



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο ρόλος του Πρωτεύοντος Κροσσού σε φαινοτύπους 2 και 3
διαστάσεων σε καλοήθη και κακοήθη μεσοθηλιακά
κύτταρα»**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΖΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΖΩΤΗΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Μόσχου Χαρίκλεια του Δημητρίου

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

BACHELOR'S THESIS

**“The role of Primary Cilium in 2Dimensional and 3Dimensional
phenotypes of benign and malignant mesothelial cells”**

SUPERVISING PROFESSOR: ZAROGIANNIS SOTIRIOS, ASSOCIATE PROFESSOR OF PHYSIOLOGY
CO-SUPERVISING PROFESSOR: BALATSOS NIKOLAOS, ASSISTANT PROFESSOR OF BIOCHEMISTRY

Moschou Charikleia

LARISA, 2021

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Σωτήριος Ζαρογιάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(επιβλέπων)



Νικόλαος Μπαλατσός

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (συνεπιβλέπων)

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο, το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2020 – Ιούλιος 2021.

Θα ήθελα καταρχήν να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην τριμελή μου επιτροπή, τον επιβλέποντα μου κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο, καθώς και τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο και τον κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής. Τους ευχαριστώ για την καθοδήγηση, την επιμέλεια και το χρόνο που διέθεσαν για την πτυχιακή μου εργασία.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας Κ. Ζαρογιάννη Σωτήριο που δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία και μου έκανε την τιμή να με συμπεριλάβει στην ερευνητική του ομάδα προσφέροντας μου πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ανεκτίμητη η συμβολή του στην πραγματοποίηση πειραματικής πτυχιακής εργασίας δια ζώσης εν μέσω COVID-19 και καταλυτική για τη μετέπειτα πορεία μου καθώς μου έδωσε την δυνατότητα να ασχοληθώ με το ερευνητικό κομμάτι του κλάδου μου που μέχρι πρότινος αγνοούσα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κα. Χατζόγλου

Χρυσή, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και μεγάλη ευγνωμοσύνη οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Πιταράκη Ελεάννα για την άψογη συνεργασία, τη συνεχή βοήθεια και την στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της πτυχιακής εργασίας, όπως επίσης και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Ρούκα Ερασμία, στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Rajesh Jagirdar και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ουρανία Κώτσιου για τον χρόνο τους και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους, που με βοήθησαν καθοριστικά σε πολλά στάδια της εργαστηριακής μου πορείας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας για την άψογη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα που υπήρχε σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μέρος των πειραμάτων που έχουν διεξαχθεί κατά την ερευνητική εργασία που υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «1^η Προκήρυξη Ερευνητικών Έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ & Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας» (Αριθμός Έργου 3221).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κροσσοί είναι μικρές κυτταρικές προεξοχές που μεσολαβούν σε μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών. Υπάρχουν δύο τύποι κροσσών: οι κινητοί και οι μη κινητοί (πρωτεύοντας κροσσός). Ο πρωτεύοντας κροσσός με τον οποίο ασχοληθήκαμε στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία είναι ένα οργανίδιο που μοιάζει με κεραία και προεξέχει από την επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων στα θηλαστικά κατά την επαγωγή της ανάπτυξης. Για πολλά χρόνια θεωρούνταν ένα οργανίδιο χωρίς σημαντικό ρόλο. Ωστόσο, σε πρόσφατες μελέτες σημειώθηκε ο σημαντικός του ρόλος, καθώς είναι ένα μηχανοαισθητήριο οργανίδιο που ανταποκρίνεται σε μηχανικά, χημικά και άλλα εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Συντονίζει πολυάριθμες σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση, καθώς και τη διακυτταρική επικοινωνία. Λαμβάνει σήματα από το περιβάλλον και τα αναμεταδίδει στο κύτταρο. Αυτά τα σήματα στη συνέχεια ενσωματώνονται για να δώσουν τις απαιτούμενες πληροφορίες που τελικά οδηγούν στην ανάπτυξη, τη μορφογένεση και την ομοίωση των οργάνων. Ελαττώματα στη συναρμολόγηση ή τη λειτουργία των πρωτεύοντα κροσσού επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη και τη συνολική φυσιολογία του οργανισμού, οδηγώντας σε ασθένειες που είναι γνωστές ως Κροσσοπάθειες.

Μορφολογικές μελέτες σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν επιβεβαιώσει την ύπαρξη πρωτεύοντα κροσσού στην επιφάνειά τους, αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκε πως υψηλή έκφραση του γονιδίου BBS1, που είναι ένα βασικό μοριακό συστατικό του πρωτεύοντα κροσσού, αποτελεί προγνωστικό

παράγοντα που ευνοεί την επιβίωση ασθενών με κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα.

Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε κυτταρικές σειρές μεσοθηλιακών καλοήθων και κακοήθων κυττάρων, ώστε να μελετηθεί πως επηρεάζονται σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα όταν αυτά εκτίθενται σε ουσίες (φάρμακα) που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δομή του πρωτεύοντα κροσσού). Τα φάρμακα που επιδρούν στην μοριακή σύνθεση του πρωτεύοντα κροσσού των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα είναι η ένυδρη χλωράλη, το θειικό αμμώνιο και το χλωριούχο λίθιο. Οι κυτταρικές λειτουργίες που μελετήθηκαν είναι η κυτταρική βιωσιμότητα και η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων (με τη μέθοδο επούλωσης πληγών) σε δισδιάστατους (2D) φαινοτύπους, καθώς και ο τρισδιάστατος (3D) κυτταρικός πολλαπλασιασμός (με το σχηματισμό σφαιροειδών) και η επαγωγή συσταλτού φαινοτύπου (μέσω της δοκιμασίας συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα).

