα, το ενδοσκόπιο εισέρχεται στο πεπτικό σύστημα του ασθενούς, πλησιάζει το πάγκρεας και παρατηρούνται τυχόν όγκοι σε αυτό. Σε περιπτώσεις όπου εντοπίζεται κάποιος όγκος μια μικρή βελόνα αναδύεται από το ενδοσκόπιο και λαμβάνεται υλικό για βιοψία.
- ❖ Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), στην οποία χορηγείται στον ασθενή μια μορφή ραδιενεργής γλυκόζης (FDG) η οποία προσλαμβάνεται από τα καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια ανιχνεύεται η ραδιενέργεια και με αυτόν τον τρόπο εντοπίζονται οι εστίες των καρκινικών κυττάρων.
- ❖ Η PET/ CT, η οποία αποτελεί συνδυασμό των 2 διαγνωστικών τεχνικών και προσφέρει υψηλότερη αξιοπιστία αποτελεσμάτων κυρίως σε περιπτώσεις μεταστάσεων οι οποίες δεν είναι ανιχνεύσιμες με άλλες απλούστερες τεχνικές.
- ❖ Η βιοψία, κατά την οποία λαμβάνεται δείγμα από το πάγκρεας του ασθενούς προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία ή όχι μιας κακοήθειας. Η βιοψία μπορεί να είναι μέσω παρακέντησης με λεπτή βελόνα (fine needle aspiration, FNA), ενδοσκοπική ή χειρουργική όμως σε κάθε περίπτωση για να πραγματοποιηθεί η βιοψία απαιτείται και κάποια από τις παραπάνω διαγνωστικές τεχνικές οι οποίες κατευθύνουν τη βελόνα της δειγματοληψίας στο σωστό σημείο του οργάνου.

Οι παραπάνω διαγνωστικές μέθοδοι συμβάλουν στον εντοπισμό των παγκρεατικών όγκων, στη διαπίστωση μεταστάσεων καθώς και στη σωστή λήψη ιατρικών αποφάσεων σχετικά με τη δυνατότητα αφαίρεσης ενός όγκου.

Τα νευροενδοκρινικά παγκρεατικά καρκινώματα ανιχνεύονται με διαφορετικές τεχνικές μία εκ των οποίων είναι το σπινθηρογράφημα υποδοχέα σωματοστατίνης (SRS), κατά το οποίο χορηγείται στον ασθενή ενδοφλεβίως ραδιενεργή οκτρεοτίδη η οποία προσκολλάται στα καρκινικά κύτταρα. Ακολουθεί εντοπισμός της ραδιενέργειας και κατ' επέκταση διαπίστωση της παρουσίας ή απουσίας καρκινικών κυττάρων.

Στα πλαίσια της διάγνωσης του παγκρεατικού καρκίνου επιτελούνται εκτός από τις τεχνικές που προαναφέρθηκαν και διάφορες αιματολογικές εξετάσεις όπως:

- ❖ Οι δοκιμές ηπατικής λειτουργίας, στις οποίες εξετάζεται η χολερυθρίνη προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο ίκτερος που συχνά εμφανίζεται σε άτομα που πάσχουν από καρκίνο του παγκρέατος, οφείλεται σε κάποια ηπατική βλάβη ή σε απόφραξη του χοληδόχου πόρου από κάποιο αναπτυσσόμενο όγκο.
- ❖ Οι εξετάσεις ανίχνευσης του καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου (CEA) και του CA 19-9 που αποτελούν καρκινικούς δείκτες.

Στον νευροενδοκρινικό παγκρεατικό καρκίνο χρησιμοποιούνται διαφορετικές εξετάσεις αίματος που αφορούν κυρίως τις ορμόνες που παράγονται από το πάγκρεας καθώς και άλλες ενώσεις όπως είναι:

- ❖ Η ινσουλίνη, η σωματοστατίνη, η γαστρίνη, η γλυκαγόνη, το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο και το VIP.
- ❖ Η χρωμογρανίνη Α (CgA).
- ❖ Η γλυκόζη και το C-πεπτίδιο. [17]

3.7. Θεραπεία

Η θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται το ιστορικό του ασθενούς, η παρουσία ή όχι μεταστάσεων καθώς και πολλοί άλλοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο θα διεκπεραιωθεί η αντιμετώπιση της νόσου. Αναλυτικότερα, η θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου μπορεί να πραγματοποιηθεί:

- ❖ Χειρουργικά, σε περιπτώσεις που δεν έχει διαπιστωθεί μετάσταση με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται πλήρης αφαίρεση του όγκου. Αντίθετα σε περιπτώσεις μεταστάσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική επέμβαση η οποία όμως να μην αφορά την πλήρη εκτομή του όγκου αλλά να σχετίζεται με την ανακούφιση των συμπτωμάτων του ασθενούς π.χ. σε περιστατικά όπου παρατηρείται απόφραξη του χοληδόχου πόρου. Συνοψίζοντας η χειρουργική αντιμετώπιση του παγκρεατικού καρκίνου υφίσταται σε ασθενείς στους οποίους δεν έχουν ανιχνευθεί μεταστάσεις. Ωστόσο, πολύ συχνά και κατά τη διάρκεια της επέμβασης ο χειρουργός διαπιστώνει μεταστάσεις με αποτέλεσμα τη διακοπή της επέμβασης ή την αφαίρεση μόνο των μεταστάσεων. Ο καρκίνος που αφορά την ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος συχνά είναι πιο θεραπεύσιμος χειρουργικά συγκριτικά με τον καρκίνο της εξωκρινούς μοίρας.
- ❖ Χημειοθεραπευτικά όπου γίνεται χρήση διαφόρων αντικαρκινικών φαρμάκων όπως η Gemcitabine (Gemzar), 5-fluorouracil (5-FU), Irinotecan (Camptosar), Oxaliplatin (Eloxatin), Albumin-bound paclitaxel (Abraxane), Capecitabine (Xeloda), Cisplatin, Paclitaxel (Taxol), Docetaxel (Taxotere) και τα λιποσώματα φορτωμένα με Irinotecan (Onivyde). Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλα τα στάδια του παγκρεατικού καρκίνου και ειδικότερα μπορούν να χορηγηθούν είτε πριν από μια χειρουργική επέμβαση προκειμένου να συρρικνωθεί ο όγκος του ασθενούς είτε μετά την επέμβαση όπου στην περίπτωση αυτή χορηγούνται για την εξουδετέρωση καρκινικών κυττάρων που πιθανόν να μην αφαιρέθηκαν. Συχνός είναι επίσης και ο συνδυασμός των αντικαρκινικών φαρμάκων με ακτινοβολίες για υψηλότερη αποτελεσματικότητα αλλά και για την αντιμετώπιση μεταστάσεων. Στα νευροενδοκρινικά παγκρεατικά καρκινώματα χορηγούνται συχνά διαφορετικά αντικαρκινικά φάρμακα όπως ανάλογα σωματοστατίνης (π.χ. Οκτρεοτίδη, Lanreotide και Pasireotide) Doxorubicin (Adriamycin), Streptozocin, Fluorouracil (5-FU), Dacarbazine (DTIC),

Temozolomide (Temodar), Capecitabine (Xeloda), Oxaliplatin (Eloxatin), carboplatin και etoposide. Ειδικότερα, σε ασθενείς με ινσουλίνωμα χορηγείται η Diazoxide που αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας, σε ασθενείς με γαστρίνωμα συχνά χορηγούνται αναστολείς της αντλίας πρωτονίων όπως η omeprazole, η esomeprazole και η lansoprazole που αναστέλλουν την έκκριση οξέος από το στομάχο. [5]

Προκειμένου να επιτευχθεί η αντιμετώπιση της νόσου πολύ συχνά οι ιατροί καταφεύγουν σε συνδυασμό των παραπάνω φαρμάκων ωστόσο σε κάθε περίπτωση εμφανίζονται παρενέργειες λόγω της υψηλής τοξικότητας των φαρμάκων ή της υψηλής δόσης χορήγησης.

4. SIGMA ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

4.1. Γενικές πληροφορίες

Το 1976, ο Martin και οι συνεργάτες του κατάφεραν να ανακαλύψουν την ύπαρξη των σίγμα υποδοχέων μέσα από συμπεριφορικές μελέτες που σχετίζονταν με την ικανότητα σύνδεσης της μορφίνης, της κετοκυκλοζίνης και της βενζομορφίνης SKF10047. Από τις μελέτες αυτές, οι σίγμα υποδοχείς κατατάχθηκαν στους υποδοχείς οπιοειδών. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν πως οι υποδοχείς αυτοί δεν ανήκουν στην κατηγορία των οπιοειδών και ακολούθησε η διάκρισή τους σε δύο κατηγορίες, στους Sigma1 και Sigma2 υποδοχείς. Το 1996 πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του Sigma1 και έτσι έγινε αντιληπτό πως ο υποδοχέας αυτός δεν είχε κάποια ομολογία με οποιαδήποτε άλλη ενδογενής πρωτεΐνη. Το 2007, οι Hayashi και Su, αμφισβήτησαν την έννοια του υποδοχέα, διατυπώνοντας την άποψη που υποστήριζε πως οι Sigma υποδοχείς είναι *chaperones* (μοριακοί συνοδοί). Η λύση ωστόσο δόθηκε το 2016 όταν δημοσιεύθηκε η κρυσταλλική δομή του Sigma1.

Από την άλλη πλευρά ο Sigma2 κλωνοποιήθηκε πολύ πρόσφατα το 2017 από τον Aion και τους συνεργάτες του και αναμένεται η κρυσταλλική του δομή. Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των δεκαετιών οι Sigma υποδοχείς απασχόλησαν διάφορες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες μέσα από *in vitro* αλλά και *in vivo* μελέτες διαπίστωσαν την εμπλοκή των Sigma υποδοχέων σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες όπως η πιθανή εμπλοκή τους σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στην πλαστικότητα και στην ανάπτυξη των νευρώνων, στον καρκίνο, στη μνήμη και στη μάθηση και σε πολλές άλλες κυτταρικές διαδικασίες. [18]

4.2. Δομή και λειτουργία των sigma1 υποδοχέων

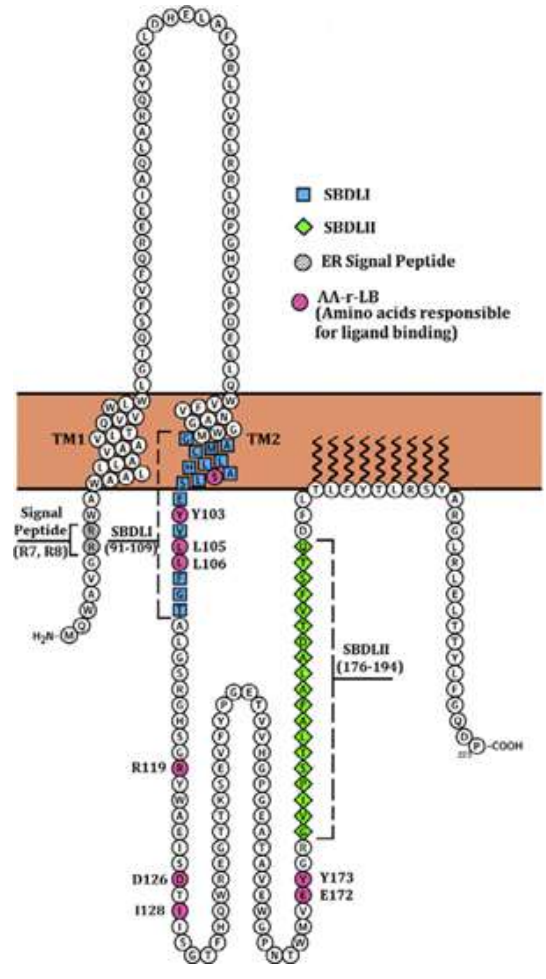
Ο sigma1 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη – υποδοχέας που αποτελείται από 223 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 25,1kDa. Εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη αλλά και στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου που αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή μεμβράνη (περιοχή MAM). [20] Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα εδράζεται στο χρωμόσωμα 9p13, μια περιοχή που σχετίζεται με πολλές ψυχωτικές διαταραχές. Διαθέτει 4 εξώνια που η αλληλουχία τους διακόπτεται από 3 ιντρόνια. Το τέταρτο εξώνιο είχε το μεγαλύτερο μήκος ενώ το τρίτο το μικρότερο. Σχετικά με τα ιντρόνια το τρίτο ιντρόνιο είναι αυτό με τη μεγαλύτερη αλληλουχία. [19]

Ως αναφορά τη δομή του υποδοχέα, αυτός διαθέτει δύο ή τρεις υδρόφοβες περιοχές όπου οι δύο πρώτες είναι διαμεμβρανικές περιοχές με δομή α-έλικας και χαρακτηρίζονται ως TM1 και TM2. Η αμινοξική του αλληλουχία εμφανίζει 67% ομολογία με την C8-C7 ισομεράση της στερόλης της ζύμης, χωρίς όμως να εμφανίζει ενζυμική δραστικότητα. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 91-109 και 176-194 είναι αυτά με την υψηλότερη

ομολογία και για το λόγω αυτό οι αντίστοιχες αλληλουχίες ονομάζονται SBDLI και SBDLII (steroid-binding domain-like I & II). Οι διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα TM1 και TM2 συνδέονται μέσω ενός εξωκυττάριου βρόγχου (loop) 50 αμινοξικών καταλοίπων ενώ το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο του εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν ο υποδοχέας εντοπίζεται στην περιοχή MAM τότε τα δύο άκρα του προβάλλουν στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Το αμινοτελικό του άκρο είναι σχετικά μικρό καθώς αποτελείται από 10 αμινοξικά κατάλοιπα ενώ το καρβοξυτελικό του άκρο είναι μεγαλύτερο και αποτελείται από 125. Η περιοχή σύνδεσης των προσδετών διαμορφώνεται μεταξύ των περιοχών SBDLI και SBDLII ενώ απαραίτητη είναι και η περιοχή TM1 που αλληλεπιδρά με τις παραπάνω περιοχές όπως και το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα που σταθεροποιεί τη δομή του (εικόνα 2).

Τέλος ένα ακόμα σημαντικό χαρακτηριστικό των Sigma1 υποδοχέων είναι η ικανότητα ολιγομερισμού τους καθώς μπορούν να σχηματίζουν από εξαμερή μέχρι και δεκαπενταμερή. Ο υποδοχέας διαθέτει δύο μοτίβα διμερισμού, το ένα στην περιοχή TM2 και το δεύτερο στην περιοχή SBDLII που πιθανόν είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ολιγομερών. Έτσι λοιπόν, μέσα από πειραματικές μελέτες έγινε αντιληπτό πως οι Sigma1 υποδοχείς δεν ανήκουν στους υποδοχείς οπιοειδών όπως προτάθηκε αρχικά καθώς διαθέτουν μια μοναδική αλληλουχία και δομή όπως και ένα διαφορετικό φαρμακολογικό προφίλ που τους καθιστά ξεχωριστούς. [20]

Οι Sigma1 υποδοχείς εκφράζονται εκτενώς στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αλλά και σε περιφερικούς ιστούς και όργανα όπως οι πνεύμονες, το πάγκρεας και το ήπαρ. Σε κυτταρικό επίπεδο, εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), στην περιοχή MAM (mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membrane). Ως μοριακοί συνοδοί (chaperones), οι Sigma-1 εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως η ανάπτυξη καρκίνου και Alzheimer, η μνήμη, η καρδιακή δραστηριότητα, το εγκεφαλικό επεισόδιο και ο εθισμός σε ουσίες.



Εικόνα 2: Δομή sigma1 υποδοχέα. [20]

Ως αναφορά την παρουσία τους στο ΚΝΣ, βρέθηκε πως οι sigma1 υποδοχείς επηρεάζουν και ρυθμίζουν τη λειτουργία του ντοπαμινεργικού, του γλουταμινεργικού, του σεροτονεργικού, του νοραδρενεργικού και του χολινεργικού συστήματος. Επιπρόσθετες μελέτες κατέδειξαν την εμπλοκή τους στη ρύθμιση υποδοχέων (AMPA και NMDA) αλλά και καναλιών ιόντων όπως των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών Ασβεστίου και Καλίου ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν διαπιστώσει τη συσχέτιση αυτών των υποδοχέων με τη διατήρηση της ομοιόστασης Ca^{2+} και τη ρύθμιση της σηματοδότησης Ca^{2+} μέσω του υποδοχέα τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3). Αναλυτικότερα έχει προταθεί πως οι sigma1 υποδοχείς προάγουν τη μείωση της μιτοχονδριακής ενέργειας, την εισροή ασβεστίου και την απόπτωση. [20], [21], [22]

4.3. Ο ρόλος του sigma1 σε διαταραχές του ΚΝΣ

Η εκτεταμένη έκφραση των sigma1 υποδοχέων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αποτέλεσε το έναυσμα για διάφορες ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο να μελετήσουν τον ρόλο αυτών των υποδοχέων στη

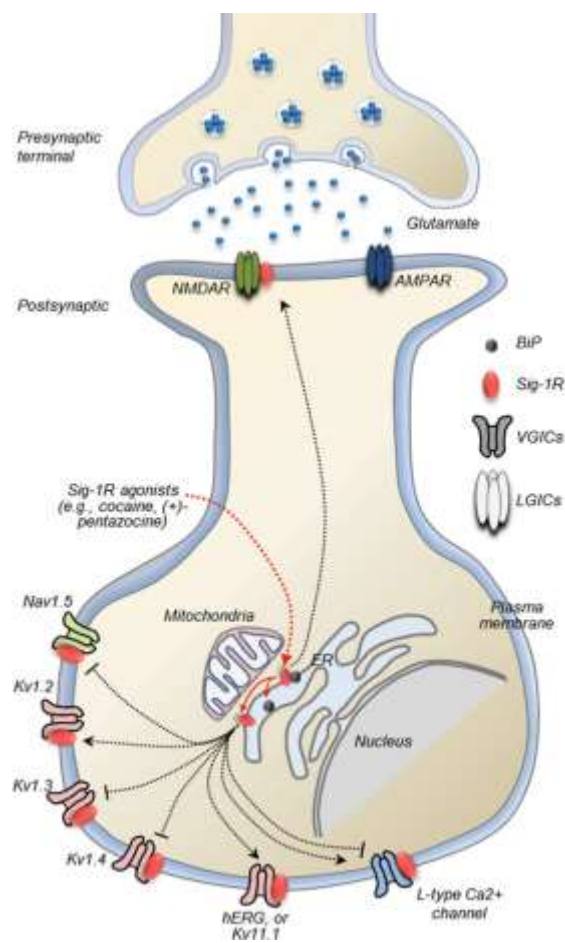
λειτουργία και στην ανάπτυξη του ΚΝΣ αλλά και την εμπλοκή τους σε διάφορες ασθένειες νευρολογικής φύσεως. Ειδικότερα έχει διαπιστωθεί η έκφραση των υποδοχέων σε:

- 1) πυρήνες, μιτοχόνδρια αλλά και σε πλασματικές μεμβράνες νευρώνων,
- 2) σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του ΚΝΣ όπως σε αστροκύτταρα, στη μικρογλοία και σε ολιγοδενδροκύτταρα και
- 3) σε ιστούς του ανοσοποιητικού και ενδοκρινικού συστήματος που σχετίζονται με το ΚΝΣ.

Έτσι λοιπόν οι sigma1 υποδοχείς πιθανόν σχετίζονται με διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές κυτταρικές διεργασίες. Μερικές ασθένειες του ΚΝΣ όπως το Alzheimer (AD), το Parkinson (PD), η amyotrophic lateral sclerosis (ALS) αλλά και το εγκεφαλικό επεισόδιο θα μπορούσαν να προληφθούν ή να θεραπευτούν με τη βοήθεια ενώσεων που λειτουργούν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές των sigma1 υποδοχέων. Οι ασθένειες αυτές ανήκουν στην κατηγορία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών στις οποίες ο εκφυλισμός των νευρώνων οδηγεί σε απώλεια ορισμένων κρίσιμων εγκεφαλικών λειτουργιών ή σε δυσλειτουργία κάποιου τμήματος του εγκεφάλου. Μια θεραπευτική προσέγγιση τέτοιων ασθενειών θα μπορούσε να αποτελεί η επαναφορά της ροής αίματος έπειτα από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο ή η επαναδιαμόρφωση των πρωτεϊνών καθώς σε άτομα με AD, PD και ALS έχει παρατηρηθεί συσσώρευση πρωτεϊνών με λανθασμένη τριτοταγή δομή. Επίσης μια άλλη προσέγγιση σχετικά με την πρόληψη του εκφυλισμού των νευρώνων θα μπορούσε να είναι η προστασία των νευρώνων από την τοξικότητα του ασβεστίου και του γλουταμινικού οξέος, από το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή.