Συμπερασματικά προέκυψε μειωμένη έκφραση με την προσθήκη των φαρμάκων όλων των φαινοτύπων σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Εξαιρεση αποτέλεσαν τα κακοήθη κύτταρα M14K στα οποία η προσθήκη θειικού αμμωνίου εμπόδισε εξ'ολοκλήρου τον σχηματισμό σφαιροειδών, όπως επίσης και τα κακοήθη ZL34 στα οποία με την προσθήκη θειικού αμμωνίου δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στη δυνατότητα συσταλτότητας.

ABSTRACT

Cilia are small cellular protrusions that mediate a variety of cellular functions. There are two types of cilia: motile and non-motile (primary cilium). In this diploma thesis our main subject of interest was the primary cilium which is an antenna-like organelle that protrudes from the surface of most mammalian cells during growth arrest. For many years it was considered an organelle without important role. However, recent studies imply its importance, as it is a mechano-sensory organelle that responds to mechanical, chemical and other extracellular stimuli. It coordinates numerous signaling pathways that are involved in cell proliferation, apoptosis, differentiation and intercellular communication. It receives signals from the extracellular environment and transmits them into the cell. These signals are then incorporated to give the required information that ultimately leads to the development, morphogenesis and homeostasis of the organs. Defects in the structure or the function of the primary cilium, significantly affect the growth and overall physiology of the human body, leading to diseases known as Ciliopathies.

Morphological studies in human mesothelial cells have confirmed the presence of primary cilium on their surface, but their functional role in normal and pathological conditions has not yet been studied. Recent studies have shown that high expression of the BBS1 gene, which is a key molecular component of the primary cilium, is a positive prognostic factor in the survival of patients with malignant pleural mesothelioma.

In our study, benign and malignant mesothelial cell cultures were used, to examine how important cellular functions of pleural mesothelial cells are affected when they are exposed to drugs, which are known to alter the structure of primary cilium. These are chloral hydrate, ammonium sulfate and lithium chloride. The cellular functions that were studied are the cell viability and the cell migration assay of the cells (by the wound healing method) in two-dimensional (2D) phenotypes, as well as the three-dimensional (3D) cell proliferation (with the formation of spheroids) and the induction of phenotype (via the collagen gel contraction assay with integrated mesothelial cells).

Our results have shown, reduced expression of all phenotypes by the addition of these three drugs to all cell lines. Exceptions were M14K malignant cells in which the addition of ammonium sulfate completely prevented the formation of spheroids, as well as malignant ZL34 in which the addition of ammonium sulfate did not show any significant change in contractility.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
----------------------	-----------

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Πρωτεύοντας κροσσός	13
1.1. Δομή και εντόπιση.....	13
1.2 Πρωτεύοντας κροσσός και κυτταρικός κύκλος.....	19
1.3 Φυσιολογικός ρόλος.....	23
1.4 BBSome.....	23
2. Κυτταρικά μονοπάτια.....	25
2.1 Σηματοδότηση Hedgehog (Hh).....	25
2.2 Σηματοδότηση Notch	28
2.3 Σηματοδότηση Wnt	29
2.4 Σηματοδότηση TGF-β (Transforming growth factor beta).....	31
2.5 Σηματοδότηση mTOR	32
2.6 Σηματοδότηση PDGF.....	34
2.7 Σηματοδότηση Ca ²⁺	35
2.8 Παθοφυσιολογία σχετιζόμενη με τον πρωτεύοντα κροσσό.....	36
3. Μεσοθηλιακά κύτταρα.....	40
3.1 Εντόπιση.....	40

3.2 Ρόλος μεσοθηλιακών κυττάρων στις κοιλότητες.....	42
3.3 Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων.....	43
3.4 Πρωτεύοντας κροσσός στα μεσοθηλιακά κύτταρα.....	47
4. Μεσοθηλίωμα.....	48
4.1 Επιδημιολογία – Παθογενετικοί παράγοντες.....	48
4.2 Ιστολογία.....	52
4.3 Κυτταρικές λειτουργίες σημαντικές στην εξάπλωση του όγκου στις κοιλότητες.....	55
4.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	56
4.5 Πρωτεύοντας κροσσός στο μεσοθηλίωμα/σε άλλους καρκίνους.....	59
 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5.ΣΤΟΧΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	60
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	61
6.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	61
6.2 Επώαση των κυττάρων με φάρμακα.....	62
6.3 Δοκιμή βιωσιμότητας κυττάρων σε 2D καλλιέργειες (Cell viability assay).....	62
6.4 Δοκιμή κυτταρικής μετανάστευσης σε 2D καλλιέργειες (Cell migration assay)	63

6.5 Δοκιμή σχηματισμού σφαιροειδών σε 3D καλλιέργειες (Spheroid formation assay).....	64
6.6 Δοκιμή συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα σε 3D καλλιέργειες (Collagen gel contraction assay).....	64
6.7 Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	65
7.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
7.1 Φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων υπό την επίδραση των φαρμάκων	66
7.2 Μειωμένη βιωσιμότητα καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση φαρμάκων.....	67
7.3 Μειωμένη κινητικότητα καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση φαρμάκων.....	69
7.4 Ο σχηματισμός 3 D σφαιροειδών μειώνεται υπό την επίδραση των φαρμάκων	71
7.5 Μείωση της συσταλτότητας γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα.....	72
8.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

Γενικό μέρος

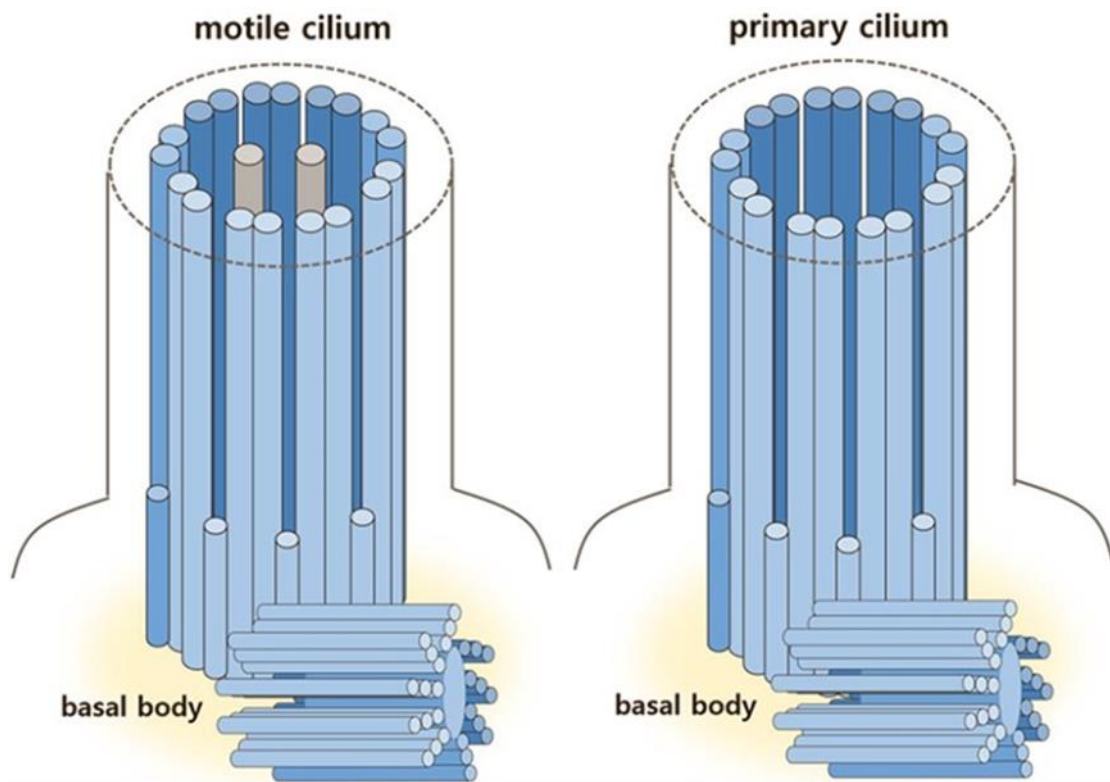
1. Πρωτεύοντας κροσσός

1.1. Δομή και εντόπιση

Οι κροσσοί είναι σύνθετες δομές που έχουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του ρόλου τους στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών και της συμμετοχής τους σε γενετικές διαταραχές στον άνθρωπο. Είναι μικρές κυτταρικές προεξοχές που διαθέτουν ένα σύνολο αισθητήριων πρωτεϊνών, όπως υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες GPCR και άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, και μεσολαβούν σε μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών. Υπάρχουν δύο τύποι βλεφαρίδων: οι κινητές και οι ακίνητες (πρωτεύοντας κροσσός)(1)(2).