Στις παραπάνω θεραπευτικές προσεγγίσεις πιθανότατα εμπλέκονται οι sigma1 υποδοχείς, οι οποίοι μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των νευρώνων αλλά και να αυξάνουν την πλαστικότητα υγιών νευρώνων, συμβάλλοντας έτσι στην πλήρη ή μερική αποκατάσταση της εγκεφαλικής λειτουργίας. [23]

Η νευροπροστατευτική δράση του sigma1 οφείλεται στην ικανότητά του να ρυθμίζει και να επαναφέρει την ομοιόσταση ασβεστίου η οποία διαταράσσεται σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών ασθενειών αλλά και εγκεφαλικών επεισοδίων. Συγκεκριμένα, ο sigma1 που εντοπίζεται στην περιοχή ΜΑΜ, διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο καθώς ρυθμίζει την εκροή και εισροή ασβεστίου από το ΕΔ. Ακόμα, σταθεροποιεί τον υποδοχέα τριφωσφορικής ινοσιτόλης, εξασφαλίζοντας τη σωστή μεταφορά ασβεστίου μεταξύ ΕΔ και μιτοχονδρίου ενώ ενεργοποιεί και τη φωσφολιπάση C, η οποία υδρολύει τη φωσφατιδυλοδιφωσφορική ινοσοτόλη (PIP₂) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) με αποτέλεσμα η IP₃ να προσδένεται στον υποδοχέα της που εντοπίζεται στο ΕΔ και να επάγει την απελευθέρωση ασβεστίου από αυτό. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην εικόνα 3, οι sigma1 υποδοχείς μεταξύ άλλων ρυθμίζουν και τη λειτουργία των τασεο-



Εικόνα 3: Η νευροπροστατευτική δράση του sigma1 υποδοχέα. [27]

εξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου και των καναλιών ιόντων που ανιχνεύουν οξέα (AMPA και NMDA), που με τη σειρά τους συμβάλουν στην ομοιόσταση του ενδοκυττάριου ασβεστίου.

Στους νευρώνες, η παρουσία ασβεστίου διεγείρει τη σύζευξη της εξαρτώμενη από ασβέστιο συνθάσης του οξειδίου του αζώτου nNOS (neuronal nitric oxide synthase) με την προσυναπτική πρωτεΐνη πυκνότητας 95 (PSD95). Η διαδικασία αυτή αναστέλλεται έπειτα από την ενεργοποίηση των sigma1 υποδοχέων με αποτέλεσμα να μειώνεται και η αλληλεπίδραση της nNOS με την υπομονάδα NR2 του NMDA, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση του καταρράκτη των MAP κινασών. Σε περιπτώσεις τραυματισμένων νευρώνων ή σε καταστάσεις στρες τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου, μειώνουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της nNOS με αποτέλεσμα να αυξάνεται η παραγωγή του NO. Τα αυξημένα επίπεδα NO επάγουν με τη σειρά τους την ενεργοποίηση της PKC, η οποία φωσφορυλιώνει την υπομονάδα NR1 του NMDA.

Παράλληλα ο sigma1 μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την έκφραση προ-φλεγμονωδών ή αντι-φλεγμονωδών γονιδίων καθώς και με την έκφραση γονιδίων κυτταρικού θανάτου και κυτταρικής επιβίωσης. Η ενεργοποίηση του sigma1 και κατ' επέκταση της PKC, οδηγεί σε φωσφορυλίωση των ρυθμιζόμενων από εξωκυττάρια σήματα κινασών 1/2, γεγονός που αυξάνει τα επίπεδα των νευροτροφικών αυξητικών παραγόντων όπως του BDNF και του GDNF που συμβάλλουν στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρώνων του εγκεφάλου.

Στο πλαίσιο της νευροπροστασίας έχει παρατηρηθεί επίσης πως προσδέτες των sigma1 υποδοχέων έχουν αντι-φλεγμονώδη δράση ενώ επάγουν παράλληλα τη νευρογένεση, τη νευρωνική πλαστικότητα αλλά και τον πολλαπλασιασμό των ολιγοδενδροκυττάρων. Σε περιπτώσεις τραυματισμών, εγκεφαλικών επεισοδίων αλλά και νευροεκφυλιστικών ασθενειών παρατηρείται μια σημαντική μείωση των νευρικών κυττάρων καθώς πολλά από αυτά οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί διαδικασίες νευρογένεσης προκειμένου να εξομαλυνθεί η λειτουργία του εγκεφάλου και σε αυτές τις διαδικασίες σημαντικός είναι και ο ρόλος των sigma1 υποδοχέων. Συγκεκριμένα, η παρουσία ενεργοποιημένων sigma1 υποδοχέων πάνω σε λιπιδικές σχεδίες συχνά επάγει τη μεταφορά λιπιδίων αλλά και πρωτεϊνών σε περιοχές όπου πρόκειται να αναπτυχθούν νέοι νευρώνες. Η μεταφορών των λιπιδικών σχεδίων σε νευρικές συνάψεις συμβάλει στην αύξηση της πλαστικότητας των νευρώνων ενώ συχνά μπορεί να σχετίζεται με την ενδοκύτωση ή εξωκύτωση υποδοχέων αλλά και καναλιών ρυθμίζοντας έτσι την απόκριση των νευρώνων σε διάφορα ερεθίσματα.

Πρόσφατα έχει διαπιστωθεί πως η ενεργοποίηση των sigma1 υποδοχέων επάγει τη μετακίνηση των NMDA στην πλασματική μεμβράνη γεγονός που αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο των υποδοχέων αυτών στην πλαστικότητα των νευρώνων. Έτσι λοιπόν, γίνεται σαφής η σημαντικότητα των sigma1 υποδοχέων καθώς και των αγωνιστών και ανταγωνιστών αυτών των υποδοχέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικές ενώσεις για την αντιμετώπιση ή την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το νευρικό σύστημα. Ποικίλες φαρμακολογικές μελέτες έχουν διαπιστώσει τη σύνδεση των υποδοχέων αυτών με αγωνιστές ή ανταγωνιστές που ενδεχομένως ρυθμίζουν τη λειτουργία τους.

Ως αγωνιστές θεωρούνται ενώσεις που μιμούνται τη λειτουργία του ενδογενή προσδέτη του υποδοχέα και η σύνδεσή τους επιφέρει την ενεργοποίησή του και κατά συνέπεια την εκδήλωση της βιολογικής του λειτουργίας. Αντίθετα η δέσμευση ενός ανταγωνιστή σε κάποιο υποδοχέα αποτρέπει την εκδήλωση της βιολογικής του λειτουργίας καθώς τον καθιστά στην ανενεργή του διαμόρφωση ενώ αποτρέπει και τη δέσμευση του ενδογενή προσδέτη του. Μερικοί αγωνιστές των sigma υποδοχέων είναι η (+)-pentazocine, το (+)-SKF10,047, το PRE084, και το SA4503 ενώ τους ανταγωνιστές συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων το BD1047, το BD1063 και το NE-100.

Συνοψίζοντας τον ρόλο των *sigma1* υποδοχέων σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει τον εντοπισμό μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα, οι οποίες αυξάνουν την προδιάθεση τέτοιων ασθενειών. Συγκεκριμένα στο γονίδιο *SIGMAR1* έχουν βρεθεί δύο σημαντικοί πολυμορφισμοί, ο s1799729 (GC-241-240TT) και ο rs1800866 (Gln2Pro) που εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή και στο πρώτο εξόνιο αντίστοιχα. Οι πολυμορφισμοί αυτοί τροποποιούν τη δομή του υποδοχέα με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αλληλεπίδρασή του με τη μεμβράνη του ΕΔ και κατ' επέκταση να διαταράσσεται η λειτουργία του, ενισχύοντας τελικά τις πιθανότητες εκδήλωσης νευροεκφυλιστικών ασθενειών. [23], [24]

4.4. Ο ρόλος του *sigma1* στον καρκίνο

Σχετικά πρόσφατα, ερευνητικές ομάδες μέσα από μελέτες τους προσπάθησαν να συσχετίσουν τον καρκίνο με την έκφραση και τη λειτουργία των *sigma1* υποδοχέων. Μελετώντας εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς κατάφεραν να αποδείξουν την έκφραση των υποδοχέων αυτών αλλά και τον κρίσιμο ρόλο τους στην ανάπτυξη, στην εξέλιξη αλλά και στη θεραπεία της νόσου. Ο Casellas και οι συνεργάτες του, μελετώντας όγκους από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, συσχέτισαν τους *sigma1* υποδοχείς με τον υποδοχέα προγεστερόνης με αποτέλεσμα να διαπιστωθεί πως ίσως η έκφραση των *sigma1* υποδοχέων να ρυθμίζεται από κάποια στεροειδής ορμόνη μέσω ενός ανατροφοδοτικού μηχανισμού. Παρόλα αυτά, δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια αξιοσημείωτη συσχέτιση των *sigma1* υποδοχέων με το μέγεθος του όγκου, τον πολλαπλασιασμό του όγκου, την ηλικία των ασθενών ή με το αν η εκάστοτε ασθενής είχε περάσει ή όχι την εμμηνόπαυση. Η έκφραση ωστόσο των υποδοχέων στον καρκίνο του μαστού φάνηκε να έχει υψηλή ετερογένεια και να μην σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών.

Από την άλλη πλευρά, ο Xu και η ομάδα του μελετώντας το ESCC (Esophageal Squamous Cell Carcinoma) διαπίστωσαν μία σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *sigma1* γεγονός το οποίο είχε μία θετική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, την κατάσταση των λεμφαδένων αλλά και το στάδιο της νόσου. Η μελέτη αυτή περιλάμβανε ανάλυση τόσο του πυρηνικού όσο και του κυτταροπλασματικού *sigma1* ωστόσο, ο πυρηνικός *sigma1* φάνηκε να σχετίζεται περισσότερο με την ασθένεια. Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε επίσης και το ρόλο των *sigma1* σε όγκους ασθενών με HC (Hilar Cholangiocarcinoma), παρατηρώντας πως ορισμένοι ασθενείς εμφάνιζαν υπερέκφραση των υποδοχέων αυτών σε σχέση με τα δείγματα φυσιολογικών ιστών που εμφάνιζαν μειωμένη ή και μηδενική έκφραση. Σημαντική ήταν και η παρατήρηση πως η έκφραση και πιο συγκεκριμένα ο βαθμός έκφρασης των *sigma1* σχετίζονταν με το στάδιο της ασθένειας, τη διαφοροποίηση των όγκων και τη μετάσταση σε λεμφαδένες. Ασθενείς που κατηγοριοποιήθηκαν στο στάδιο III ή IV είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των *sigma1* υποδοχέων και χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς που διαγνώστηκαν στα στάδια I και II.

Ο Crotte`s και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν αναλύσεις σε επίπεδο RNA υποδεικνύοντας μια σημαντική συσσώρευση μεταγράφων του γονιδίου *SIGMAR1* σε καρκίνους του παχέος εντέρου (CRC) και της οξείας και χρόνιας μυελοειδής λευχαιμίας, σε σχέση με τα επίπεδα μεταγράφων του *SIGMAR1* σε φυσιολογικούς ιστούς. Έτσι λοιπόν εδώ και αρκετό καιρό διεξάγονται έρευνες που αφορούν την έκφραση αυτών των υποδοχέων σε διάφορους τύπους καρκίνου ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης αυτών των υποδοχέων εμφανίζουν μία σημαντική ετερογένεια ακόμα και μεταξύ ασθενών με τον ίδιο τύπο καρκίνου, γεγονός που δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος σχετικά με την έκφρασή τους στον καρκίνο. [25]

Παρά την ετερογενή έκφραση των *sigma1* υποδοχέων στον καρκίνο, υπάρχουν ορισμένοι τύποι καρκίνου στους οποίους η έκφραση των υποδοχέων αυτών αυξάνεται δραματικά γεγονός που υποδεικνύει τη σημαντικότητά τους στην ανάπτυξη της νόσου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ανάπτυξη του καρκίνου

προϋποθέτει έναν αδιάκοπο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων που οδηγεί στη συσσώρευσή τους και τελικά στο σχηματισμό όγκων. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαίρεση ενός κυττάρου και να προκύψουν δύο νέα θυγατρικά κύτταρα, τα κύτταρα αυξάνουν τον όγκο τους. Η διαδικασία αυτή προκαλείται λόγω ωσμωτικού στρες με αποτέλεσμα ο όγκος των κυττάρων να αυξάνεται κατά τη μετάβασή τους από τη φάση G1 στην S. Έτσι τα κύτταρα διαθέτουν το μικρότερο μέγεθός τους στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και το μεγαλύτερο στη φάση M. Η αύξηση του όγκου των κυττάρων εξαρτάται από τη λειτουργία καναλιών K^+ και Cl^- . Η απόφραξη αυτών των καναλιών (μπλοκάρισμα) αναστέλλει τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στην S με αποτέλεσμα να αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός τους. Οι sigma1 υποδοχείς, λειτουργώντας ως μοριακοί συνοδοί, καταφέρνουν και ρυθμίζουν τη λειτουργία πολλών καναλιών ιόντων συμβάλλοντας έτσι στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ωστόσο αναστολείς/ανταγωνιστές των υποδοχέων αυτών οδηγούν σε αναστολή καναλιών K^+ και Cl^- και κατ' επέκταση και σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός αυτό υπέδειξε πως ορισμένοι sigma1 προσδέτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

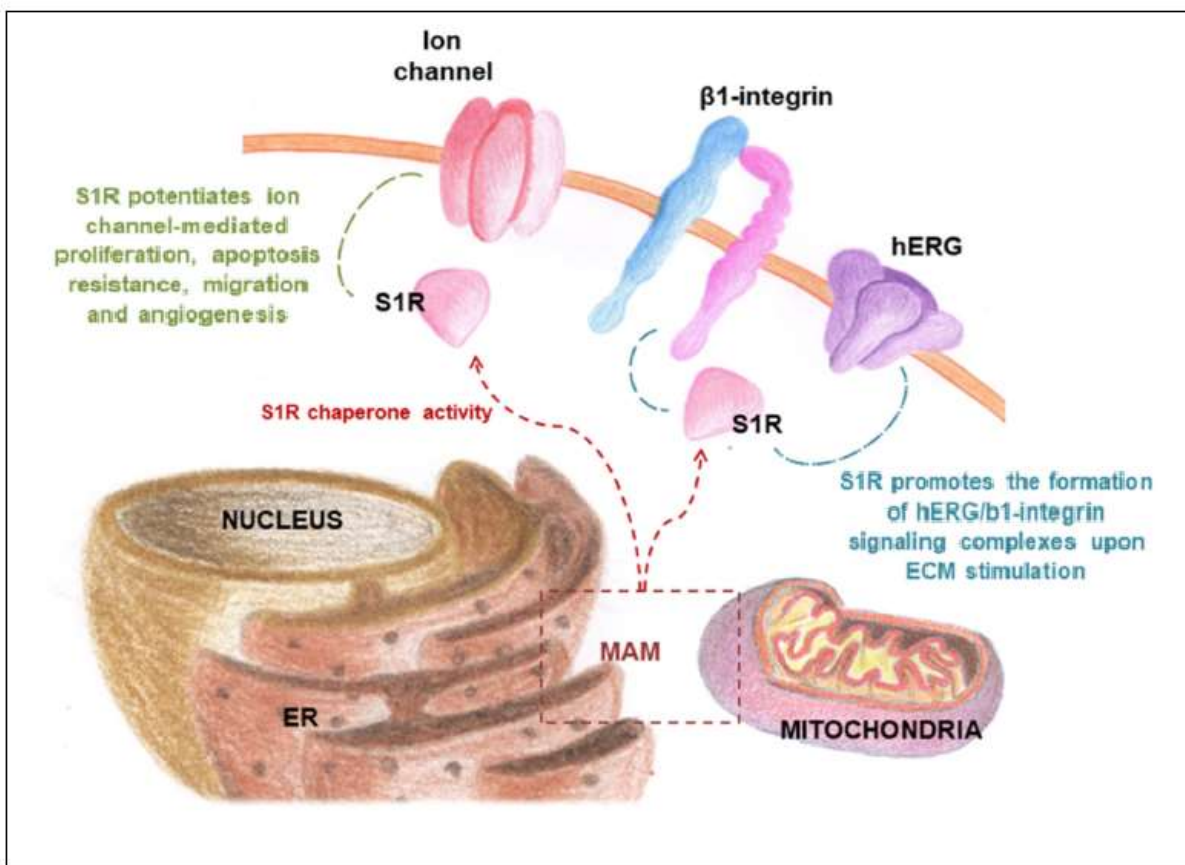
Μελέτες στο SCLC (Small Cell Lung Carcinoma) έδειξαν πως η επώαση των καρκινικών κυττάρων με ορισμένους προσδέτες των sigma1 υποδοχέων ή/και με αναστολείς των καναλιών K^+ και Cl^- είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω συσσώρευσης της $p27^{kip1}$. Η $p27^{kip1}$ όπως και η $p21^{Cip1}$ είναι αναστολείς των συμπλόκων κυκλίνης D:CDK και κυκλίνης E 4/6 CDK-2, όπου και τα δύο αυτά σύμπλοκα είναι υπεύθυνα για τη φωσφορυλίωση της pRb. Η φωσφορυλίωση της pRb αποτελεί ένα κομβικό σημείο του κυτταρικού κύκλου καθώς διεγείρει την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S. Ένα τέτοιο σημαντικό γονίδιο είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την κυκλίνη A. Έτσι λοιπόν η συσσώρευση της $p27^{kip1}$ που προκαλείται από sigma1 προσδέτες μειώνει την έκφραση της κυκλίνης A οδηγώντας σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον τόσο η $p27^{kip1}$ όσο και η $p21^{Cip1}$ αναστέλλουν την κυκλίνη E-CDK-2 που φυσιολογικά ενεργοποιεί την κυκλίνη A οδηγώντας σε ακόμα μεγαλύτερη αναστολή.

Σε ένα ακόμα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων στο οποίο πιθανόν εμπλέκονται οι sigma1 υποδοχείς, είναι η ανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Η υπερέκφραση των sigma1 στα κύτταρα HEK293 βρέθηκε πως ενίσχυε την επιβίωση των κυττάρων, αυξάνοντας την ανθεκτικότητά τους σε προ-αποπτωτικά σήματα. Ειδικότερα ένα από τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η συρρίκνωση των κυττάρων που προκαλείται λόγω διάνοιξης καναλιών K^+ και Cl^- με αποτέλεσμα την εκροή αυτών των ιόντων και την ταυτόχρονη απώλεια νερού. Η υπερέκφραση των sigma1 βρέθηκε πως επιβραδύνει την ενεργοποίηση τέτοιων καναλιών και συνεπώς αποτρέπει τα κύτταρα από συρρίκνωση και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση αλλά και την εξάπλωσή τους διεγείρουν μηχανισμούς αγγειογένεσης και διήθησης. Η ικανότητα επαγωγής αγγειογένεσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων καθώς με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζουν τη συνεχή τροφοδοσία τους με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο ενώ η διηθητική τους ικανότητα τους επιτρέπει να μεταφέρονται και σε άλλα σημεία του σώματος μακριά από την αρχική εστία του όγκου. Προκειμένου να επιτελέσουν τις δύο αυτές διαδικασίες (αγγειογένεση και μετάσταση) αλληλεπιδρούν συνεχώς με το εξωκυττάριο στρώμα δηλαδή με το μικροπεριβάλλον τους. Το μικροπεριβάλλον ενός όγκου αποτελείται από μία πληθώρα μακρομορίων, στα οποία περιλαμβάνονται η λαμινίνη, η φιμπρονεκτίνη, το υαλουρονικό οξύ, το κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες καθώς και πολλά άλλα μακρομόρια. Επίσης, με τα καρκινικά κύτταρα γειτνιάζουν και πολλά άλλα κύτταρα όπως δένδροκύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και ινοβλάστες. Τα καρκινικά κύτταρα, όπως και όλα τα υπόλοιπα κύτταρα, διαθέτουν στην επιφάνειά τους πολυάριθμες πρωτεΐνες όπως υποδοχείς αλλά και κανάλια ιόντων, τα οποία λειτουργούν ως βιοαισθητήρες ανιχνεύοντας

τη χημική, δομική και φυσική κατάσταση του μικροπεριβάλλοντος με αποτέλεσμα να μεταβιβάσουν στη συνέχεια σήματα στο εσωτερικό των κυττάρων, διαμορφώνοντας έτσι τη συμπεριφορά τους.

Ένα από τα κανάλια ιόντων που έχει αποδειχθεί πως εμπλέκεται στην αγγειογένεση και στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων είναι το τασεο-εξαρτώμενο κανάλι K^+ hERG. Το κανάλι αυτό αποτελείται από 4 α -υπομονάδες και μπορεί να εντοπίζεται στο ΕΔ αλλά και στην πλασματική μεμβράνη. Ο sigma1 μπορεί και συνδέεται και με τις 4 α -υπομονάδες του καναλιού στο ΕΔ, επάγοντας τη γλυκοζυλίωσή του, τη μετακίνησή του από το ΕΔ στην πλασματική μεμβράνη αλλά και τη σταθεροποίησή του σε αυτή. Το hERG έχει χαρακτηριστεί ως βιοδείκτης διαφόρων καρκίνων όπως του καρκίνου του παχέος εντέρου, του γλοιοβλαστώματος αλλά και της οξείας και χρόνιας λευχαιμίας. Το κανάλι αυτό εμπλέκεται στα διάφορα είδη καρκίνου καθώς όταν εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, μπορεί και αλληλεπιδρά με το μικροπεριβάλλον του όγκου και συγκεκριμένα με τις ιντεγκρίνες (εικόνα 4). Αναλυτικότερα ως απόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου ο sigma1 επάγει τη μεταφορά του hERG στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα το κανάλι να αλληλεπιδρά με τις $\beta 1$ -ιντεγκρίνες του μικροπεριβάλλοντος ενώ παράλληλα ενεργοποιεί και το σηματοδοτικό μονοπάτι Pi3K/Akt που με τη σειρά του διεγείρει την αγγειογένεση και τη διήθηση των κυττάρων αυτών. Σε μελέτες σίγασης (silencing) του ενδογενούς γονιδίου *SIGMAR1* διαπιστώθηκε μια σημαντική μείωση του αριθμού των hERG αλλά και άλλων καναλιών στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων ενώ δραματική ήταν και η αναστολή της αγγειογένεσης αλλά και τις μεταστατικής-διηθητικής ικανότητας των κυττάρων αυτών. Είναι πλέον σαφές πως οι sigma1 υποδοχείς έχουν ένα ρόλο ευνοϊκό για τα καρκινικά κύτταρα και πιθανόν γι' αυτό σε ορισμένους τύπους καρκίνου να υπερεκφράζονται. [26]



Εικόνα 4: Η λειτουργία του sigma1 υποδοχέα στον καρκίνο. [37]

4.5. Πληροφορίες για *sigma2* υποδοχείς

Εκτός από τους *sigma1* υποδοχείς που απασχόλησαν και συνεχίζουν να απασχολούν την ερευνητική κοινότητα, στο προσκήνιο έχουν έρθει εδώ και αρκετό καιρό και οι *sigma2* υποδοχείς κυρίως λόγω της πιθανής εμπλοκής τους στον καρκίνο αλλά και σε διάφορες άλλες νευρολογικές ασθένειες. Μέσα από μελέτες έχει προσδιοριστεί το μοριακό βάρος του *sigma2* που είναι περίπου 21,5kDa ωστόσο η κρυσταλλική δομή του υποδοχέα δεν έχει δημιουργηθεί ακόμα με αποτέλεσμα τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα αυτή τη στιγμή να πηγάζουν από μελέτες σύνδεσης.

Ο Zeng και οι συνεργάτες του, μέσα από μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας κατάφεραν να διευκρινίσουν τον εντοπισμό του *sigma2* στα μιτοχόνδρια, στην πλασματική μεμβράνη, στα λυσοσώματα αλλά και στο ΕΔ. Πολλές ερευνητικές ομάδες κατάφεραν να συσχετίσουν τους υποδοχείς αυτούς με τον καρκίνο καθώς πολλά είδη καρκίνου χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση των *sigma2* υποδοχέων. Έτσι άρχισε η σύνθεση διαφόρων προσδετών του *sigma2* που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά μιας και μελέτες υποδείκνυαν την εμπλοκή του *sigma2* στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Μερικοί προσδέτες των *sigma2* υποδοχέων που σχεδιάστηκαν και είχαν υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς αυτούς ήταν: το CB-64D, η Siramesine, το PB28, το SM-21, το ANSTO-19, το BIMU-1 και το YUN252. Ο εντοπισμός των *sigma2* στα μιτοχόνδρια αλλά και στα λυσοσώματα όπως επίσης και η ανακάλυψη προσδετών που επάγουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα, ενίσχυσε τις απόψεις σχετικά με τη χρήση προσδετών του *sigma2* ως αντικαρκινικές ενώσεις. Η απόπτωση, μία διαδικασία κυτταρικού θανάτου, επάγεται έπειτα από απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και ενεργοποίηση της κασπάσης 3, γεγονός το οποίο προκαλούνταν έπειτα από τη χρήση ενός *sigma2* προσδέτη. Εξειδικευμένοι *sigma2* προσδέτες φάνηκε πως επάγουν την απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ, γεγονός που επίσης σχετιζόταν με τον κυτταρικό θάνατο. Η Siramesine συσχετίστηκε με την απόπτωση καθώς η σύνδεσή της στον υποδοχέα οδηγούσε σε διάρρηξη των λυσοσωμάτων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτεασών που οδηγούσαν σε έναν εξαρτώμενο από κασπάσες κυτταρικό θάνατο. Έτσι λοιπόν, από πολύ νωρίς οι επιστήμονες κατάλαβαν πως υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των *sigma2* υποδοχέων και του καρκίνου ωστόσο περισσότερες και πιο αξιόπιστες πληροφορίες δεν μπορούσαν να προκύψουν αφού η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα δεν είχε διεξαχθεί. [27]

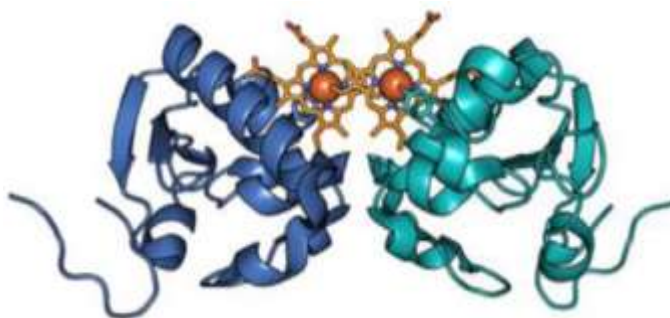
Το 2011, μία ομάδα ερευνητών υποστήριξε πως ο *sigma2* υποδοχέας είναι η υπομονάδα 1 του μεμβρανικού υποδοχέα προγεστερόνης (PGRMC1). Η άποψη αυτή στηρίχθηκε σε μια σειρά δεδομένων που προέκυψαν από μελέτες σύνδεσης. Αναλυτικότερα, η ερευνητική αυτή ομάδα συνέθεσε τρεις *sigma2* προσδέτες τους [3H]RHM-1, [125I]RHM-4 και SW120 προκειμένου να ταυτοποιήσει τον υποδοχέα αλλά και να βρει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Αρχικά με τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας οι ερευνητές κατάφεραν να δουν τον συνεντοπισμό του *sigma2* με τον PGRMC1 στο ΕΔ και στα μιτοχόνδρια ενώ με τη χρήση σημασμένων ανιχνευτών μπόρεσαν να ταυτοποιήσουν τη θέση σύνδεσης του υποδοχέα. Έτσι διαπίστωσαν πως η θέση σύνδεσης του υποδοχέα εντοπιζόταν στο εσωτερικό του PGRMC1.

Μέσα από επιπρόσθετες μελέτες οι ερευνητές διαπίστωσαν πως η σίγηση του PGRMC1 μείωνε την ικανότητα σύνδεσης των *sigma2* προσδετών ενώ ελάττωνε σημαντικά και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 αποτρέπονταν έτσι τη διαδικασία της απόπτωσης. Όλα τα παραπάνω ευρήματα οδηγούσαν στο συμπέρασμα πως ο *sigma2* είναι ο PGRMC1, ένας γνωστός υποδοχέας ο οποίος είχε ήδη συσχετιστεί με τον καρκίνο. Ο PGRMC1 μπορεί να εντοπίζεται στη φωσφορυλιωμένη ή μη φωσφορυλιωμένη του μορφή σε διάφορους τύπους καρκίνου, ενώ καταφέρνει να εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των

καρκινικών κυττάρων λόγω της αλληλεπίδρασής του με διάφορα μόρια όπως η Insig-1, η PAIR-BP1 και οι πρωτεΐνες του P450. [28]

4.6. Πληροφορίες για PGRMC1

Ο PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 195 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 21,6kDa. Σε υποκυτταρικό επίπεδο εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και στο ΕΔ. Ανήκει στην οικογένεια του κυτοχρώματος b5 καθώς διαθέτει μία αντίστοιχη δομή και στην υποοικογένεια των MAPR (membrane-associated progesterone receptor) πρωτεϊνών. Το μόριο όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 5 διαθέτει θέση σύνδεσης της αίμης, μία δομή που συμβάλει στο διμερισμό της πρωτεΐνης καθώς η αίμη σταθεροποιεί τα γειτονικά μονομερή. Ο διμερισμός της πρωτεΐνης είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδρασή της με το κυτόχρωμα P450 και πιθανόν σχετίζεται και με την αντι-αποπτωτική της δράση.



Εικόνα 5: Ο διμερισμός του PGRMC1 με τη βοήθεια της αίμης. [29]

Πιο συγκεκριμένα, το μόριο είναι αγκυροβολημένο στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας διαμεμβρανικής έλικας που εντοπίζεται στο αμινοτελικό του άκρο με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και με το κυτόχρωμα P450. Μέσα από μελέτες έχει βρεθεί επίσης πως ο PGRMC1 επιδέχεται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ακετυλίωση, ουβικουιλίνωση και σουμοϋλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης, διαδικασίες που επηρεάζουν τη λειτουργία του. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον PGRMC1 εδράζεται στο Χ χρωμόσωμα (Χq22-q24) και από αυτό εκτός από τον PGRMC1 προκύπτει μέσω εναλλακτικού ματίσματος και μία άλλη ισομορφή που αποτελείται από 143 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 15,8 kDa. [29], [30], [31]

4.7. Ο ρόλος του PGRMC1

Ο PGRMC1 είναι ένα πολυλειτουργικό μόριο καθώς συμμετέχει σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η ρύθμιση του κυτοχρώματος P450, η μεταφορά κυστιδίων, η στεροειδογένεση, η ρύθμιση της μιτωτικής ατράκτου και του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της χημειοανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων καθώς και η ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από την προγεστερόνη. Η ικανότητα του PGRMC1 να εμπλέκεται σε τόσες κυτταρικές διαδικασίες σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ικανότητα σύνδεσής του με μόρια αίμης καθώς και με την παρουσία της δομής cytb5, μέσω της οποίας μπορεί και αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη του ΕΔ που προβάλλει στο κυτταρόπλασμα. Μέσω της cytb5 ο PGRMC1 μπορεί και αλληλεπιδρά με ένζυμα του κυτοχρώματος P450, ρυθμίζοντας έτσι την ενεργότητά τους. Η αλληλεπίδραση του μορίου με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 προϋποθέτει το διμερισμό του γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό και για την επαγωγή της χημειοανθεκτικότητας.

Ειδικότερα η ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στη δοξορουμισίνη επάγεται από τον PGRMC1, καθώς διεγείρει την αποικοδόμηση του φαρμάκου μέσω των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, υποδεικνύοντας την πιθανή αντι-αποπτωτική του δράση. Σημαντικές μελέτες έχουν υποδείξει τον κρίσιμο ρόλο του PGRMC1 στη στεροειδογένεση καθώς πολλά μέλη της οικογένειας των SREBP πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SCAP και το INSIG1 στο ΕΔ σχηματίζονταν ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο περιλαμβάνει και τον PGRMC1. Το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο ρυθμίζει τη λιπογένεση των λιπαρών οξέων

μέσω της πρωτεΐνης SREBP-1 αλλά και τη σύνθεση χοληστερόλης μέσω του SREBP-2 καθώς επάγει το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος οδηγώντας στην παραγωγή ισοπρενίου και στερόλης. Τα στεροειδή συντίθεται από χοληστερόλη και όπως αποδεικνύεται ο PGRMC1 ρυθμίζει τη διαδικασία αυτή στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και στα επινεφρίδια. Έτσι ο PGRMC1 διατηρεί την ομοιόσταση της χοληστερόλης καθώς επάγει την ενσωμάτωσή της στις μεμβράνες των κυττάρων.

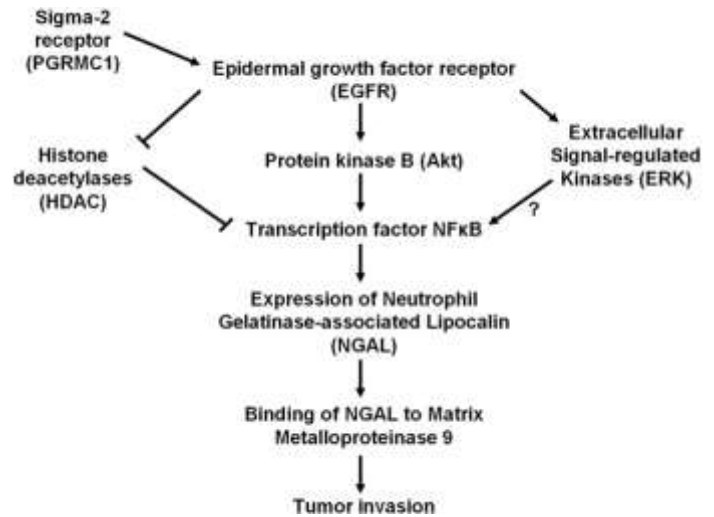
Μία άλλη λειτουργία του PGRMC1 είναι η εμπλοκή του στη μεταγωγή σημάτων παρουσία προγεστερόνης λειτουργώντας ως υποδοχέας προγεστερόνης. Συγκεκριμένα παρουσία προγεστερόνης ο πιθανός αυτός υποδοχέας ανταγωνίζεται τη δράση των οιστρογόνων, διεγείρει την αντι-αποπτωτική σηματοδότηση ενώ ενισχύει και την ανθεκτικότητα διαφόρων κυτταρικών τύπων σε ενώσεις όπως η συσπλατίνη, η δοξορουμπισίνη και η καμπτοθεσίνη. Κατά την ανάπτυξη των κυττάρων Purkinje στην παρεγκεφαλίδα ο υποδοχέας λειτουργεί ως ανιχνευτής της προγεστερόνης ενώ επάγει και τη σύνθεσή της από χοληστερόλη. Αντίστοιχος είναι ο ρόλος του και στην ανάπτυξη των ωοθηκών όπου εκεί η έκφραση του υποδοχέα έχει συσχετιστεί με διάφορες διαταραχές όπως η στειρότητα και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Πολλές μελέτες έχουν εστιαστεί επίσης στην ικανότητα του υποδοχέα να επάγει τη μεταφορά κυστιδίων καθώς στο μόριό του περιέχονται μοτίβα ITAMs μέσω των οποίων επάγει την ενδοκύττωση μεμβρανικών υποδοχέων αλλά και την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο περίβλημα των κυστιδίων με άλλα μόρια. Έτσι ο υποδοχέας διαμορφώνει τα μόρια της κυτταρικής μεμβράνης ενώ κατευθύνει και τη μεταφορά των κυστιδίων στη συναπτική σχισμή μεταξύ των νευρώνων. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα για το ρόλο του υποδοχέα στη διαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης αποτελεί ο υποδοχέας GLP-1 (glucagon-like peptide-1 receptor) του οποίου η μεταφορά στη μεμβράνη των β-κυττάρων του παγκρέατος προϋποθέτει την αλληλεπίδρασή του με τον PGRMC1 προκειμένου να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα και η έκκριση ινσουλίνης ως απόκριση στο GLP-1.

Τέλος, σημαντικός κρίνεται και ο ρόλος του PGRMC1 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς εμπλέκεται στη σταθεροποίηση της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της φάσης M του κυτταρικού κύκλου. Μελέτες συνεντοπισμού υποδεικνύουν την ταυτόχρονη παρουσία του PGRMC1 και της μιτωτικής κινάσης aurora B στη mid-zone της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της μίτωσης, γεγονός που επαληθεύει τον ρόλο του υποδοχέα στη διαμόρφωση των μικροσωληνίσκων και κατ' επέκταση τον ρόλο του στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. [31]

4.8. Ο ρόλος του PGRMC1 στον καρκίνο

Εδώ και αρκετές δεκαετίες το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στο ρόλο του PGRMC1 στην παθολογία του καρκίνου. Σε πολλούς τύπους καρκίνου μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται ο καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του τραχήλου, του μαστού και του θυροειδούς έχει παρατηρηθεί μία αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα αυτού τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε επίπεδο RNA. Η εμπλοκή του υποδοχέα σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες τον καθιστούν υπεύθυνο για την ανάπτυξη καρκίνου. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν υποδείξει την εμπλοκή του υποδοχέα στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία, στην ικανότητα διήθησης των καρκινικών κυττάρων αλλά και την εμπλοκή του στη διαδικασία της μετάστασης. Ο PGRMC1 ενισχύει την αντοχή των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι την επιβίωσή τους, καθώς επάγει την αποικοδόμηση των φαρμάκων αυτών μέσω της ενεργοποίησης των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό του PGRMC1 είναι η ικανότητά του να διεγείρει τον EGFR, έναν υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης ο οποίος διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην επαγωγή ογκογονιδίων (εικόνα 6). Η σίγηση του PGRMC1 οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης του EGFR αλλά και της AKT και ERK, που είναι κινάσες που εντοπίζονται καθοδικά του EGFR, με αποτέλεσμα να μην επάγεται η έκφραση ογκογονιδίων.

Επιπρόσθετες μελέτες έχουν αποδείξει πως η σίγηση του PGRMC1 μειώνει επίσης την ανάπτυξη των όγκων και τη μεταστατική τους ικανότητα ενώ αυξάνει την ευαισθησία τους σε χημειοθεραπευτικά. Η επώαση καρκινικών κυττάρων με τον αναστολέα του PGRMC1, AG-205 μειώνει την ενεργότητα της ERK και παρεμποδίζει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S με αποτέλεσμα να μειώνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών. Επίσης η αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων μπορεί να επαχθεί και μέσω του μονοξειδίου του άνθρακα το οποίο παράγεται κατά την οξειδωτική αποικοδόμηση της αίμης, μια διαδικασία που καταλύεται από την οξυγενάση-1 της αίμης (HO-1). Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) επάγει τη διάσπαση του PGRMC1 στα μονομερή του, φαινόμενο που τον καθιστά μη λειτουργικό.