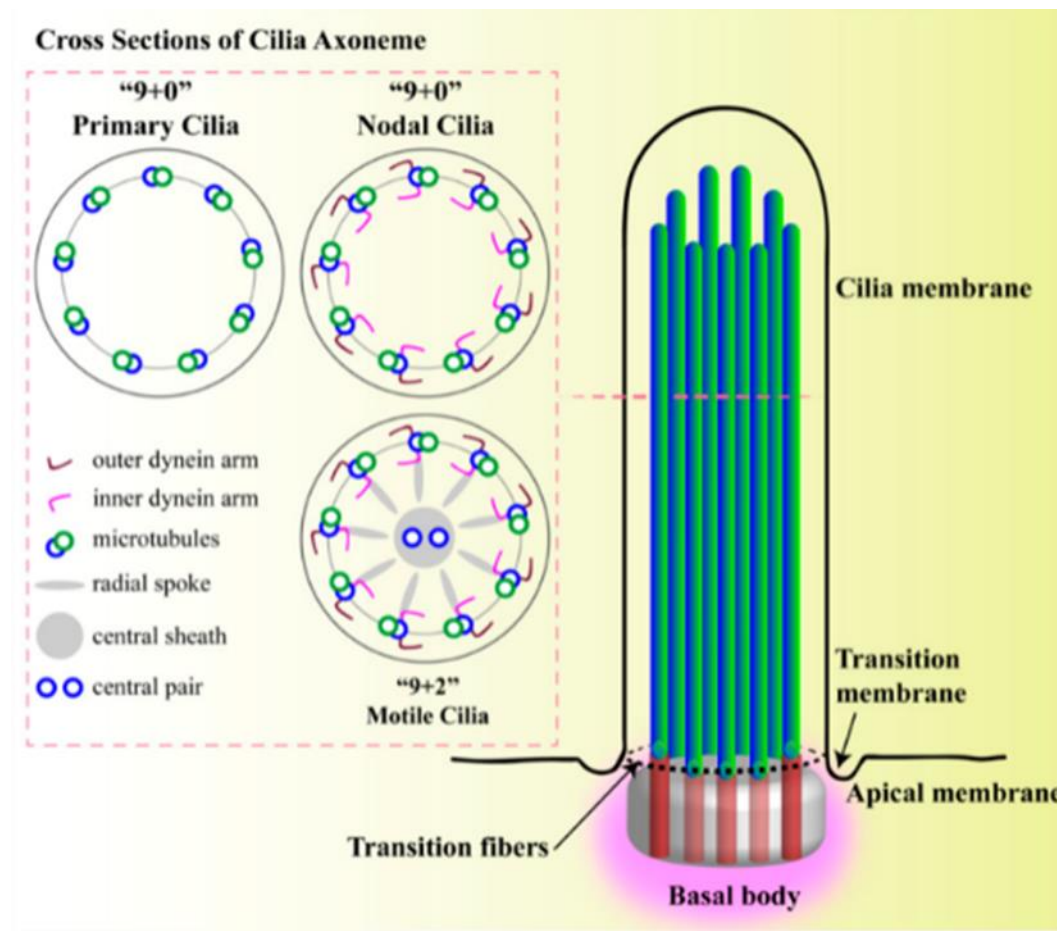
Ο πρωτεύοντας κροσσός που πήρε το όνομα του από τον Sergei Sorokin το 1968 (3) είναι ένα μονήρες καλά διατηρημένο οργανίδιο μήκους 5-10 μm που μοιάζει με κεραία και εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια των περισσότερων ευκαρυωτικών, μεταμιτωτικών κυττάρων(4,5) . Αποτελείται από ένα αξόνημα το οποίο συντίθεται από εννέα ζεύγη μικροσωληνίσκων και εκτείνεται από το βασικό σωματίο που με τη σειρά του προέρχεται από το μητρικό κεντριόλιο του κεντροσώματος και περιβάλλεται από ακτινωτή μεμβράνη. Η σύσταση της μεμβράνης που περιβάλλει τον κροσσό είναι μοναδική και σαφώς διαφορετική από την υπόλοιπη κυτταρική μεμβράνη (5,6). Σε σύγκριση με τις κινητές βλεφαρίδες, ο πρωτεύοντας κροσσός διαφοροποιείται όσον αφορά τις διατάξεις των μικροσωληνίσκων, καθώς επίσης στη δομή και τη λειτουργία. Η γεωμετρία και η σύνθεση των μικροσωληνίσκων εντός του ακτινωτού αξονήματος έχουν καθορίσει τους δύο κύριους ακτινωτούς τύπους: τον

τύπο «9+2» ο οποίος εντοπίζεται σε μαστίγια που κινούνται και τον τύπο «9+0» ο οποίος εντοπίζεται σε μαστίγια που δεν κινούνται και πιο συγκεκριμένα στον πρωτεύοντα κροσσό. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι, οι κινητές βλεφαρίδες έχουν τόσο ένα κεντρικό ζεύγος μικροσωληνίσκων, όσο και εσωτερικούς και εξωτερικούς βραχίονες δυνεΐνης και πρωτεΐνες, που παρακινούν την ολίσθηση των μικροσωληνίσκων ώστε να παραχθεί κίνηση (**Εικόνα 1**)(4,5)(6).



Εικόνα 1. Δομή κινητών βλεφαρίδων και πρωτεύοντα κροσσού. Χαρακτηριστική διαφορά η ύπαρξη ενός επιπλέον ζεύγους μικροσωληνίσκων στο κέντρο του άξονα των κινητών βλεφαρίδων «9+2»(7).

Εξαίρεση αποτελεί ένα τρίτος τύπος κροσσού που έχει τύπο «9+0» με κίνηση. Είναι γνωστός ως nodal cilium, εμφανίζεται μόνο στην πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου και σχετίζεται με την ασυμμετρία του σώματος αριστερά και δεξιά. Έχει παρόμοια δομή με τον πρωτεύοντα κροσσό, δηλαδή, δεν διαθέτει κεντρικό ζεύγος μικροσωληνίσκων, διαθέτει όμως βραχίονες δυνείνης που του επιτρέπουν να κινείται ή να περιστρέφεται σε κυκλική κατεύθυνση(Εικόνα 2)(8).



Εικόνα 2. Η δομή του πρωτεύοντα κροσσού και οι 3 διαφορετικοί τύποι βλεφαρίδων(8).

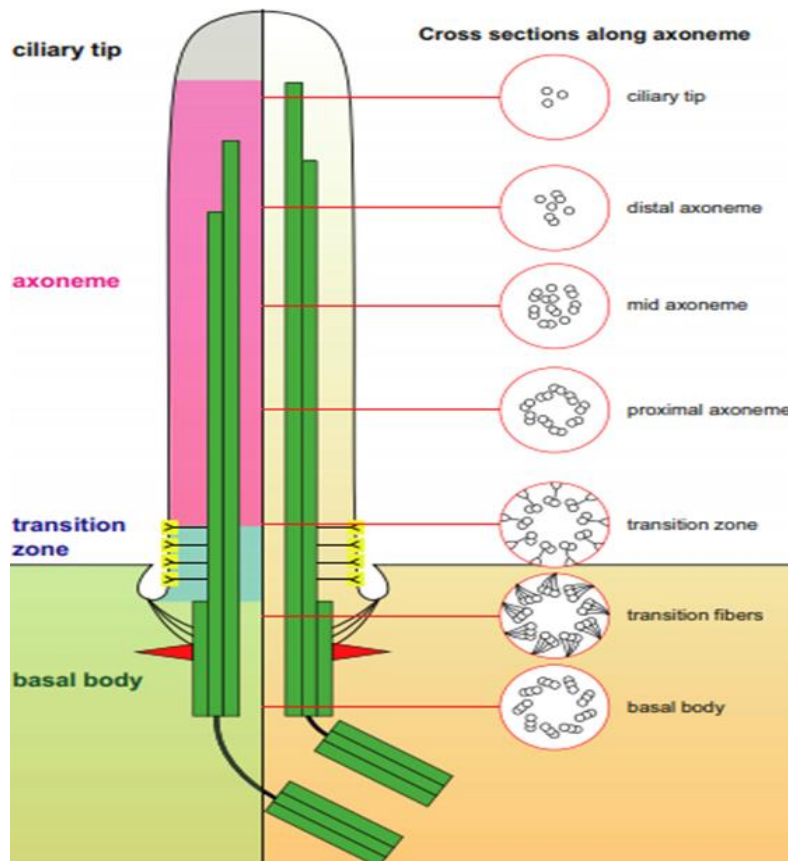
Ειδικότερα, στον πρωτεύοντα κροσσό οι μεταβατικές ίνες “αγκυροβολούν” το βασικό σωματίο στη βάση της ακτινωτής μεμβράνης και λειτουργούν ως σημεία σύνδεσης για σωματίδια ενδομαστιγικής μεταφοράς IFT)(8). Η IFT αποτελεί σύστημα μεταφοράς διπλής κατεύθυνσης υπεύθυνο για τη δημιουργία και τη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του πρωτεύοντα κροσσού, καθώς οι δομικές μονάδες των κροσσών, όπως οι τουμπουλίνες και άλλες πρωτεΐνες του αξονήματος, μετακινούνται από το σώμα του κυττάρου στην περιοχή συγκρότησης του κροσσού(5)(6) (8).Ο κροσσός επιμηκύνεται από το βασικό σωματίο με την προσθήκη νέων συστατικών από τη βάση προς το περιφερικό άκρο. Ρόλος του βασικού σωματίου είναι η οργάνωση των μικροσωληνίσκων του αξονήματος σε ζεύγη και η σταθεροποίηση του κροσσού στην κυτταρική επιφάνεια. Η πρωτεϊνική σύνθεση δεν συμβαίνει στον κροσσό, καθώς στερείται ριβοσωμάτων. Οι απαραίτητες για τη συγκρότηση του κροσσού πρωτεΐνες, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (σύμπλεγμα Golgi) και από εκεί με κυστίδια μεταφέρονται στη βάση του κροσσού, όπου τα κυστίδια συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνεται η πρωτεΐνη(9). Για αυτό το λόγο οι πρωτεΐνες που συντελούν στην κατασκευή της δομής πρέπει να μεταφέρονται διαρκώς πάνω-κάτω κατά μήκος των μικροσωληνίσκων. Η IFT που αρχικά περιγράφηκε στη *Chlamydomonas reinhardtii* περιλαμβάνει τη μεταφορά των δομικών υλικών κατά μήκος των μικροσωληνίσκων του αξονήματος από τη βάση προς την κορυφή του κροσσού μέσω της πρωτεΐνης κινεσίνη 2 (αποτελείται από τις υπομονάδες Kif3a και Kif3b) (Antero-grade IFT' πρόσω μεταφορά), καθώς και τη μεταφορά μέσω της δυνείνης 2 των υλικών που προέκυψαν

από την αποδόμηση του κροσσού προς την αντίθετη κατεύθυνση, από το κορυφαίο τμήμα του κροσσού προς το σώμα του κυττάρου, προκειμένου να ανακυκλωθούν (Retrograde IFT)(8). Τα σωμάτια για τη μεταφορά των δομικών υλικών, αποτελούν συμπλέγματα πρωτεϊνών που συνδέονται στενά πάνω στους μικροσωληνίσκους του αξονήματος τόσο με τα υλικά που μεταφέρουν όσο και με τις μεταφορικές πρωτεΐνες κινεσίνη 2 και δυνείνη 2. Η ρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στις δυο αυτές διαδικασίες διατηρεί με δυναμικό τρόπο σταθερό το μήκος του κροσσού. Εκτός από το βασικό σωμάτιο στο πλησιέστερο μέρος του πρωτεύοντα κροσσού είναι η μεταβατική ζώνη, η οποία συνδέει τους μικροσωληνίσκους του αξονήματος με την ακτινωτή (πλασματική) μεμβράνη με προσδέτες σχήματος Y και λειτουργεί ως φραγμός διάχυσης ή «πύλη» για τη ρύθμιση της εισόδου και εξόδου των ακτινωτών πρωτεϊνών (Εικόνα 3)(10). Σε ορισμένα κύτταρα, η μεταβατική ζώνη είναι “διακοσμημένη” με πρωτεΐνες “ακτινωτού κολιέ” ή έχει μια αναδίπλωση στη βάση του κροσσού που ονομάζεται ακτινωτός θύλακας. Κάθε ζεύγος μικροσωληνίσκων αποτελείται από δύο σωληνίσκους, έναν πλήρη που περιέχει 13 πρωτονημάτια(PF), και αναφέρεται ως σωληνίσκος Α, και έναν ατελή που περιέχει 10 PFs και αναφέρεται ως σωληνίσκος Β. Προς το άκρο του κροσσού, οι σωληνίσκοι Β τερματίζονται και οι διπλοί μικροσωληνίσκοι μεταβαίνουν σε μονήρεις σωληνίσκους Α δημιουργώντας μια μονή ζώνη.