Εικόνα 6: Ο ρόλος του sigma2 στον καρκίνο. [36]

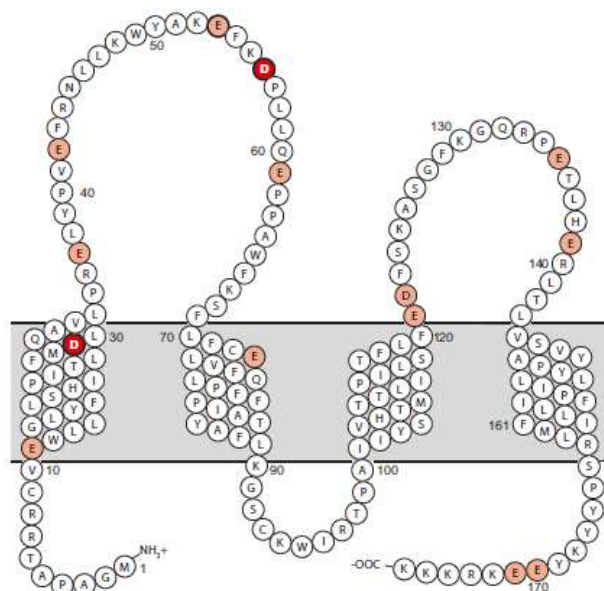
Μελέτες έχουν διαπιστώσει επίσης την παρουσία της ουβικουιτινομένης μορφής του PGRMC1 στο εξωκυττάριο στρώμα καρκινικών πνευμονικών κυττάρων. Η ουβικουιτίνωση αλλά και η σουμοϋλύωση του υποδοχέα τον καθιστά ικανό να εκκρίνεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου με τη βοήθεια μικροκυστιδίων, μία διαδικασία ιδιαίτερα σημαντική για την ανταλλαγή πρωτεϊνών, λιπιδίων, RNA και διαφόρων άλλων συστατικών του κυτταροπλάσματος μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Είναι λοιπόν σαφές πως ο PGRMC1 επάγει διάφορες κυτταρικές διαδικασίες που διευκολύνουν ή ενισχύουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων ωστόσο απαιτούνται ακόμα περισσότερες μελέτες προκειμένου να γίνει σαφέστερη η λειτουργία και η εμπλοκή του στις διαδικασίες ογκογένεσης. [31]

4.9. TMEM97 και sigma2 υποδοχείς

Μέσα από διάφορες μελέτες σύνδεσης είχαν γίνει γνωστά εδώ και αρκετές δεκαετίες, ορισμένα από τα χαρακτηριστικά του sigma2 υποδοχέα όπως η υψηλή συγγένειά του για τη DTG (di-o-tolylguanidine) και την αλλοπεριδόλη (haloperidol) και η χαμηλή συγγένειά του για τις βενζομορφάνες. Έτσι λοιπόν η επιστημονική κοινότητα θεώρησε πως ο PGRMC1, μιας και είχε παρόμοια χαρακτηριστικά, ήταν ο sigma2. Ωστόσο, ορισμένες αντιφάσεις σχετικά με την παραπάνω υπόθεση ώθησαν τους ερευνητές σε περαιτέρω μελέτες προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως η σχέση του PGRMC1 με το sigma2. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές παρατήρησαν πως η υπερέκφραση του PGRMC1 δεν οδηγούσε σε αύξηση των επιπέδων σύνδεσης των sigma2 προσδετών ενώ και σε περιπτώσεις σίγησης του PGRMC1 η ικανότητα σύνδεσης των sigma2 προσδετών δεν μεταβάλλονταν. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο sigma2 και ο PGRMC1 είναι δύο διαφορετικά και ανεξάρτητα μόρια. Πολύ πρόσφατα, μόλις το 2017, δημοσιεύθηκε μία ανατρεπτική έρευνα που πρότεινε τον TMEM97 ως τον sigma2 υποδοχέα. Η έρευνα αυτή υποδείκνυε πως η σίγηση του TMEM97 μείωνε τα επίπεδα έκφρασης του sigma2 ενώ μελέτες σύνδεσης έδειξαν πως ο TMEM97 και ο sigma2 είχαν όμοια συγγένεια σύνδεσης για διάφορους sigma2 προσδέτες των οποίων η συγγένεια ως προς τον sigma2 αναφέρονταν ήδη στη βιβλιογραφία. [32]

4.10. Δομή και λειτουργία του TMEM97

Ο TMEM97 (Transmembrane Protein 97) ή MAC30 (Meningioma-Associated Protein 30) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 176 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 20,8kDa. [30], [33] Το μόριο φέρει 4 διαμεμβρανικές περιοχές που συνδέονται μεταξύ τους μέσω 2 εξωκυττάρων βρόγχων ενώ το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό του άκρο εντοπίζεται στο κυτοσόλιο (εικόνα 7). Φέρει επίσης το μοτίβο KRKKK στο καρβοξυτελικό του άκρο μέσω του οποίου μπορεί και αλληλεπιδρά με το ΕΔ αλλά και το μοτίβο EXPERA, γεγονός που υποδεικνύει την εμπλοκή του στη ρύθμιση της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, συνδέεται με τον NPC1, έναν λυσοσωμικό μεταφορέα χοληστερόλης ρυθμίζοντας έτσι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα χοληστερόλης.[32] Στα επιθηλιακά κύτταρα των ωθηκών έχει βρεθεί πως ο TMEM97 διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό λιπιδίων και χοληστερόλης καθώς συμπεριλαμβάνεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι που διεγείρεται από προγεστερόνη.



Εικόνα 7: Η δομή του TMEM97. [32]

Άλλες μελέτες παρουσιάζουν τον γονίδιο του TMEM97 ως ένα μη-ερυθροποιητικό γονίδιο το οποίο εκφράζεται στο εμβρυϊκό ήπαρ αλλά όχι στο ήπαρ των ενηλίκων, γεγονός που υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο του μορίου αυτού στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση του ήπατος. [33] Ο TMEM97 εντοπίζεται στο ΕΔ, στην πυρηνική και πλασματική μεμβράνη καθώς και στο κυτοσόλιο. Τα αμινοξικά κατάλοιπα Asp29 και Asp56, μέσα από μελέτες μεταλλαξιγένεσης, βρέθηκε πως είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση των προσδετών του. [32] Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TMEM97 εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q11.2 και από αυτό προκύπτουν και άλλες 3 ισομορφές του TMEM97 όπου η πρώτη αποτελείται από 118 αμινοξικά κατάλοιπα (13,2kDa), η δεύτερη από 69 (8,2kDa), και η τρίτη από 92 (11kDa). [30],[33]

4.11. Ο ρόλος του TMEM97 στον καρκίνο

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στο ρόλο του TMEM97 στην ανάπτυξη αλλά και στην εξάπλωση του καρκίνου καθώς έχει διαπιστωθεί πως η έκφρασή του είναι σημαντικά αυξημένη σε ορισμένους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, έρευνες έχουν αποδείξει την υπερέκφραση του TMEM97 στον καρκίνο του μαστού, του οισοφάγου, του παχέος εντέρου, των ωθηκών και του στομάχου όπου σε αυτούς τους τύπους καρκίνου ο TMEM97 πιθανότατα σχετίζεται με το μέγεθος των όγκων, τη μετάσταση αλλά και με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών.[33], [34] Στον καρκίνο του ορθού η έκφραση του TMEM97 έχει συσχετιστεί με μεταστάσεις και με χαμηλή βιωσιμότητα ασθενών. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η κυτταροπλασματική του έκφραση ήταν υψηλότερη σε σημεία μεταστάσεων και πιο συγκεκριμένα στους λεμφαδένες σε σχέση με την έκφρασή του στην αρχική εστία του όγκου και στους φυσιολογικούς ιστούς. Στον καρκίνο των ωθηκών η υπερέκφραση του TMEM97 έχει συσχετιστεί επίσης με μεταστάσεις σε λεμφαδένες.

Σε καρκινικά κύτταρα εγκεφάλου έχει βρεθεί πως η σίγηση του TMEM97 μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου συμβαίνει λόγω μειωμένης έκφρασης της κυκλίνης B1, E, CDK2 και CDK4 που αποτελούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Η

μείωση της έκφρασης του TMEM97 σε καρκινικά κύτταρα στομάχου οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού αλλά και της κινητικότητας των καρκινικών αυτών κυττάρων λόγω της μειωμένης φωσφορυλίωσης της Akt. Επίσης τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 μειώνουν τη διηθητική και μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων λόγω της μειωμένης έκφρασης της κυκλίνης B1 και της WAVE2. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την εμπλοκή του μορίου αυτού στην ανάπτυξη αλλά και στην επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων του στομάχου και του εγκεφάλου.

Σε ορισμένους τύπους καρκίνου, η υπερέκφραση του TMEM97 φαίνεται πως σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία (platinum-based chemotherapy). Ειδικότερα, ο Chen και οι συνεργάτες του έδειξαν πως μόλις το 4% των ασθενών που έπασχαν από NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) και είχαν αυξημένη έκφραση του TMEM97 ανταποκρίνονται στη θεραπεία με πλατίνα, έναντι του 65% των ασθενών που είχαν μειωμένη έκφραση του TMEM97.

Αν και η έκφραση του TMEM97 φαίνεται να είναι σημαντικά αυξημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου, στη περίπτωση του παγκρεατικού και του νεφρικού καρκίνου τα επίπεδα έκφρασής του είναι μειωμένα σε μεγάλο βαθμό. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει πως η έκφραση του TMEM97 μπορεί να επάγεται από γονίδια όπως το BRCA1 αλλά και να καταστέλλεται από κάποια άλλα όπως από το γονίδιο p53, δεδομένα που υποδεικνύουν πως το γονίδιο του TMEM97 απορυθμίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου. Εκτενείς έρευνες πάνω στον καρκίνο του παγκρέατος έχουν διαπιστώσει πως το 75% των ασθενών εμφανίζει μειωμένη ή και μηδενική έκφραση του TMEM97 σε πρωτεϊνικό επίπεδο ενώ σε επίπεδο RNA το 50% των ασθενών εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης, το 30% δεν παρουσιάζει κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασής του και το 20% εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την έκφραση του μορίου αυτού σε φυσιολογικούς ιστούς. Έτσι λοιπόν, η έκφραση του TMEM97 εμφανίζει μία σημαντική ετερογένεια με τα επίπεδα έκφρασής του να διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφόρων καρκινικών τύπων. Επίσης το μόριο μπορεί να δρα ποικιλοτρόπως με αποτέλεσμα ο ρόλος του στον πολλαπλασιασμό αλλά και στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων να διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους τύπους καρκίνου. [35]

4.12. Νέα δεδομένα σχετικά με τους *sigma2* υποδοχείς

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία δεδομένα σχετικά με την ταυτοποίηση του *sigma2* υποδείκνυαν πως ο υποδοχέας αυτός ήταν πιθανότητα ο TMEM97 και όχι ο PGRMC1. Ωστόσο, πριν ελάχιστες εβδομάδες, δημοσιεύθηκε μία νέα έρευνα σχετικά με τον αμφιλεγόμενο αυτό υποδοχέα η οποία μέσα από μελέτες σύνδεσης προσδεδών αλλά και από μελέτες σίγησης γονιδίων προσπάθησε να αποσαφηνίσει τη σχέση του TMEM97 και του PGRMC1 με τον *sigma2*. Πιο συγκεκριμένα, η δημοσίευση αναφέρει πως ο TMEM97 μπορεί και αλληλεπιδρά με τον PGRMC1 και τον LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) σχηματίζοντας ένα τριμερές σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη γρήγορη ενδοκύττωση της LDL στα καρκινικά κύτταρα HeLa. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει πως ο TMEM97 σχετίζεται με τον PGRMC1 και δεν είναι δύο ανεξάρτητα και άσχετα μεταξύ τους μόρια. Βασιζόμενοι οι ερευνητές στο ότι οι *sigma2* προσδέτες επάγουν των κυτταρικό θάνατο μέσω μιας εξαρτώμενης ή μη-εξαρτώμενης από κασπάσες διαδικασία αλλά και μέσα από την παραγωγή ROS και τη δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων, πραγματοποίησαν μελέτες απαλοιφής (knockout) του TMEM97, του PGRMC1 ή ταυτόχρονα και των δύο πρωτεϊνών προκειμένου να αξιολογήσουν τη συγγένεια των *sigma2* προσδεδών. Από τις μελέτες τους αυτές βρήκαν πως η απαλοιφή του TMEM97, του PGRMC1 ή ταυτόχρονα και των δύο πρωτεϊνών δεν επηρέαζε το EC₅₀ των *sigma2* αγωνιστών και άρα η κυτταροτοξικότητα αυτών των προσδεδών δεν επάγονταν από καμία από τις δύο πρωτεΐνες και ούτε κάποια από αυτές τις πρωτεΐνες ήταν υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των κασπασών.

Στη συνέχεια, η ίδια ομάδα εξέτασε εάν η κυτταροτοξικότητα επάγονταν μέσω του sigma1 καθώς οι sigma2 προσδέτες εμφανίζουν συγγένεια και με τους sigma1 υποδοχείς, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν φάνηκε να συμβαίνει. Μέσα από περαιτέρω μελέτες, διαπιστώθηκε πως η siramesine, η SW43 και το PB28 επάγουν τον κυτταρικό θάνατο καθώς συσσωρεύονται στα λυσοσώματα και αυξάνουν το pH των λυσοσωμάτων. Επίσης η siramesine μειώνει την ενεργότητα της λυσοσωμικής καθεψίνης (lysosomal cysteine cathepsin) καθώς και τη συνολική σταθερότητα των λυσοσωμάτων ενώ επάγει την παραγωγή ROS όπως και η SW43 και το PB28. Έτσι λοιπόν, έγινε σαφής ο τρόπος με τον οποίο οι sigma2 προσδέτες επάγουν τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

Τέλος στη δημοσίευση αναφέρεται πως η απαλοιφή των πρωτεϊνών επηρεάζει την ενδοκύττωση των sigma2 προσδετών μια διαδικασία που ίσως πραγματοποιείται από τον ίδιο μηχανισμό που εμπλέκεται και στην ενδοκύττωση της LDL, δηλαδή μέσω του συμπλόκου LDLR/TMEM97/PGRMC1. Συνοψίζοντας λοιπόν, η ταυτοποίηση του sigma2 δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή καθώς υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν πως ο sigma2 είναι ο PGRMC1 αλλά και έρευνες που αποδεικνύουν πως είναι ο TMEM97. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητες περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διαλευκανθεί η υπόθεση του sigma2 ενώ αναμένεται και η κρυσταλλική του δομή που θα φέρει νέες πληροφορίες στο προσκήνιο. [34]

B. ΣΚΟΠΟΣ

Ενδείξεις για την εμπλοκή των sigma υποδοχέων και κυρίως των sigma-2 υποδοχέων στην ανάπτυξη αλλά και στην εξάπλωση του καρκίνου, αποτέλεσαν το έναυσμα για τη μελέτη της έκφρασης αυτών των υποδοχέων στον καρκίνο του παγκρέατος. Έτσι λοιπόν σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των sigma υποδοχέων σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση του sigma-1, του PGRMC1 και του TMEM97 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή εμπλοκή των υποδοχέων αυτών στον καρκίνο του παγκρέατος.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.1. Συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων Attached 021013 και Floating 021013 καθώς και των παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών AsPC1, BxPC3, MIA PaCa-2 και PANC-1 (εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές) που προμηθεύτηκαν από την ATCC. Τα Attached 021013 και Floating 021013 είναι πρωτογενή καρκινικά κύτταρα παγκρέατος, που προέρχονται από ασθενή με καρκίνο του παγκρέατος, τα οποία απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής (Λάρισα). Ξεκίνησαν ως ένας ομοιογενής πληθυσμός καρκινικών κυττάρων, ο οποίος σταδιακά διαφοροποιήθηκε οδηγώντας στη δημιουργία δύο ανεξάρτητων κυτταρικών σειρών. Η μία κυτταρική σειρά αναπτύσσεται προσκολλημένη στον πυθμένα των δοχείων καλλιέργειας (Attached 021013) ενώ η άλλη στο θρεπτικό μέσο ως εναιώρημα (Floating 021013).

Τα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο έρευνας καθώς τα χαρακτηριστικά τους προσομοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο με τα κύτταρα του ασθενούς. Η απομόνωση αλλά και η καλλιέργεια τέτοιων κυττάρων συχνά είναι δύσκολη και απαιτεί περισσότερο χρόνο. Ειδικότερα ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι μικρότερος σε σχέση με τον ρυθμό ανάπτυξης εγκαθιδρυμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών των οποίων το προφίλ συχνά είναι ελαφρώς τροποποιημένο λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων.

Τα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία (37°C), σταθερή συγκέντρωση CO₂ (5% CO₂) και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες σε εστία νηματικής ροής (hood). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό μέσο (RPMI 1640 medium της Gibco, Cat. No 31870-025) που περιέχει:

- ✓ 5-10% ορό βοοειδούς (Fetal Bovine Serum (FBS) της Biochrom με Cat. No S0115) ο οποίος πριν τη χρήση του απενεργοποιείται με θέρμανση στους 56°C για 30 λεπτά
- ✓ 1% αντιβιοτικό (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη της Biochrom με Cat. No L0022-100) και
- ✓ 1% L-Γλουταμίνη (Gibco Cat. No 25030-024).

Έτσι λοιπόν το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων περιέχει αυξητικούς παράγοντες που ευνοούν και επάγουν τον πολλαπλασιασμό τους, συστατικά που προάγουν την προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα της φλάσκας, αντιβιοτικά για αποφυγή τυχόν μολύνσεων που θα μπορούσαν να καταστρέψουν την καλλιέργεια και L-Γλουταμίνη που είναι ένα σύννηθες αμινοξύ απαραίτητο για την παραγωγή πρωτεϊνών.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αποστειρωμένα δοχεία καλλιέργειας, τις λεγόμενες φλάσκες της Corning® (75cm² UShaped/Product 431464U) όπου υπάρχουν 12ml θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένο με FBS, L-Γλουταμίνη και αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα κύτταρα παρατηρούνται κάθε μέρα στο μικροσκόπιο έτσι ώστε να ελέγχεται συνεχώς η ανάπτυξή τους.

1.2. Ανανέωση θρεπτικού μέσου

Κάθε 2-3 ημέρες πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού μέσου έτσι ώστε να απομακρύνονται οι τοξίνες και τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων και να διεξάγεται ομαλώς η ανάπτυξή τους. Στα κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα στον πυθμένα της φλάσκας, η ανανέωση του θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται ως εξής:

1. Απόρριψη του μεταβολισμένου θρεπτικού με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πιπέτας.
2. Ξέπλυμα της φλάσκας με 2-3ml ισότονο διάλυμα PBS 1x.
3. Απόρριψη του PBS και προσθήκη 12ml φρέσκου θρεπτικού.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες.

❖ PBS 10x (Phosphate Buffered Saline): είναι ένα ισότονο διάλυμα που ενδείκνυται για κυτταροκαλλιέργειες και παρασκευάζεται από κάψουλες οι οποίες διαλύονται σε απιονισμένο νερό οδηγώντας στη δημιουργία του διαλύματος PBS 10x. Το PBS 10x αραιώνεται σε απιονισμένο νερό με αποτέλεσμα την παρασκευή του PBS 1x.

1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (subculturing /passaging) των κυττάρων προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός τους ώστε να επιτρέπεται η ομαλή ανάπτυξή τους. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν αρκετά και καλύψουν το μεγαλύτερο μέρος της φλάσκας τότε ο ρυθμός ανάπτυξής τους σταδιακά μειώνεται λόγω περιορισμένου χώρου. Για να αποφευχθεί η αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων μεταφέρουμε τα κύτταρα σε περισσότερες φλάσκες μειώνοντας έτσι την συγκέντρωσή τους.

Κατά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων:

1. Απορρίπτεται το θρεπτικό μέσο που υπάρχει στη φλάσκα με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας.
2. Ξεπλένεται η φλάσκα με PBS 1x.
3. Αποχύνεται το PBS και προστίθενται 1-2ml τρυψίνης ανάλογα με το μέγεθος του δοχείου καλλιέργειας
4. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 3-5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η ενεργοποίηση του ενζύμου.
5. Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ξεκόλλησαν από τον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας.

❖ Διάλυμα τρυψίνης 10x σε EDTA: προμηθεύεται από την εταιρία Biochrom με Cat. No L2153 και αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 1x με τη χρήση PBS 1x. Η τρυψίνη είναι μία πρωτεάση σερίνης που υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς συμβάλλοντας στην αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας.

6. Εάν τα κύτταρα ξεκόλλησαν τότε προστίθεται στη φλάσκα μια μικρή ποσότητα θρεπτικού 2-3ml που λόγο του ορού που περιέχει αναστέλλει τη δράση του ενζύμου. Σε περίπτωση που τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα στον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας και μετά το πέρας των 3-5 λεπτών τότε η επώασή τους παρατείνεται για λίγα ακόμη λεπτά.
7. Στο δοχείο καλλιέργειας κρατάτε ένα μέρος του εναιωρήματος των κυττάρων και το υπόλοιπο απορρίπτεται ή μεταφέρεται σε άλλο δοχείο καλλιέργειας ή αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση μέσω μιας διαδικασίας που αναλύεται παρακάτω.
8. Προστίθεται στο δοχείο καλλιέργειας φρέσκο θρεπτικό μέχρι τον τελικό όγκο των 12ml.
9. Το δοχείο καλλιέργειας επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο.