Πιο συγκεκριμένα, οι βλεφαρίδες τύπου «9+0» βρίσκονται σε επιθηλιακά κύτταρα, όπως αυτά του νεφρικού σωληναρίου, αλλά και σε μη επιθηλιακά κύτταρα, όπως χονδροκύτταρα, ινοβλάστες και νευρώνες. Ωστόσο, το μοτίβο «9+0» του πρωτεύοντα κροσσού συχνά χάνεται στην άκρη του κροσσού όπου οι μικροσωληνίσκοι

διακόπτονται ή αλλάζουν θέση. Το τμήμα του κροσσού όπου τελειώνει το αξόνημα, ονομάζεται ακρολοφία του κροσσού(10).(11) Η ακρολοφία του κροσσού σχετίζεται με την δυναμική ανάπτυξη και απορρόφηση του αξονήματος, την αναδιαμόρφωση IFT και τη σηματοδότηση Hedgehog.

Σε διάφορους ιστούς και οργανισμούς έχουν παρατηρηθεί παραλλαγές της κανονικής διαμόρφωσης «9+0» όπως «8 + 1» ή «7 + 2»(10). Αυτό επιβεβαιώθηκε με μελέτες που έγιναν με εφαρμογή σειριακής τομογραφίας, ηλεκτρονικής τομογραφίας και χρήση κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με την μέθοδο παρασκευής δείγματος «κρυοαποκόλλησης» σε επιθηλιακά κύτταρα νεφρών και διαπιστώθηκε ότι η αξονική οργάνωσή του πρωτεύοντα κροσσού δεν ακολουθεί την κανονική διαμόρφωση 9 + 0. Παρατηρήθηκε συγκεκριμένα ότι, ενώ, η οργάνωση των μικροσωληνίσκων υπάρχει στη βάση του βλεφαριδίου, ο αριθμός των ζευγών μειώνεται προς την άκρη του. Στην πραγματικότητα τα τρία τέταρτα του αξονήματος αποτελούνται από μονά σωληνάρια Α τα οποία καταλήγουν σε διαφορετικές αποστάσεις από το βασικό σώμα. Ακόμη, είναι σημαντικό να τονιστεί πως το αξόνημα δεν είναι μια ευθεία δέσμη μικροσωληνίσκων αλλά περιστρέφεται σε διάφορα σημεία. Στα πολυκύτταρα ασπόνδυλα ο κροσσός περιορίζεται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, ενώ στα σπονδυλωτά υπάρχει ένα τέτοιο οργανίδιο στην επιφάνεια όλων των κυττάρων τους. Τέλος, τα ανώτερα φυτά δεν διαθέτουν κροσσό ή βλεφαρίδες(10).

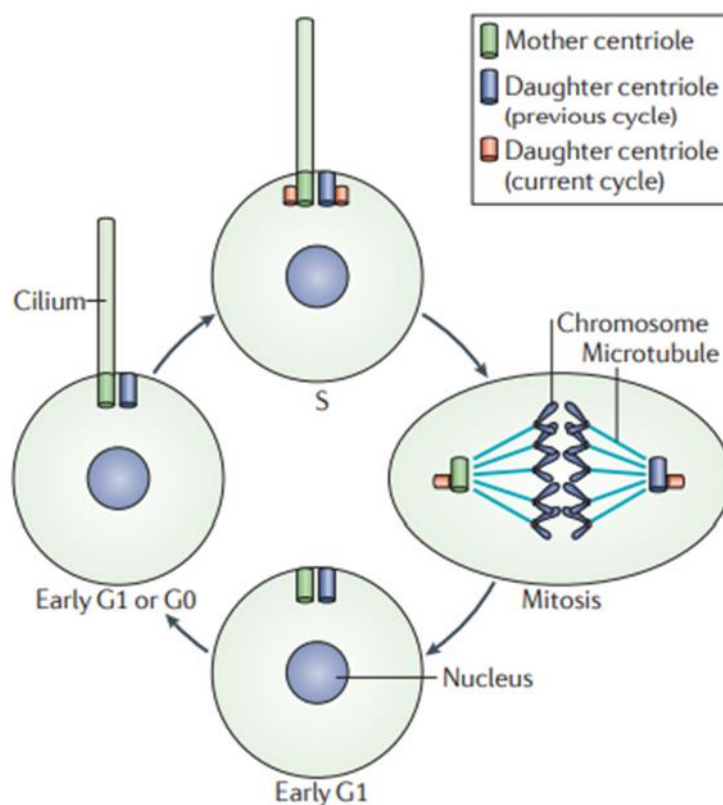


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των 4 βασικών μερών τα οποία αποτελούν τον πρωτεύοντα κροσσό. Φαίνονται με κίτρινο χρώμα οι σύνδεσμοι Υ οι οποίοι συνδέουν τους εννέα διπλούς μικροσωληνίσκους του άξονα με την ακτινωτή μεμβράνη(10).

1.2. Πρωτεύοντας κροσσός και κυτταρικός κύκλος

Σε φυσιολογικούς ιστούς, ο πρωτεύοντας κροσσός σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της G1 ή G0 και αποσυναρμολογείται κατά τη μετάβαση G2/M της μίτωσης. Στα διαιρούμενα κύτταρα, ο κροσσός αποσυναρμολογείται πριν από την κυτταρική διαίρεση και τα κεντριόλια κληρονομούνται από τα θυγατρικά κύτταρα, στα οποία λειτουργούν ως πρότυπα για την επόμενη γενιά κροσσών. Αυτός ο κύκλος δεν συμβαίνει σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία δεν υφίστανται διαίρεση.

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4** κατά τη διάρκεια της G1 φάσης, το μητρικό κεντριόλιο προσδένεται στον φλοιό των κυττάρων και εγκολπώνει ένα βλεφαρίδιο, ενώ το θυγατρικό κεντριόλιο από την προηγούμενη διαίρεση δεν σχηματίζει κροσσό. Κατά τη φάση S, το μητρικό και το θυγατρικό κεντριόλιο διπλασιάζονται ώστε να σχηματίσουν νέα κεντριόλια. Πριν από τη μίτωση στα περισσότερα κύτταρα, ο κροσσός αποσυναρμολογείται, επιτρέποντας στα ζεύγη κεντριολίων να αποσπαστούν από τον φλοιό και να μετακινηθούν στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, ώστε να βοηθήσουν στην οργάνωση και τη θέση της. Ο κροσσός ξανασχηματίζεται στα δύο θυγατρικά κύτταρα μετά την επανείσοδο στη φάση G1(12).

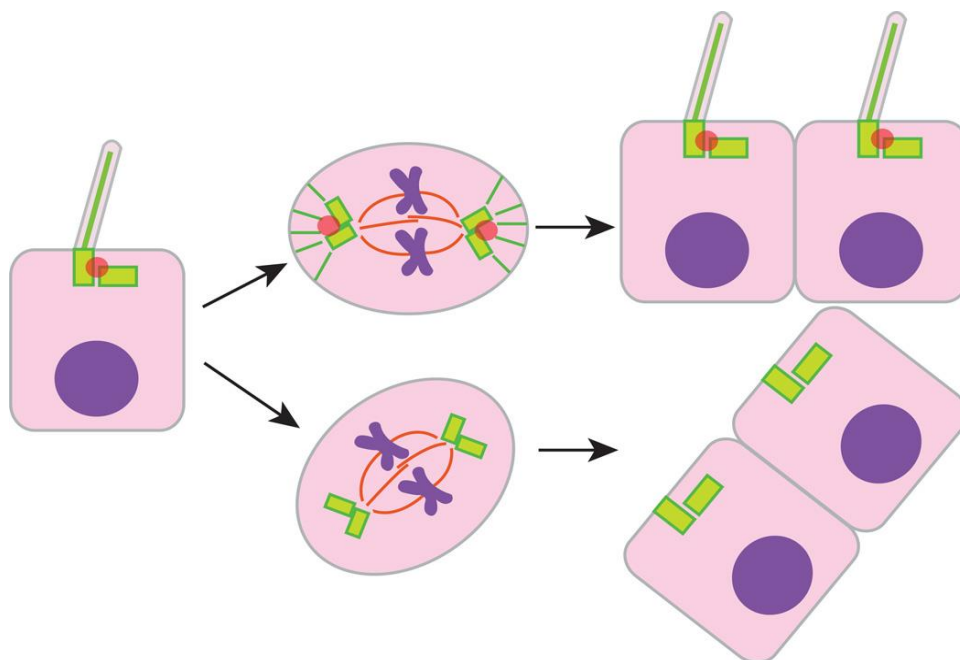


Εικόνα 4. Συγχρονισμός της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης του πρωτεύοντα κροσσού με τον κυτταρικό κύκλο(12).

Οι λόγοι για τον κύκλο συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης δεν είναι εντελώς ξεκάθαροι, ωστόσο πιστεύεται ότι, η αποσυναρμολόγηση εξασφαλίζει τον σωστό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Τα κεντριόλια που καθορίζουν τη θέση του άξονα της ατράκτου είναι προσαρτημένα στη ακτινωτή βάση, γι' αυτό το λόγο η επανατοποθέτηση των κεντριολίων στο εσωτερικό του κυττάρου απαιτεί συνήθως την αφαίρεση του κροσσού(12).

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της κυτοκίνησης, το αυλάκι διάσπασης σχηματίζεται κάθετα στον προσανατολισμό της ατράκτου, καθορίζοντας το αποτέλεσμα της χωρικής διάταξης των δύο θυγατρικών κυττάρων. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, ο κατάλληλος προσανατολισμός της κυτταρικής διαίρεσης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη μορφογενετική διαδικασία που οδηγεί στην τελική αρχιτεκτονική πολλών οργανωμένων ιστών. Ελαττώματα που αφορούν τους κροσσούς μπορούν να επηρεάσουν τον προσανατολισμό της κυτταρικής διαίρεσης με διάφορους τρόπους. Ο πρώτος σχετίζεται με τη διαταραχή του κύκλου των κροσσών-κεντροσωμάτων. Η απορρόφηση του πρωτεύοντα κροσσού πριν από τη μίτωση φαίνεται να είναι απαραίτητη για να απελευθερωθεί το κεντριόλιο για ωρίμανση σε ένα κεντρόσωμα ικανό να εγκολπώσει την διπολική μιτωτική άτρακτο. Κανονικά, το μητρικό κεντριόλιο που σχηματίζει το βασικό σωματίο περιορίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου με βάση τις αλληλεπιδράσεις των ακροφόρων προσαρτημάτων με τη μεμβράνη, καθώς και την πόλωση της εκκριτικής συσκευής για την υποστήριξη της μεμβράνης του κροσσού. Αυτοί οι μηχανικοί περιορισμοί μειώνονται κατά τη αποσυναρμολόγηση του, καθώς τα