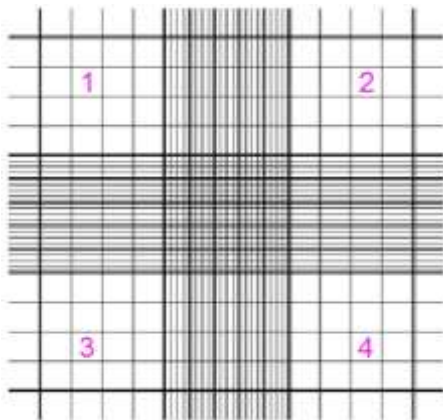
1.4. Ανανέωση θρεπτικού μέσου και ανακαλλιέργεια κυττάρων που αναπτύσσονται ως εναιώρημα

Για τα κύτταρα που αναπτύσσονται ως εναιώρημα, η ανανέωση του θρεπτικού τους μέσου και η ανακαλλιέργειά τους πραγματοποιείται ως εξής:

1. Με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πιπέτας το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε ένα σωλήνα φυγοκέντησης τύπου falcon των 15ml ή των 50ml.
2. Το εναιώρημα των κυττάρων περνάτε από σύριγγα 21G ώστε τυχόν συσσωματώματα κυττάρων να διαλυθούν.
3. Από το εναιώρημα λαμβάνονται 90μl τα οποία τοποθετούνται σε μικρό σωληνάριο τύπου errendorf των 1,5ml.
4. Στο μικρό αυτό σωληνάριο προστίθενται 10μl μπλε χρωστικής (trypan blue) η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα με αποτέλεσμα όταν αυτά παρατηρούνται στο μικροσκόπιο να έχουν μπλε χρώμα.
5. Η μπλε χρωστική αναμειγνύεται με το εναιώρημα των κυττάρων στο δοχείο των 1,5ml.
6. Λαμβάνονται 50μl από το παραπάνω διάλυμα τα οποία τοποθετούνται σε ένα πλακίδιο που ονομάζεται αιμοκυτταρόμετρο "Neubauer Improved" πάνω στο οποίο βρίσκεται τοποθετημένη μία καλυπτρίδα. Συγκεκριμένα το διάλυμα τοποθετείτε ανάμεσα από το πλακίδιο και την καλυπτρίδα.
7. Το πλακίδιο μεταφέρεται στο μικροσκόπιο και γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων.
8. Υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων που περιέχονται στο σωλήνα φυγοκέντησης.
9. Ο σωλήνας τύπου falcon φυγοκεντρείται στις 1200 στροφές για 5-10 λεπτά με αποτέλεσμα την καθίζηση των κυττάρων.
10. Ο σωλήνας μεταφέρεται σε ασηπτικές συνθήκες και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
11. Προστίθεται φρέσκο θρεπτικό στο σωλήνα και τα κυττάρων διαλυτοποιούνται σε αυτό. Η ποσότητα του θρεπτικού που προστίθεται πρέπει να οδηγεί σε τελική συγκέντρωση κυττάρων 600.000 κύτταρα/ml.
12. Το εναιώρημα κυττάρων μεταφέρεται σε δοχείο καλλιέργειας.
13. Το δοχείο καλλιέργειας επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο.

1.5. Καταμέτρηση κυττάρων

Η καταμέτρηση κυττάρων όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιείται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρομέτρου "Neubauer Improved" (πλακίδιο) πάνω στο οποίο βρίσκεται τοποθετημένη μια καλυπτρίδα. Ανάμεσα από το πλακίδιο και την καλυπτρίδα τοποθετείται το διάλυμα των κυττάρων που παρασκευάζεται όπως περιγράφεται παραπάνω (90μl κυτταρικού εναιωρήματος και 10μl χρωστικής). Το πλακίδιο φέρει ευθείες γραμμές οι οποίες το διαχωρίζουν σε 4 μεγάλα τετράγωνα όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 8. Αφού το πλακίδιο τοποθετηθεί στο μικροσκόπιο, καταμετρώνται τα ζωντανά κύτταρα που εντοπίζονται μέσα στα 4 μεγάλα τετράγωνα. Ο αριθμός που προκύπτει διαιρείται με το 4 και το πηλίκο πολλαπλασιάζεται με το 10.000 με αποτέλεσμα να προκύπτει ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος. Για



Εικόνα 8: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer Improved.

να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός των ζωντανών κυττάρων που εντοπίζονται σε ένα δοχείο καλλιέργειας, ο αριθμός των κυττάρων/ml εναιωρήματος πολλαπλασιάζεται με τον συνολικό όγκο του εναιωρήματος του δοχείου καλλιέργειας.

Για να υπολογιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών (άσπρα & λαμπερά) αλλά και των νεκρών κυττάρων δηλαδή των κυττάρων που φέρουν μπλε χρώμα. Έπειτα ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων διαιρείται με το άθροισμα των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Το πηλίκο που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με το 100 έτσι η βιωσιμότητα των κυττάρων εκφράζεται με το % (π.χ. 85%). Από τη βιωσιμότητα των κυττάρων μπορούμε να αντιληφθούμε την κατάσταση των κυττάρων μας εάν δηλαδή αναπτύσσονται ή σταδιακά πεθαίνουν.

1.6. Εξάπλωση κυττάρων (*spread*)

Ορισμένες φορές τα κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα στον πυθμένα της φλάσκας, κατά την ανάπτυξή τους συσσωρεύονται σε ένα σημείο γεγονός που δυσχεραίνει την πρόσληψη θρεπτικών και οξυγόνου με αποτέλεσμα σταδιακά να πεθαίνουν και να αποκολλώνται από των πυθμένα της φλάσκας. Σε αυτές τις περιπτώσεις ακολουθούμε τη διαδικασία της εξάπλωσης των κυττάρων προκειμένου να επιτύχουμε μία ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στο εσωτερικό της φλάσκας. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Απορρίπτουμε το θρεπτικό μέσο που προϋπάρχει στη φλάσκα.
2. Ξεπλένουμε τη φλάσκα με 2-3ml PBS 1x.
3. Πετάμε το PBS και προσθέτουμε 2ml τρυψίνης 1x.
4. Μεταφέρουμε τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο (37°C) για 3-5 λεπτά μέχρι τα κύτταρα να αποκολληθούν από τη φλάσκα.
5. Προσθέτουμε 10ml φρέσκου θρεπτικού και αναδεύουμε το κυτταρικό εναιώρημα.
6. Επιστρέφουμε τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο.

1.7. Κατάψυξη κυττάρων

Η κατάψυξη κυττάρων πραγματοποιείται στους -80°C προκειμένου τα κύτταρα να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση, μία διαδικασία που περιλαμβάνει τα εξής:

1. Παρασκευή του διαλύματος κατάψυξης (*freezing medium*) που περιέχει 90% FBS και 10% DMESO (Dimethylsulfoxide 99.8%). Το DMESO λειτουργεί ως κρυο-προστατευτικός παράγοντας καθώς επιβραδύνει την ψύξη αποτρέποντας την καταστροφή των κυττάρων.
2. Μεταφορά των κυττάρων από τη φλάσκα σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης έπειτα από την θρυψινοποίησή τους.
3. Μέτρηση κυττάρων και υπολογισμός των κυττάρων που πρόκειται να καταψυχθούν.
4. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές με αποτέλεσμα την καθίζηση των κυττάρων στον πάτο του σωλήνα.
5. Απόρριψη του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων έπειτα από την προσθήκη μέσου κρυοσυντήρησης (*freezing medium*). Η ποσότητα του *freezing medium* που προστίθεται εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων που πρόκειται να καταψυχθούν. Συγκεκριμένα για κάθε 4-5 εκατομμύρια κύτταρα χρησιμοποιείται 1ml *freezing medium*. Το *freezing medium* θα πρέπει να χρησιμοποιείται κρύο ώστε να μην γίνεται τοξικό για τα κύτταρα.
6. Μεταφορά των κυττάρων που μεταφέρθηκαν σε *freezing medium* σε ένα δοχείο αποθήκευσης ανθεκτικό στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (*cryovial*).
7. Αποθήκευση και διατήρηση των κρυοφιαλιδίων σε καταψύκτη -80°C. Η αποθήκευση κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα πραγματοποιείται στο υγρό άζωτο. Σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα

παραμένουν στον καταψύκτη των -80°C για περίπου μία ημέρα και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ειδικά δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο.

1.8. Απόψυξη κυττάρων

Για να πραγματοποιηθεί η επαναημεροποίηση κυττάρων που έχουν καταψυχθεί στο παρελθόν ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Τα δοχεία που περιέχουν τα κύτταρα μεταφέρονται γρήγορα από τους -80°C ή από το υγρό άζωτο στο υδατόλουτρο δηλαδή στους 37°C και αναδεύονται έντομα μέχρι να γίνει η απόψυξή τους.
2. Τα δοχεία μεταφέρονται σε στείρες συνθήκες και το περιεχόμενό τους τοποθετείται μέσα σε σωλήνες φυγοκέντρησης.
3. Στους σωλήνες προστίθενται 10ml θρεπτικού μέσου και το περιεχόμενο αναδεύεται ήπια.
4. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στις 1200 στροφές για 10min.
5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 5ml φρέσκου θρεπτικού.
6. Το κυτταρικό εναιώρημα επιστρέφεται σε φλάσκα των 15cm^2 .
7. Προστίθεται στη φλάσκα επιπλέον ορός μέχρι την τελική συγκέντρωση των 10%.
8. Η φλάσκα επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο.

2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες κατά την οποία ένα μείγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται με βάση το μοριακό του βάρος. Οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσα σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο το οποίο εφαρμόζεται στα άκρα του πηκτώματος με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους.

2.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Το gel πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μικρότερα πηκτώματα: την πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating ή running gel). Η πηκτή συσσώρευσης/επιστοίβαξης έχει $\text{pH} = 6,8$ και χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (π.χ. 5% ακρυλαμίδης) με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες κατά το πέρασμά τους από την πηκτή να πακετάρονται χωρίς να ξεκινά ο διαχωρισμός τους. Οι πρωτεΐνες μετακινούνται με την ίδια ταχύτητα στο εσωτερικό του πηκτώματος με αποτέλεσμα να ξεκινά ταυτόχρονα η μετακίνησή τους στο εσωτερικό της πηκτής διαχωρισμού. Η πηκτή διαχωρισμού έχει $\text{pH} 8,8$ και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη (π.χ. 12% ακρυλαμίδης) ώστε οι πρωτεΐνες κατά τη μετακίνησή τους στο εσωτερικό αυτού του πηκτώματος να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Η περιεκτικότητα ακρυλαμίδης στην πηκτή διαχωρισμού ποικίλει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν καθώς ο διαχωρισμός πρωτεϊνών με υψηλό μοριακό βάρος απαιτεί χαμηλότερη περιεκτικότητα ακρυλαμίδης συγκριτικά με την περιεκτικότητα ακρυλαμίδης που απαιτείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με χαμηλότερο μοριακό βάρος. Για την παρασκευή των πηκτωμάτων χρησιμοποιούνται τα διαλύματα που αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συστατικά παρασκευής πηκτωμάτων.

Συστατικά	Πηκτή συσσώρευσης	Πηκτή διαχωρισμού
dH ₂ O	✓	✓
30% Bis-acrylamide	✓	✓
0,5M Tris-HCl	✓	-
1,5M Tris-HCl	-	✓
SDS	✓	✓
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	✓	✓
N,N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)	✓	✓

Τα συστατικά που αναγράφονται στον Πίνακα 1 αναμειγνύονται με αποτέλεσμα την παραγωγή 2 διαλυμάτων. Το διάλυμα από το οποίο θα προκύψει η πηκτή διαχωρισμού είναι αυτό που τοποθετείται πρώτο στο κενό που δημιουργείται μεταξύ δύο τζαμιών. Αφού το διάλυμα πήξει τοποθετείται πάνω από αυτό, το διάλυμα συσσώρευσης καθώς και ειδικά "χτενάκια" τα οποία θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια. Έπειτα από την πήξη και του διαλύματος συσσώρευσης τα χτενάκια αφαιρούνται και σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί "φορτώνονται" τα δείγματα. Κάθε πηγαδάκι αντιστοιχεί σε ένα και μόνο δείγμα.

Το πήξιμο των διαλυμάτων πραγματοποιείται μέσω του πολυμερισμού του μονομερούς ακρυλαμιδίου παρουσία ελεύθερων ριζών. Το υπερθειικό αμμώνιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ελεύθερων ριζών ενώ το TEMED λειτουργεί ως αντιδραστήριο καταλύτης, επιταχύνοντας τη διαδικασία του πολυμερισμού. Έτσι λοιπόν το υπερθειικό αμμώνιο και το TEMED προστίθενται στο τέλος, λίγο πριν τα διαλύματα των πηκτωμάτων τοποθετηθούν στη συσκευή με τα τζαμάκια. Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν πηκτώματα διαχωρισμού με 12% περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη και πηκτώματα συσσώρευσης με 5% περιεκτικότητα ακρυλαμίδης. Η συσκευή προετοιμασίας των πηκτωμάτων απεικονίζεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9: Συσκευή προετοιμασίας πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου. [40]

2.2. Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Η προετοιμασία των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν ξεκινά με την λύση των κυττάρων ή των ιστών μία διαδικασία που αποσκοπεί στην απομόνωση των πρωτεϊνών. Μετά την απομόνωση οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και στην αποδιατεταγμένη τους μορφή φορτώνονται στο πηκτώμα ακρυλαμιδίου ώστε να ξεκινήσει ο διαχωρισμός τους.

Λύση κυττάρων: Ένα από τα αρχικά στάδια της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών είναι η απομόνωσή τους από το εσωτερικό των κυττάρων. Κατά την απομόνωση πρωτεϊνών, η κυτταρική μεμβράνη και οι μεμβράνες των υποκυτταρικών οργανιδίων διαρρηγνύονται με τη βοήθεια ενός διαλύματος λύσης (lysis buffer) που οδηγεί στην αποσταθεροποίησή τους. Με αυτόν τον τρόπο τα συστατικά των κυττάρων διασκορπίζονται στο διάλυμα

λύσης και έπειτα από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις προκύπτει ένα διάλυμα στο οποίο έχουν παραμείνει μόνο οι πρωτεΐνες ενώ όλα τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά (DNA, RNA, λιπίδια κ.α.) καθιζάνουν και απομακρύνονται με ευκολία από το διάλυμα. Έπειτα από κάθε φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες οι υπομελέτη πρωτεΐνες ενώ το ίζημα που περιέχει όλα τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά πετάτε. Όταν τα κύτταρα διασπαστούν και τα κυτταρικά συστατικά αναμειχθούν, υπάρχει κίνδυνος οι πρωτεάσες των κυττάρων να πρωτεολύσουν τις πρωτεΐνες που επιθυμούμε να μελετήσουμε και για το λόγο αυτό απαραίτητη είναι η χρήση αναστολέων πρωτεασών αλλά και φωσφατασών.

Για να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων αρχικά συλλέγονται κύτταρα τα οποία βρίσκονταν για αρκετές ημέρες σε συνθήκες καλλιέργειας. Η συλλογή των κυττάρων περιλαμβάνει στις παρακάτω διαδικασίες:

1. Τρυψινοποίηση των κυττάρων (μία διαδικασία που έχει περιγραφεί αναλυτικότερα παραπάνω).
2. Συλλογή των κυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρησης.
3. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων.
4. Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Διαλυτοποίηση του ιζήματος (όπου περιέχονται τα κύτταρα) σε ισότονο διάλυμα.
6. Επανάληψη των βημάτων 3 και 4 για άλλη μία φορά προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα συστατικά του μέσου καλλιέργειας και κυρίως πρωτεΐνες του ορού.
7. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και συλλογή του ιζήματος.

Για τη λύση των κυττάρων αρχικά υπολογίζεται η ποσότητα του διαλύματος λύσης (για κάθε 10^6 κύτταρα απαιτούνται 100μl διαλύματος λύσης). Το διάλυμα λύσης (T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent) προμηθεύτηκε από την εταιρία Thermo Fisher Scientific (Cat. No: 78510). Στο διάλυμα λύσης προστίθενται οι αναστολείς πρωτεασών (Sigma, C.No.P8340) και φωσφατασών και το διάλυμα προστίθεται στο ίζημα των κυττάρων. Το ίζημα διαλυτοποιείται και ξεκινά η διάσπαση των κυττάρων. Το διάλυμα λύσης όπου πλέον περιέχονται τα κύτταρα διατηρείται για 30min στον πάγο ενώ ανά 5min πραγματοποιείται ανάδευση. Για την αποτελεσματικότερη διάσπαση των κυττάρων συχνά το διάλυμα περνάτε από σύριγγα (μηχανική διάσπαση κυττάρων). Μετά την πάροδο των 30 λεπτών το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 10-20 λεπτά ενώ μετά από κάθε φυγοκέντρηση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα καινούργιο δοκιμαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5ml). Το ίζημα που προκύπτει από κάθε φυγοκέντρηση απορρίπτεται. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές.

Οι αναστολείς φωσφατασών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

- 1) το Sodium orthovanadate (Na_3VO_4) σε συγκέντρωση 1mM,
- 2) η β -Glycerophosphate disodium salt hydrate ($(\text{HOCH}_2)_2\text{CHOP}(\text{O})(\text{ONa})_2$) σε συγκέντρωση 1mM,
- 3) το Sodium fluoride (NaF) σε συγκέντρωση 5-10mM και
- 4) το Sodium pyrophosphate decahydrate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) σε συγκέντρωση 1mM.

Σε ορισμένες περιπτώσεις για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιούνται και υπέρηχοι όπου στη διαδικασία αυτή τα κύτταρα εκτίθενται για ελάχιστα δευτερόλεπτα (5-10sec) σε υπερήχους κυρίως με σκοπό τον κατακερματισμό του DNA. Η έκθεση των κυττάρων σε υπερήχους μπορεί να επαναληφθεί 2-5 φορές ενώ μετά από κάθε επανάληψη ακολουθούν φυγοκεντρήσεις. Έτσι λοιπόν δημιουργείται ένα μείγμα πρωτεϊνών απαλλαγμένο από όλα τα υπόλοιπα συστατικά των κυττάρων. Σημαντικό είναι επίσης να σημειωθεί πως όλες οι παραπάνω διαδικασίες επιτελούνται στον πάγο προκειμένου να αποφευχθεί η αλλοίωση των δειγμάτων.

Λύση ιστών: για την εξαγωγή πρωτεϊνών από ιστούς ακολουθείται μία παρόμοια διαδικασία που επιτελείται και κατά τη λύση κυττάρων. Στην περίπτωση των ιστών αντί για μέτρημα του αριθμού των κυττάρων

πραγματοποιείται ζύγισμα του ιστού. Συγκεκριμένα για κάθε 0,03gr ιστού χρησιμοποιούνται 300μl διαλύματος λύσης. Ο ιστός αφού ζυγισθεί, τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια, τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf (1,5ml), προστίθεται σε αυτόν το διάλυμα λύσης και στη συνέχεια ομογενοποιείται με κατάλληλα μηχανήματα. Μετά την ομογενοποίηση, το δείγμα φυγοκεντρείται και οι πρωτεΐνες απομονώνονται.

Τελική επεξεργασία δειγμάτων/αποδιάταξη πρωτεϊνών: Αφού πραγματοποιηθεί η απομόνωση των πρωτεϊνών, στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθενται ορισμένα συστατικά που συμβάλουν στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει αρχικά τα δημιουργία ενός διαλύματος που ονομάζεται loading buffer 10x. Το διάλυμα αυτό περιέχει 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% κυανού της βρωμοφαινόλης. Η γλυκερόλη προσδίδει βάρος στο δείγμα με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες που περιέχονται σε αυτό να τοποθετούνται καλύτερα στο εσωτερικό των πηγαδιών. Το SDS είναι απορρυπαντικό που συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση των μορίων, η β-μερκαπτοαιθανόλη σπάει δεσμούς θείου (γέφυρες θείου) και το κυανού της βρωμοφαινόλης προσδίδει μπλε χρώμα στο δείγμα με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η οπτικοποίησή του και ο έλεγχος της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης. Αφού παρασκευαστεί το loading buffer 10x, υπολογίζεται ο όγκος των δειγμάτων που πρόκειται να φορτωθεί μέσω της μεθόδου Bradford (αναλύεται στη συνέχεια). Με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford υπολογίζεται ο όγκος που πρέπει να ληφθεί από κάθε δείγμα έτσι ώστε σε κάθε πηγαδάκι να φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεϊνών (20mg πρωτεΐνης).

Έτσι λοιπόν σε σωληνάρια τύπου erpendorf τοποθετείται η κατάλληλη ποσότητα δείγματος και μία ποσότητα PBS 1x προκειμένου όλα τα δείγματα να αποκτήσουν τον ίδιο τελικό όγκο. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθεται loading buffer σε συγκέντρωση 1x και τα δείγματα βράζονται στους 95°C για 5 λεπτά. Ο βρασμός βοηθά στη διάσπαση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και οδηγεί στην πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και στη συνέχεια "φορτώνονται" στα πηγαδάκια.

2.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02A με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής (Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος Running Buffer 1x, το οποίο τοποθετείται στο εσωτερικό της συσκευής μαζί με την πηκτή ακρυλαμίδιου, στα πηγαδάκια της οποίας έχουν φορτωθεί τα δείγματα. Το Running Buffer 1x παρασκευάζεται από dH₂O και Running Buffer 10x. Το Running Buffer 10x αποτελείται από Tris base και γλυκίνη. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται τελικά ο διαχωρισμός ενός μείγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, κατά τη μετακίνησή τους στο εσωτερικό ενός ηλεκτρικού πεδίου.

3. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (WESTERN BLOTTING)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια την ανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών με κατάλληλα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Τα αντισώματα ανάλογα με τον επίτοπο που διαθέτουν μπορούν και προσδένονται εξειδικευμένα σε κάποια περιοχή των πρωτεϊνών, συμβάλλοντας έτσι στην οπτικοποίησή τους. Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες:

- I. Εξισορρόπηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης.
- II. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- III. Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων.

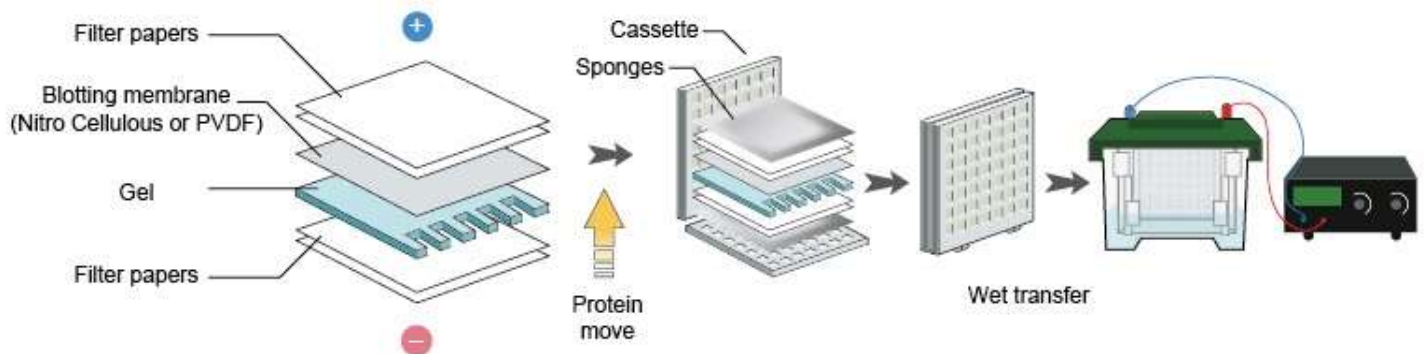
- IV. Επώαση με πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα.
- V. Οπτικοποίηση του σήματος.

3.1. Εξισορρόπηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες από την πηκτή μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κάτι το οποίο προϋποθέτει αρχικά την εξισορρόπηση της μεμβράνης δηλαδή την εμφύσησή της στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer 1x). Το Transfer Buffer 1x παρασκευάζεται από dH₂O, μεθανόλη και Transfer Buffer 10x όπου με τη σειρά του το Transfer Buffer 10x περιέχει γλυκίνη και Tris base. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αρχικά εμφύσηται σε μεθανόλη για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια σε Transfer Buffer 1x, μια διαδικασία που καθιστά τη μεμβράνη προσβάσιμη σε πρωτεΐνες (ενεργοποίηση μεμβράνης). Εκτός από τη μεμβράνη και όλα τα υπόλοιπα υλικά της ηλεκτρομεταφοράς εμφύσηται για 5-10 λεπτά στο Transfer Buffer 1x.

3.2. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη

Μετά την εξισορρόπηση ακολουθεί το στήσιμο των εξαρτημάτων της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς και η προσθήκη Transfer Buffer 1x στο εσωτερικό της. Έπειτα πραγματοποιείται η συναρμολόγηση της κασέτας (sandwich) τοποθετώντας ένα σφουγγαράκι, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann πάνω στο οποίο βρίσκεται η πηκτή, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα χαρτί Whatmann και ένα σφουγγαράκι (εικόνα 10). Τέλος η κασέτα κλείνεται και μαζί με ένα δοχείο πάγου τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Η προσθήκη πάγου στο εσωτερικό της συσκευής είναι απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθεί η αύξηση της θερμοκρασίας του Transfer Buffer που θα μπορούσε να οδηγήσει στην καταστροφή των πρωτεϊνών. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με παροχή ρεύματος σταθερής έντασης για 70 λεπτά με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να μεταφέρονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.



Εικόνα 10: Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. [39]

3.3. Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων

Μετά την ολοκλήρωση του Western blotting η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται σε διάλυμα TTBS 1x που περιέχει 5% (w/v) αποβουτυρωμένο γάλα ή ορό (FBS), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα TTBS 1x παρασκευάζεται από το διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline) με την προσθήκη 1% Tween-20. Το διάλυμα TBS αποτελείται από 0,9% NaCl και 1M Tris Cl. Η επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα που περιέχει γάλα ή ορό συμβάλει στο μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης προκειμένου να αποφευχθεί

ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα κατά τη διαδικασία της οπτικοποίησης. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες του γάλακτος ή του ορού δεσμεύονται σε αυτές τις μη ειδικές θέσεις με αποτέλεσμα τα αντισώματα που επωάζονται στη συνέχεια με τη μεμβράνη να προσδένονται μόνο στις επιθυμητές πρωτεΐνες και όχι σε "άσχετα" σημεία της μεμβράνης δίνοντας ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

3.4. Επώαση με πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα

Μόλις περάσει η μία ώρα επώασης της μεμβράνης με το διάλυμα μπλοκαρίσματος και έχουν πλέον καλυφθεί οι μη ειδικές θέσεις, η μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια με πρωτογενή αντισώματα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Τα πρωτογενή αντισώματα πριν επωασθούν με τη μεμβράνη αραιώνονται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος. Η αραιώση των αντισωμάτων συνήθως προτείνεται από τις εταιρίες παραγωγής τους. Τα αντισώματα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά προσδένονται με εξειδίκευση σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία της υπομελέτη πρωτεΐνης ανάλογα με τον επίτοπο που διαθέτουν. Η αλληλουχία μιας πρωτεΐνης στην οποία δεσμεύεται ένα αντίσωμα συνήθως είναι μοναδιαία, δεν υπάρχει δηλαδή αντίστοιχη αλληλουχία σε κάποια άλλη πρωτεΐνη, γεγονός που αποτρέπει την εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Μετά την επώαση της μεμβράνης με το αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα, το αντίσωμα μπορεί να συλλεχθεί και να αποθηκευτεί για μελλοντική χρήση ενώ η μεμβράνη υφίσταται 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TTBS 1x και στη συνέχεια επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα. Οι πλύσεις εξασφαλίζουν την απομάκρυνση της περίσσειας άδεντου αντισώματος από την επιφάνεια της μεμβράνης. Το δευτερογενές όπως και το πρωτογενές αντίσωμα αραιώνεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος πριν τη χρήση του ενώ η επώασή του με τη μεμβράνη διαρκεί μία ώρα και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP) και προσδένεται στην επιφάνεια του πρωτογενούς αντισώματος. Έπειτα από την πάροδο της μίας ώρας το δευτερογενές αντίσωμα απομακρύνεται από τη μεμβράνη και η μεμβράνη υφίσταται 3 πλύσεις όπως και προηγουμένως.

Πίνακας 2: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Αντισώματα	Προέλευση αντισωμάτων	Αραίωση αντισωμάτων
Actin	CHEMICON C.No. MAB1501	1:10.000
Sigma-1	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY C.No. sc-166392	1:500-1.000
PGRMC1	CELL SIGNALING C.No. 13856	1:500-1.000
TMEM97	NOVUS BIOLOGICAL C.No. NBP1-30436	1:500-1.000
DJ-1	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY C.No. sc-55573	1:2.000
Anti-mouse	SIGMA ALDRICH C.No. A9917	1:6.000
Anti-rabbit	SIGMA ALDRICH C.No. A0545	1:2.000-6.000

3.5. Οπτικοποίηση του σήματος

Η πρόσδεση των αντισωμάτων στις πρωτεΐνες και η παρουσία της υπεροξειδάση του χρένου διευκολύνουν την οπτικοποίηση των υπομελέτη πρωτεϊνών. Η οπτικοποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο διαλυμάτων που προμηθεύονται από την εταιρία BioRad (Clarity Max Western ECL Substrate Cat. No 1705062). Τα δύο διαλύματα αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 όπως υποδεικνύει η εταιρία και το μείγμα των δύο διαλυμάτων επωάζεται για 5 λεπτά με τη μεμβράνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε κατάλληλο μηχάνημα οπτικοποίησης και το σήμα που λαμβάνεται εμφανίζεται στην οθόνη ενός υπολογιστή. Τα διαλύματα παρέχουν το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης που βρίσκεται συζευγμένη στο δευτερογενές αντίσωμα. Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, κατά το οποίο δύο

χημικές ουσίες αντιδρούν παράγοντας ένα διεγερμένο ενδιάμεσο, το οποίο διασπάται απελευθερώνοντας μερική από την ενέργειά του ως φωτόνια. Τα φωτόνια ανιχνεύονται από το ειδικό μηχάνημα και το σήμα εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή.

3.6. Απομάκρυνση αντισωμάτων

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η μελέτη δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα η ίδια μεμβράνη να πρέπει να επωαστεί με περισσότερα πρωτογενή αντισώματα κάτι το οποίο δεν μπορεί να γίνει ταυτόχρονα. Έτσι λοιπόν θα πρέπει αρχικά η μεμβράνη να επωαστεί με ένα αντίσωμα, να ανιχνευτεί το σήμα αυτού του αντισώματος και στη συνέχεια αυτό να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη προκειμένου αυτή να επωαστεί με ένα επόμενο πρωτογενές αντίσωμα. Η απομάκρυνση ενός πρωτογενούς αλλά και δευτερογενούς αντισώματος πραγματοποιείται με την επώαση της μεμβράνης σε ένα κατάλληλο διάλυμα που ονομάζεται stripping buffer. Υπάρχουν δύο τέτοια διαλύματα όπου το ένα είναι ισχυρότερο. Το διάλυμα με την ηπιότερη δράση έχει pH 2.2 και αποτελείται από γλυκίνη, SDS, Tween-20 και dH₂O. Η μεμβράνη επώαζεται δύο φορές με το συγκεκριμένο διάλυμα κάθε φορά για 10λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα το διάλυμα απομακρύνεται και η μεμβράνη υφίσταται 2 πλύσεις των 5-10λεπτών με PBS 1x και δύο πλύσεις των 5λεπτών με TTBS 1x. Τέλος η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα μπλοκαρίσματος για μία ώρα όπως αναφέρεται και παραπάνω και στη συνέχεια με το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

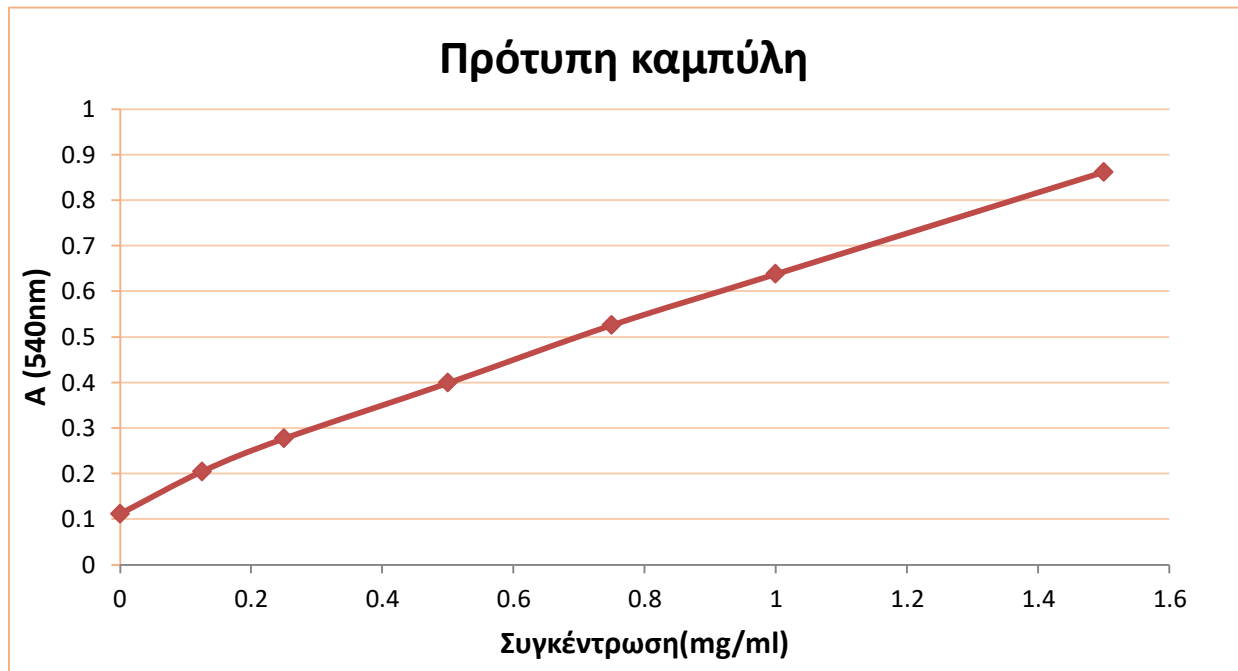
Το διάλυμα με την ισχυρότερη δράση περιέχει SDS 10% και 0.5 M Tris HCl (pH 6,8), dH₂O και β-μερκαπτοαιθανόλη. Η μεμβράνη επώαζεται με το διάλυμα αυτό για 30λεπτά στους 56οC και στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται και η μεμβράνη ξεπλένεται καλά προκειμένου να φύγουν τυχόν υπολείμματα β-μερκαπτοαιθανόλη. Οι πλύσεις της μεμβράνης πραγματοποιούνται με τη χρήση TTBS 1x. Κάθε πλύση διαρκεί 5 με 10 λεπτά ενώ η μεμβράνη υφίσταται περίπου 5 με 6 τέτοιες πλύσεις. Αφού ολοκληρωθούν οι πλύσεις η μεμβράνη μπλοκάρεται και επώαζεται με αντισώματα. Έτσι λοιπόν μπορεί να γίνει ανίχνευση πολλών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας μία μόνο μεμβράνη.

4. ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford είναι μία χρωματομετρική μέθοδο μέσω της οποίας πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός δείγματος. Η μέθοδος απαιτεί αρχικά τη δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης που προκύπτει από απορροφήσεις δειγμάτων με γνωστή συγκέντρωση πρωτεϊνών. Η πρότυπη καμπύλη φέρει στον άξονα x συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και στον άξονα y απορροφήσεις. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών ενός δείγματος αντιστοιχίζοντας την απορρόφηση του δείγματος αυτού στην πρότυπη καμπύλη. Η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αλλά και ο προσδιορισμός των άγνωστων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός BCA Protein Assay Kit της εταιρίας Thermoscientific (Cat.No 23227) που περιείχε δύο αντιδραστήρια, το A και το B. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός δείγματος με τη χρήση του παραπάνω Kit βασίζεται στην αναγωγή του χαλκού από Cu⁺² σε Cu⁺¹ παρουσία πρωτεϊνών σε αλκαλικό περιβάλλον και στην ανίχνευση του Cu⁺¹ με τη βοήθεια του BCA (bicinchoninic acid). Με τον τρόπο αυτό προκύπτει τελικά ένα έγχρωμο (μωβ) διάλυμα του οποίου η ένταση προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 562nm.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης προσδιορίστηκαν οι απορροφήσεις δειγμάτων με γνωστή συγκέντρωση πρωτεϊνών. Τα δείγματα αυτά δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις χρησιμοποιώντας BSA (Bovine Serum Albumin) (Thermoscientific, C.No. 23209). Το πρώτο δείγμα που παρασκευάστηκε είχε συγκέντρωση 2mg/ml και από αυτό με διαδοχικές αραιώσεις προέκυψαν όλα τα υπόλοιπα δείγματα που

είχαν τις εξής συγκεντρώσεις : 1, 0,5, 0,25, 0,125mg/ml. Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε επίσης το ίδιο διάλυμα (lysis buffer) που είχε παρασκευαστεί για τη λύση των ιστών και των κυττάρων. Από τα αρχικά αυτά δείγματα ελήφθησαν 10μl τα οποία τοποθετήθηκαν σε ένα 96-well plate και στη συνέχεια προστέθηκαν 200μl Working reagent. Το Working reagent προέκυψε από την ανάμειξη των αντιδραστηρίων A και B σε αναλογία 50:1. Ακολουθώντας, το plate επωάστηκε για 30 λεπτά στους 37°C έπειτα αναδεύτηκε για 5 περίπου λεπτά και φωτομετρήθηκε στα 540nm. Από τις απορροφήσεις που προέκυψαν σχηματίστηκε η πρότυπη καμπύλη που απεικονίζεται στο γράφημα 1.



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη.

Στα πρωτεϊνικά λύματα ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου έγινε τοποθετώντας σε ένα 96-well plate, 5μl PBS 1x και 5μl δείγματος. Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη του Working reagent και η διαδικασία συνεχίστηκε όπως και παραπάνω.

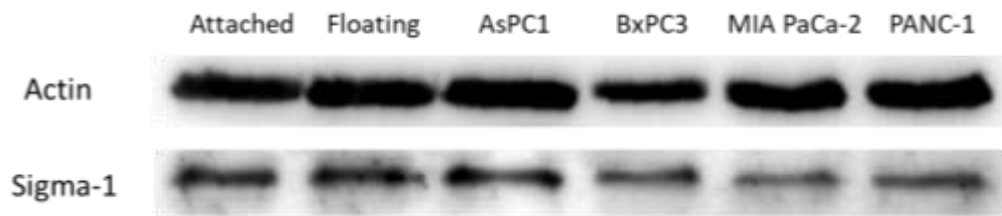
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

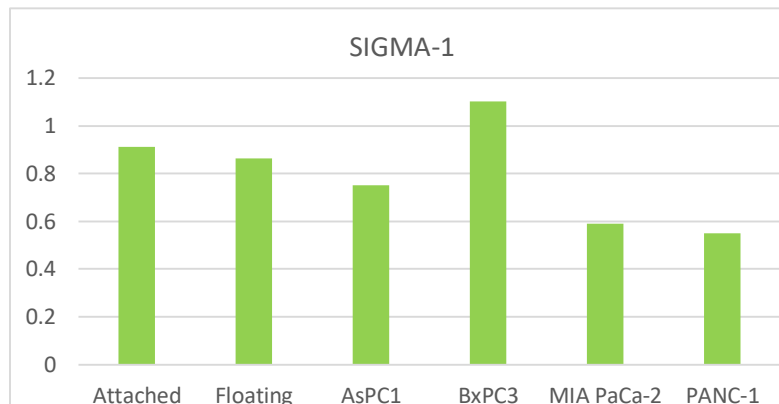
1.1. Μελέτη της έκφρασης του sigma-1 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Τα επίπεδα έκφρασης του sigma-1 υποδοχέα έχουν μελετηθεί κατά καιρούς τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε επίπεδο RNA, διαπιστώνοντας την υπερέκφραση αυτών των υποδοχέων σε ορισμένους τύπους καρκίνου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι υποδοχείς σε εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές (AsPC1, BxPC3, MIA PaCa-2 και PANC-1) αλλά και σε δύο πρωτογενείς κυτταρικές σειρές (Attached 021013 και Floating 021013) που αναπτύχθηκαν πρόσφατα στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας. Οι καρκινικές αυτές κυτταρικές σειρές αρχικά καλλιεργήθηκαν και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν τα

πρωτεϊνικά τους λύματα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του sigma-1 προσδιορίστηκαν μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης κατά Western και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στην εικόνα 11 και στο γράφημα 2.



Εικόνα 11: Έκφραση του sigma1 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

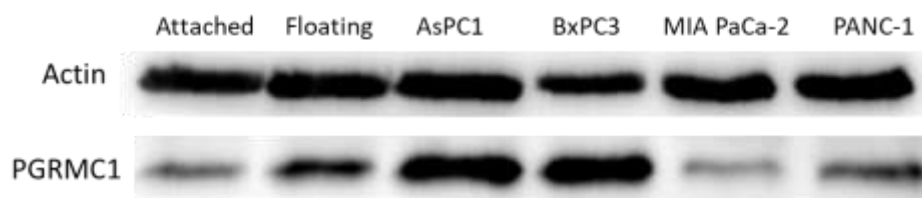


Γράφημα 2: Η έκφραση του sigma1 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

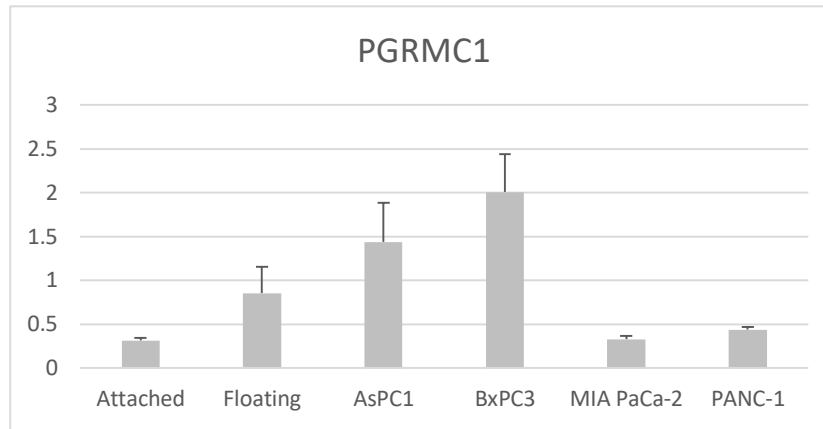
Τα αποτελέσματα από την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western υποδεικνύουν πως ο sigma-1 έχει την υψηλότερη έκφραση στην καρκινική κυτταρική BxPC3, ακολουθούν οι δύο πρωτογενείς καρκινικές κυτταρικές σειρές ενώ τη χαμηλότερη έκφραση φαίνεται να έχει η καρκινική σειρά PANC-1. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο η έκφραση του υποδοχέα αυτού δεν φαίνεται να ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς όλες οι κυτταρικές σειρές έχουν μέτρια προς υψηλή έκφραση του υποδοχέα.

1.2 Μελέτη της έκφρασης των sigma-2 υποδοχέων σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Τα σενάρια σχετικά με τους sigma-2 υποδοχείς είναι ακόμα αμφιλεγόμενα, με μερικές ερευνητικές ομάδες να υποστηρίζουν την υπόθεση πως ο sigma-2 είναι ο PGRMC1 ενώ άλλες να υποστηρίζουν πως είναι ο TMEM97. Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση τόσο του ενός όσο και του άλλου μορίου σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές μέσω της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην εικόνα 12 αλλά και στο γράφημα 3.



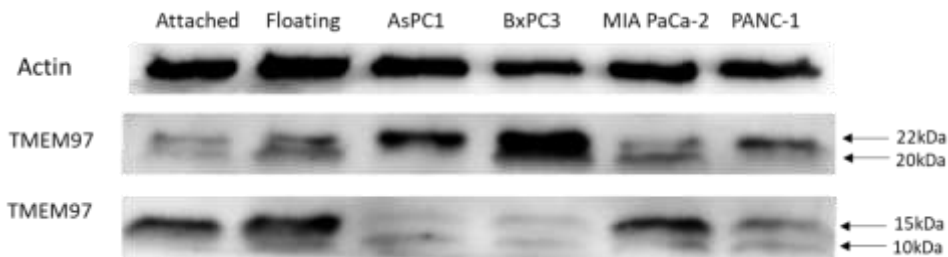
Εικόνα 12: Έκφραση του PGRMC1 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.



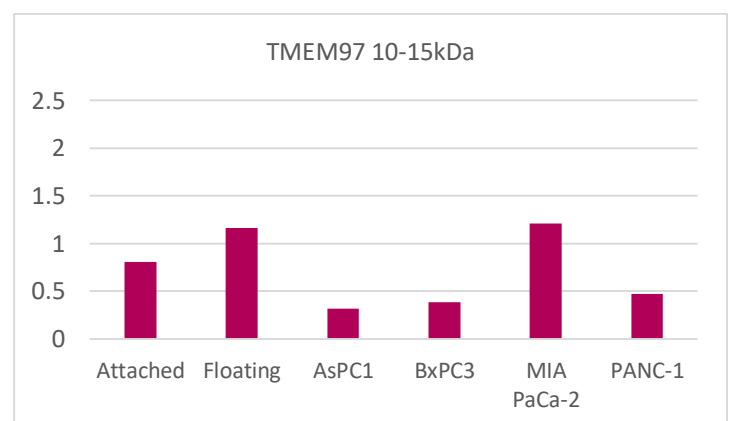
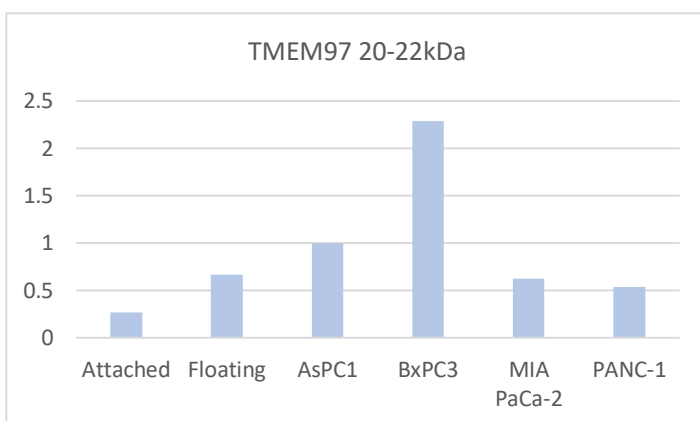
Γράφημα 3: Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του PGRMC1 σε παγκρεατικές κυτταρικές σειρές.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που ελήφθησαν η καρκινική κυτταρική σειρά BxPC3 είναι αυτή που έχει την υψηλότερη έκφραση του PGRMC1 ενώ οι κυτταρικές σειρές Attached 021013 και MIA PaCa-2 την χαμηλότερη έκφραση. Έτσι λοιπόν, υψηλή ετερογένεια παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης του PGRMC1.

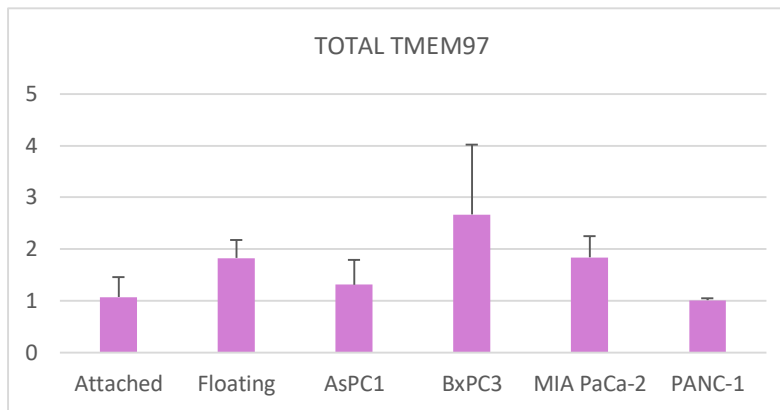
Κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του TMEM97 μέσω της ανασοαποτύπωσης κατά Western εντοπίστηκαν 4 διαφορετικές ισομορφές αυτού του μορίου όπως υποδεικνύονται στην εικόνα 13, κάτι το οποίο δυσχέρανε ακόμα περισσότερο την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν 2 ισομορφές με μοριακό βάρος 20 με 22kDa και 2 ισομορφές με μοριακό βάρος 10 με 15 kDa. Έτσι λοιπόν στα αποτελέσματα που αναπαριστώνται στα γραφήματα 4 και 5, οι 2 πρώτες ισομορφές των 20-22kDa συγχωνεύθηκαν και θεωρήθηκαν αυθαίρετα ως μία ισομορφή (για ευκολότερη προσέγγιση του θέματος) ενώ το ίδιο συνέβη και με τις ισομορφές των 10-15kDa.



Εικόνα 13: Έκφραση του TMEM97 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.



Γράφημα 4-5 : Η έκφραση των ισομορφών του TMEM97 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

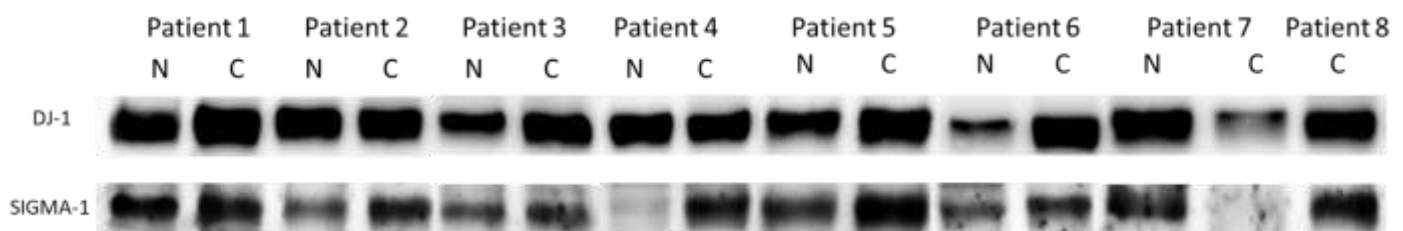


Γράφημα 6: Η συνολική έκφραση του TMEM97 σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

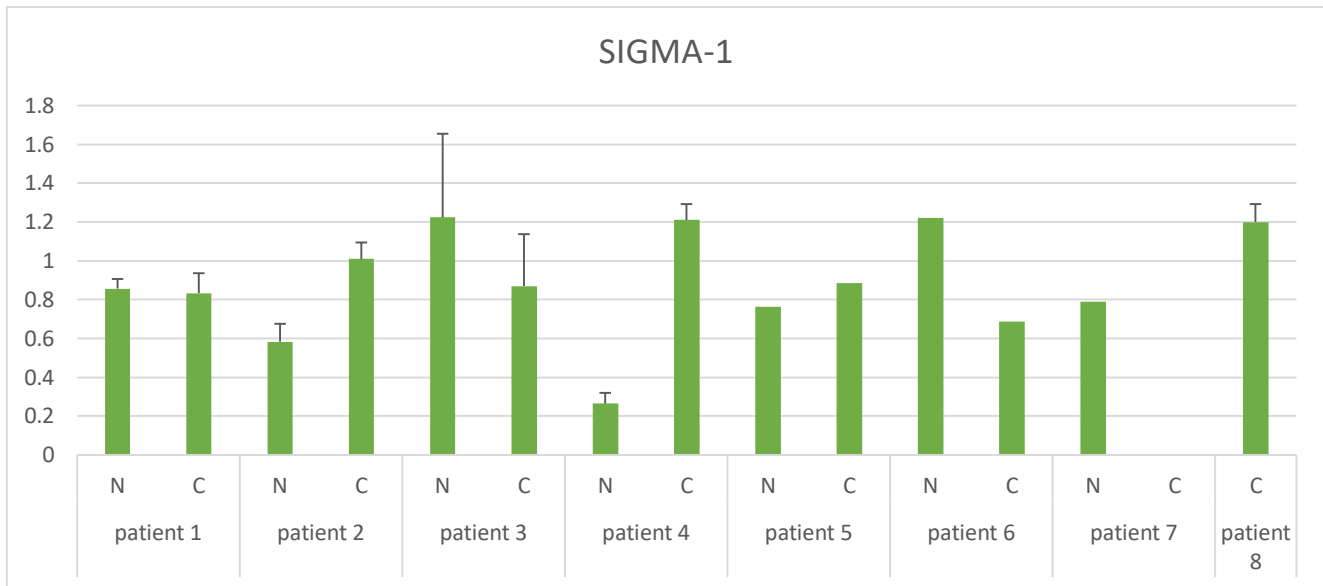
Τα αποτελέσματα που αφορούν την ισομορφή των 20-22kDa υποδεικνύουν πως η καρκινική σειρά BxPC3 είναι αυτή με τη μεγαλύτερη έκφραση ενώ όλες οι υπόλοιπες καρκινικές σειρές χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Αντίθετα, στην περίπτωση της ισομορφής των 10-15kDa φαίνεται πως οι κυτταρικές σειρές Attached 021013, Floating 021013 και MIA PaCa-2 είναι αυτές με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ενώ όλες οι υπόλοιπες έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Τα αποτελέσματα της συνολικής έκφρασης του TMEM97 (TOTAL TMEM97) δείχνουν πως η έκφρασή του είναι υψηλότερη στην καρκινική σειρά BxPC3. Παρόλα αυτά τα συνολικά επίπεδα έκφρασης του TMEM97 δεν εμφάνιζαν δραματικές διακυμάνσεις μεταξύ των παγκρεατικών κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Αντίθετα μελετώντας μεμονωμένα κάθε ισομορφή παρατηρούνται σημαντικότερες διακυμάνσεις ως αναφορά τα επίπεδα έκφρασης του μορίου.

1.3 Μελέτη της έκφρασης του sigma-1 υποδοχέα σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος

Έπειτα από τη μελέτη των sigma-1 και sigma-2 υποδοχέων σε παγκρεατικές καρκινικές σειρές, μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων αυτών και σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος (αδενοκαρκίνωμα). Η ηλικία των ασθενών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία κυμαίνεται από 63-85 έτη, ορισμένοι εμφάνιζαν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 καθώς και οστικές μεταστάσεις αλλά και μεταστάσεις σε λεμφαδένες ή σε παρακείμενους ιστούς. Τα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με την έκφραση των sigma-1 υποδοχέων παρατίθενται στην εικόνα 14 και στο γράφημα 7.

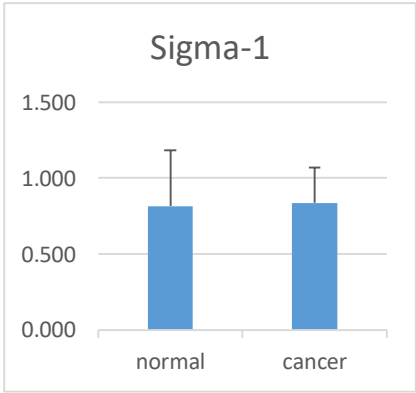


Εικόνα 14: Έκφραση του sigma1 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς ασθενών.



Γράφημα 7: Η έκφραση του sigma1 σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος και σε φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση του sigma-1 σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος φαίνεται πως είναι ανομοιόμορφα καθώς η έκφραση των υποδοχέων αυτών φαίνεται να ποικίλει. Ακόμα και μεταξύ ασθενών που μοιράζονται την ίδια πάθηση η έκφραση των sigma-1 υποδοχέων είναι αρκετά διαφορετική καθώς σε ορισμένους ασθενείς οι υποδοχείς εκφράζονται περισσότερο στον όγκο έναντι του φυσιολογικού ιστού ενώ σε άλλους ασθενείς συμβαίνει το αντίθετο. Επίσης υπάρχουν ασθενείς (ασθενής 1 και 5) στους οποίους η έκφραση των υποδοχέων δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ όγκου και φυσιολογικού ιστού.



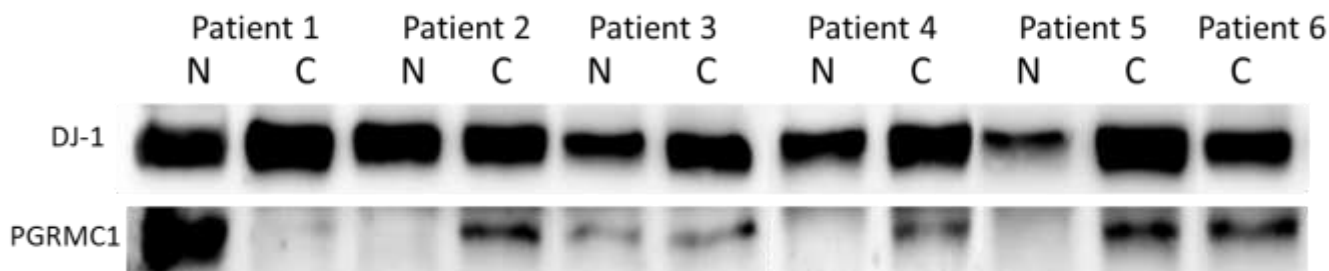
Γράφημα 8: Η έκφραση του sigma1 σε παγκρεατικούς καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς.

Ωστόσο, συνοψίζοντας την έκφραση του sigma-1 σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς (γράφημα 8) παρατηρείται μία μικρή υπερέκφραση του υποδοχέα στον καρκίνο. Η υπερέκφραση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική με αποτέλεσμα να μπορεί κανείς να συμπεράνει πως η έκφραση του υποδοχέα δεν μεταβάλλεται σημαντικά στον καρκίνο.

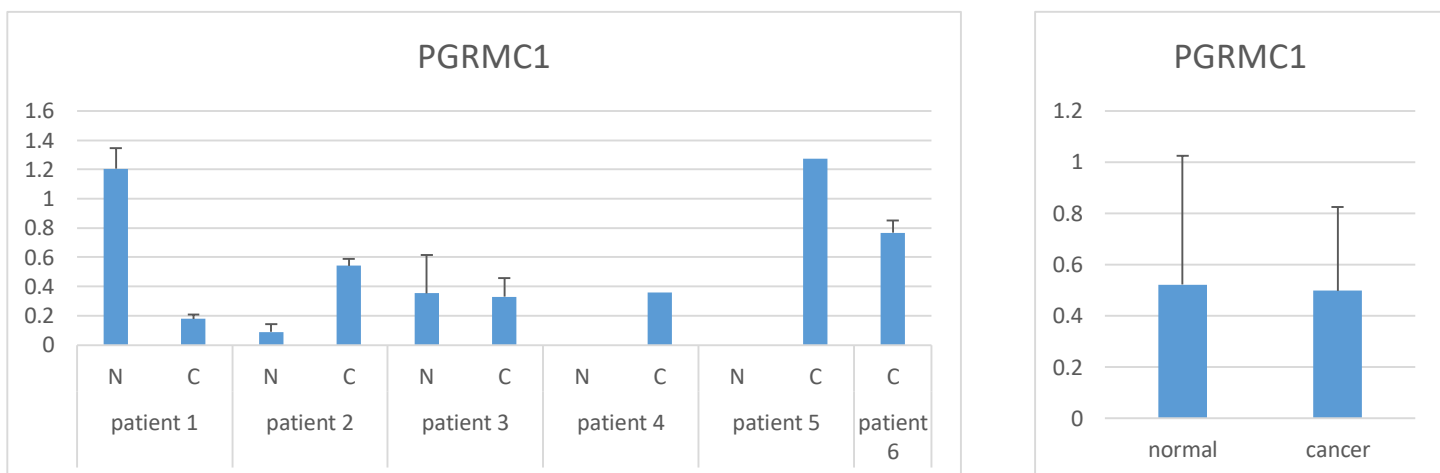
Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να είναι σύμφωνα και με τα δεδομένα από τη βάση δεδομένων Human Protein Atlas όπου αναφέρεται πως η έκφραση των sigma-1 υποδοχέων είναι μέτρια προς χαμηλή τόσο

σε καρκινικούς όσο και σε φυσιολογικούς ιστούς. Επίσης στην ίδια βάση δεδομένων αναφέρεται πως ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης του sigma-1 έχουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης.

1.4 Μελέτη της έκφρασης των sigma-2 υποδοχέων σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος



Εικόνα 15: Έκφραση του PGRMC1 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς ασθενών.



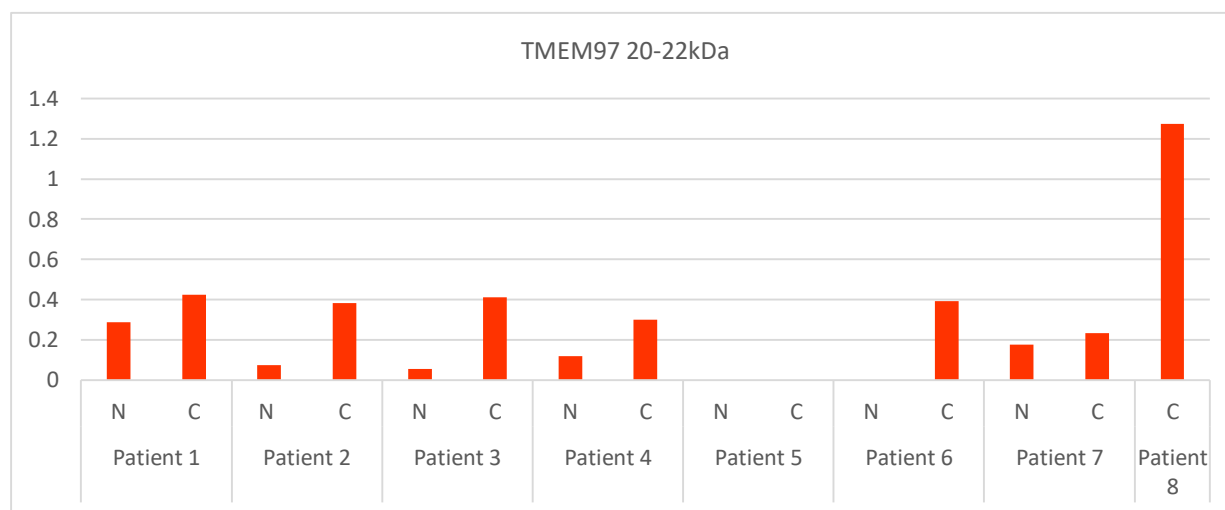
Γράφημα 9-10: Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του PGRMC1 σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος και σε φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς.

Η έκφραση του PGRMC1 σε όγκους και σε αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών εμφανίζει υψηλή ετερογένεια με 3 από τους 5 ασθενείς να εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση του υποδοχέα στους όγκους και με 2 από τους 5 να εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση στους φυσιολογικούς τους ιστούς (εικόνα 15, γράφημα 9-10). Δεν είναι λοιπόν παρόμοια η έκφραση του υποδοχέα ούτε στους όγκους αλλά και ούτε στους φυσιολογικούς ιστούς ασθενών, δυσχεραίνοντας την διεξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος σχετικά με την έκφραση του υποδοχέα στον καρκίνο του παγκρέατος. Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό πως η έκφραση των υποδοχέων δεν ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο ενώ από το γράφημα 10 φαίνεται πως δεν υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών.

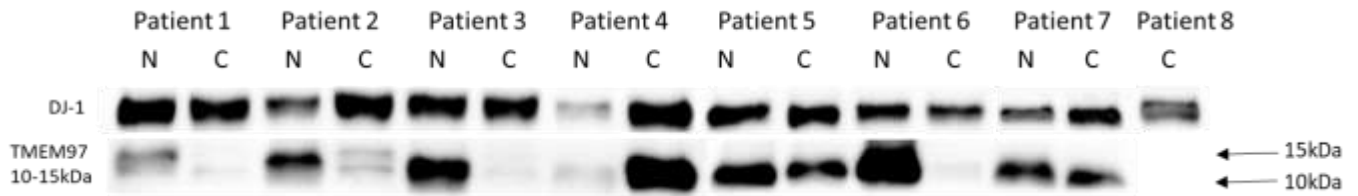
Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με στοιχεία του Human Protein Atlas όπου αναφέρεται πως τα επίπεδα έκφρασης του PGRMC1 είναι μέτρια προς χαμηλά σε φυσιολογικούς αλλά και καρκινικούς ιστούς, σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Γίνεται επίσης αναφορά και στις πιθανότητες επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος όπου υποδεικνύεται πως ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης του PGRMC1 έχουν περισσότερες πιθανότητες επιβίωσης.



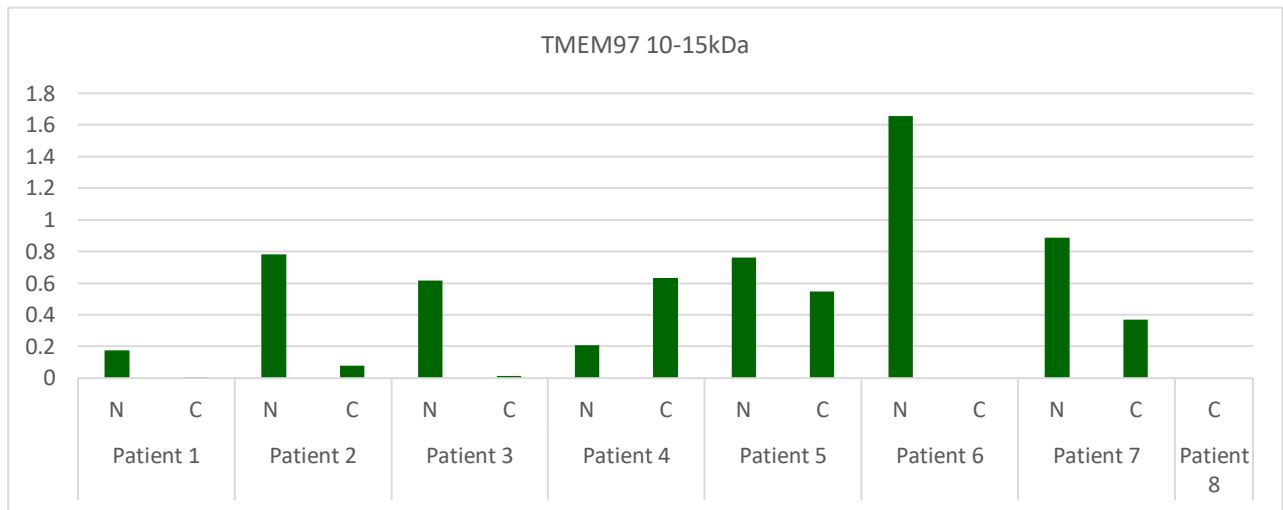
Εικόνα 16: Έκφραση των ισομορφών 20-22kDa του TMEM97 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς.



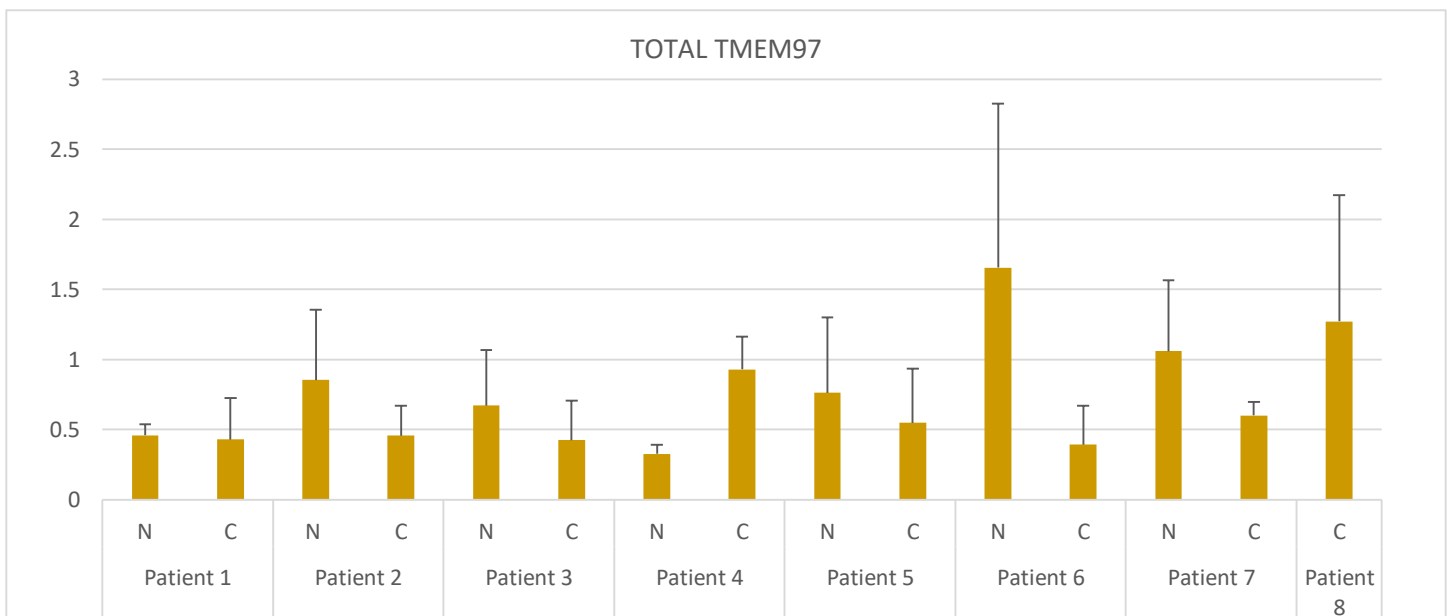
Γράφημα 11: Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των ισομορφών 20-22kDa του TMEM97 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς.



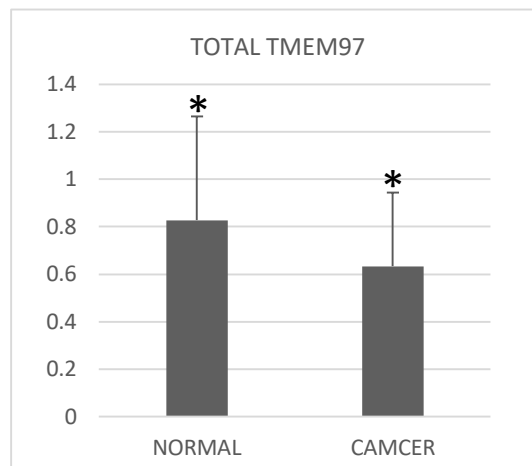
Εικόνα 17: Έκφραση των ισομορφών 10-15kDa του TMEM97 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς.



Γράφημα 12: Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των ισομορφών 10-15kDa του TMEM97 σε καρκινικούς και φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς ασθενών.



Γράφημα 13: Η συνολική έκφραση του TMEM97 σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος και σε φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς.



Γράφημα 14: Η συνολική έκφραση του TMEM97 σε όγκους ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος και σε φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς.

Όπως και στην περίπτωση των κυτταρικών καρκινικών σειρών έτσι και στα δείγματα των ασθενών μελετήθηκε η έκφραση τόσο του PGRMC1 όσο και του TMEM97. Μελετώντας τις ισομορφές του TMEM97 στα 20-22kDa και στα 10-15kDa παρατηρείται πως η ισομορφή των 20-22kDa εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στους όγκους των ασθενών και λιγότερο ή και καθόλου στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (εικόνα 16, γράφημα 11) ενώ το αντίθετο συμβαίνει με την ισομορφή των 10-15kDa (εικόνα 17, γράφημα 12). Η ισομορφή των 10-15kDa φαίνεται πως έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους φυσιολογικούς ιστούς των ίδιων ασθενών γεγονός που υποδεικνύει ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης των ισομορφών αυτών στον καρκίνο του παγκρέατος.

Ειδικότερα, από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως η ισομορφή των 20-22kDa είναι αυτή που εκφράζεται κυρίως στον παγκρεατικό καρκίνο ωστόσο τα συνολικά επίπεδα έκφρασης του TMEM97 (TOTAL TMEM97) είναι σε όλους σχεδόν τους ασθενείς (με εξαίρεση των ασθενή 4) υψηλότερα στους φυσιολογικούς ιστούς και όχι στους αντίστοιχους καρκινικούς (γράφημα 13,14). Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να είναι απολύτως σύμφωνα με τα στοιχεία του Human Protein Atlas. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Human Protein Atlas, τα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 είναι ιδιαίτερα υψηλά στους φυσιολογικούς ιστούς του παγκρέατος ενώ σε καρκινικούς ιστούς η έκφρασή του είναι απύσχα. Στοιχεία επίσης από την ίδια πηγή υποστηρίζουν πως ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος έχουν υψηλότερες πιθανότητες επιβίωσης όταν στους όγκους τους εκφράζουν τον TMEM97 σε χαμηλά επίπεδα. Παρόλα αυτά στο Human Protein Atlas δεν γίνεται αναφορά για το ποιά από τις ισομορφές του TMEM97 εξετάστηκε και οδήγησε σε αυτά τα αποτελέσματα.

Επίσης τα αποτελέσματα φαίνονται σύμφωνα και με δεδομένα που προκύπτουν από μία έρευνα του 2004 στην οποία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 σε 30 όγκους ασθενών καθώς και σε 19 φυσιολογικούς παγκρεατικούς ιστούς. Η έρευνα υποδείκνυε πως το 50% των παγκρεατικών όγκων εμφάνιζαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του TMEM97 σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των φυσιολογικών ιστών, στο 20% των όγκων τα επίπεδα έκφρασης δεν μεταβάλλονταν μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών ενώ μόλις το 30% των όγκων είχε υψηλή έκφραση του TMEM97. Η έρευνα που μόλις διατυπώθηκε αφορούσε την έκφραση του TMEM97 σε επίπεδο RNA ωστόσο η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε και την έκφρασή του σε επίπεδο πρωτεϊνών βλέποντας πως TMEM97 εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα των παγκρεατικών (φυσιολογικών) κυττάρων και σε πολύ χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα στα παγκρεατικά καρκινικά

κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση πως το γονίδιο του TMEM97 λειτουργεί ως καταστολέας όγκων στην περίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου. [35]

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του Sigma-1, του PGRMC1 και του TMEM97 σε καρκινικές παγκρεατικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, με τη μέθοδο της ανασοαποτύπωσης κατά Western. Μέσω της παρούσας μελέτης έγινε προσπάθεια συσχετισμού των υποδοχέων αυτών με τον καρκίνο του παγκρέατος. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές υποδείκνυαν μια ετερογενή έκφραση όλων των παραπάνω υποδοχέων χωρίς να μπορεί να διεξαχθεί ένα βέβαιο συμπέρασμα σχετικά με την έκφρασή τους. Μόνο η καρκινική κυτταρική σειρά BxPC3 είχε αυξημένη έκφραση τόσο του Sigma-1 όσο και του PGRMC1 και του TMEM97.

Σχετικά με τη μελέτη καρκινικών αλλά και φυσιολογικών παγκρεατικών ιστών, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δεν υποδείκνυαν κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών. Ειδικότερα ο sigma-1 υποδοχέας φαίνεται να εμφανίζει μία τάση υπερέκφρασης στους καρκινικούς ιστούς έναντι των φυσιολογικών ενώ τα επίπεδα έκφρασης του PGRMC1 αλλά και του TMEM97 φαίνεται να μειώνονται.

Μάλιστα, στην περίπτωση του TMEM97 μελετώντας τις διαφορετικές ισομορφές του διαπιστώθηκε πως στον παγκρεατικό καρκίνο εκφράζεται κυρίως η ισομορφή των 20-25kDa ενώ στους φυσιολογικούς ιστούς η ισομορφή των 10-15kDa. Το γεγονός αυτό ίσως υποδεικνύει πως μία από τις δύο ισομορφές εμπλέκεται στην ανάπτυξη αλλά και στην εξέλιξη του παγκρεατικού καρκίνου ωστόσο για να διαπιστωθεί κάτι τέτοιο απαιτούνται σίγουρα περισσότερες και εκτενέστερες μελέτες. Μελέτες με περισσότερα δείγματα ασθενών θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν την εμπλοκή αυτής της ισομορφής στον παγκρεατικό καρκίνο και γιατί όχι να την αναδείξουν ως ένα μελλοντικό στόχο φαρμάκων. Επιπλέον η απουσία της ισομορφής των 10-15kDa σε πολλούς από τους ασθενείς που μελετήθηκαν ίσως διευκολύνει την ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου καθώς πολύ πρόσφατα αναφέρθηκε πως ο TMEM97 λειτουργεί ως αναστολέας ογκογένεσης με αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα αυτής της ισομορφής στους καρκινικούς ιστούς ίσως να σχετίζονται με την άρση της αναστολής και την επαγωγή της ογκογένεσης. Συνοψίζοντας, είναι βέβαιο πως οι sigma υποδοχείς εμπλέκονται στην ανάπτυξη αλλά και στην εξέλιξη πολλών καρκινικών τύπων ωστόσο στην περίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου η εμπλοκή τους δεν είναι ξεκάθαρη και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] <https://www.innerbody.com/image/endo03.html#continued>
- [2] Fritsch H., Kuhnel W. (2009). Εγχειρίδιο Περιγραφικής Ανατομικής: Εσωτερικά Όργανα. Εκδόσεις Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ
- [3] Hall J. E., Guyton A. C. (2013). Ιατρική Φυσιολογία. Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- [4] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [5] <https://www.cancer.gov/>
- [6] Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2011). Το κύτταρο: Μία μοριακή προσέγγιση. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- [7] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- [8] Broertjes J. (2015). The Ten Hallmarks of Cancer in Cutaneous Malignant Melanoma. *UNAV Journal for Medical Students*.
- [9] Russell P. J. (2009). *iGenetics Μια Μεντελική Προσέγγιση*. Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- [10] <https://www.cancerquest.org/>
- [11] Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20–31.
- [12] Marco Del Chiaro, Segersvärd R., Lohr M., Verbeke C. (2014). Early detection and prevention of pancreatic cancer: Is it really possible today? *World Journal of Gastroenterology*.
- [13] Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2018). European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 29(4), 1016–1022.
- [14] <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/what-is-pancreatic-cancer.html>
- [15] <https://www.webmd.com/cancer/pancreatic-cancer/causes-pancreatic-cancer>
- [16] <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html>
- [17] Chu, L. C., Goggins, M. G., & Fishman, E. K. (2017). Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal*, 23(6), 333–342.
- [18] Kim, F. J. (2017). Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1–11.

- [19] Prasad, P. D., Li, H. W., Fei, Y.-J., Ganapathy, M. E., Fujita, T., Plumley, L. H., ... Ganapathy, V. (2002). Exon-Intron Structure, Analysis of Promoter Region, and Chromosomal Localization of the Human Type 1 σ Receptor Gene. *Journal of Neurochemistry*, 70(2), 443–451.
- [20] Bolshakova, A. V., Kukanova, E. O., Gainullina, A. N., Zhemkov, V. A., Korban, S. A., & Bezprozvanny, I. B. (2016). Sigma-1 receptor as a potential pharmacological target for the treatment of neuropathology. *St. Petersburg Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics*, 2(1), 31–40.
- [21] Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A. C. (2016). Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature*, 532(7600), 527–530.
- [22] Zhang, K., Zhao, Z., Lan, L., Wei, X., Wang, L., Liu, X., ... Zheng, J. (2017). Sigma-1 Receptor Plays a Negative Modulation on N-type Calcium Channel. *Frontiers in Pharmacology*, 8.
- [23] Ruscher, K., & Wieloch, T. (2015). The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127(1), 30–35.
- [24] Popova, N. K., Ilchibaeva, T. V., & Naumenko, V. S. (2017). Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry (Moscow)*, 82(3), 308–317.
- [25] Kim, F. J., & Maher, C. M. (2017). Sigma1 Pharmacology in the Context of Cancer. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 237–308.
- [26] Soriani, O., & Rapetti-Mauss, R. (2017). Sigma 1 Receptor and Ion Channel Dynamics in Cancer. *Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets*, 63–77.
- [27] Kim, F. J., & Pasternak, G. W. (Eds.). (2017). Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*.
- [28] 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).
- [29] Kabe, Y., Nakane, T., Koike, I., Yamamoto, T., Sugiura, Y., Harada, E., ... Suematsu, M. (2016). Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nature Communications*, 7, 11030.
- [30] <https://www.uniprot.org/>
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Xu, X.-Y., Zhang, L.-J., Yu, Y.-Q., Zhang, X.-T., Huang, W., Nie, X.-C., & Song, G.-Q. (2014). Down-Regulated MAC30 Expression Inhibits Proliferation and Mobility of Human Gastric Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(5), 1359–1368.

[34] Zeng, C., Weng, C.-C., Schneider, M. E., Puentes, L., Riad, A., Xu, K., Mach, R. H. (2019). TMEM97 and PGRMC1 do not mediate sigma-2 ligand-induced cell death. *Cell Death Discovery*, 5(1).

[35] Schmit, K., & Michiels, C. (2018). TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 9.

[36] 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.

[37] Tesei, A., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., Zanoni, M., ... Collina, S. (2018). Sigma Receptors as Endoplasmic Reticulum Stress “Gatekeepers” and their Modulators as Emerging New Weapons in the Fight Against Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 9.

[38] <https://en.wikipedia.org/wiki/Pancreas>

[39] <https://imageimage.eu/western-blot-semi-dry-transfer-voltage-drywalls-org.html>

[40] <https://www.biocompare.com/12104-Equipment/2686340-MiniPROTEAN-Tetra-Cell-Casting-Module/>