κύτταρα πλησιάζουν στη μίτωση. Παρόλα αυτά, διατηρούνται ορισμένα στοιχεία που διέπουν τον εντοπισμό των κεντροσωμάτων. Η απώλεια ή οι δομικές ατέλειες του πρωτεύοντα κροσσού που προκύπτουν από μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτη τοποθέτηση των κεντροσωμάτων στην μιτωτική άτρακτο, αυξάνοντας έτσι την τυχαιότητα στον προσανατολισμό της κυτταρικής διαίρεσης. Ακόμη, η πρωτεΐνη IFT88 του μηχανισμού ενδομαστιγικής μεταφοράς (IFT) ελέγχει άμεσα τον προσανατολισμό της ατράκτου και άρα τον σωστό προσανατολισμό της κυτταρικής διαίρεσης μέσω της ρύθμισης του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων. Κύτταρα με μεταλλαγμένο IFT88 χαρακτηρίζονται από λανθασμένο προσανατολισμό του άξονα και οι πόλοι της ατράκτου στερούνται τις συστοιχίες των αστρικών μικροσωληνίσκων που αλληλεπιδρούν με τον φλοιό των κυττάρων για να προσανατολίσουν τον άξονα της ατράκτου(Εικόνα 5)(13).



Εικόνα 5. Προσανατολισμένη κυτταρική διαίρεση που ρυθμίζεται από τον κροσσό.(η κόκκινη σφαίρα αναπαριστά την πρωτεΐνη IFT88)(13).

1.3. Φυσιολογικός ρόλος

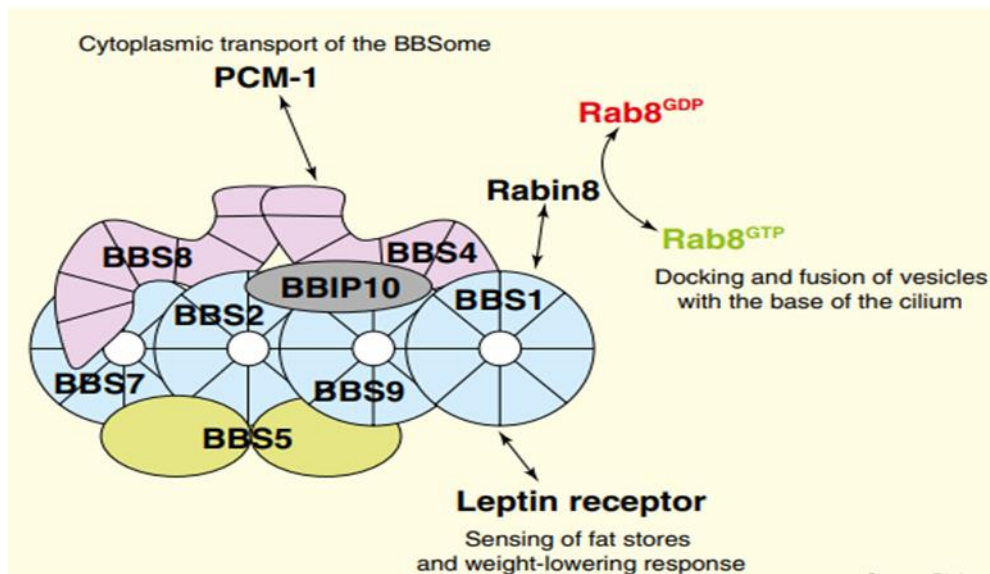
Για πολλά χρόνια ο ρόλος του πρωτεύοντος κροσσού στην φυσιολογία των κυττάρων ήταν άγνωστος καθώς δεν είχε μελετηθεί εκτενώς η δομή και η λειτουργία του. Τα τελευταία χρόνια όμως, έχει αποδεχθεί πως είναι ένα αισθητήριο κυτταρικό όργανο που ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα του εξωκυττάρου περιβάλλοντος και διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην δημιουργία και συντήρηση των οργάνων. Ακόμη, έχει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και σηματοδότηση των κυττάρων, καθώς συντονίζει πολυάριθμες σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση, καθώς και τη διακυτταρική επικοινωνία, μέσω της ανίχνευσης αλλαγών στο εξωκυττάριο περιβάλλον(14). Επίσης, συμμετέχει στον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου. Τέλος, λόγω της στρατηγικής κυτταρικής του θέσης μπορεί να προκαλέσει γρήγορες κυτταρικές αποκρίσεις(15).

1.4.BBSome

Ένα σημαντικό συστατικό του πρωτεύοντα κροσσού είναι το BBSome, ένα οκταμερές σύμπλεγμα (**Εικόνα 6**) καλά συντηρημένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με το Σύνδρομο Bardet-Biedl (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9) καθώς και την πρωτεΐνη BBIP10, που απαιτείται για τον πολυμερισμό και την ακετυλίωση των κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων, δύο λειτουργίες τις οποίες δεν μοιράζεται με καμία άλλη υπομονάδα του BBSome. Το σύμπλεγμα ανακαλύφθηκε το 2007(16) με βιοχημικό καθαρισμό κυττάρων θηλαστικών που περιέχουν BBS4 και είναι

απαραίτητο για τη μεταφορά του φορτίου των κυστιδίων κατά μήκος των μικροσωληνίσκων του αξονήματος, καθώς και για διάφορες διαδικασίες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό, όπως η δημιουργία του κροσσού, η μετανάστευση και η κυτταροδιαίρεση. Ομόζυγη μετάλλαξη σε οποιαδήποτε από τις υπομονάδες του BBSome μπορεί να προκαλέσει τύφλωση, παχυσαρκία, κώφωση, ανοσμία, υπερδακτυλία, καθώς και βλάβη στους νεφρούς(17).

Η πρώτη απόδειξη ότι το BBSome σχετίζεται με την λειτουργία του πρωτεύοντα κροσσού ήταν από μελέτες στο σκουλήκι *C. Elegans*, όπου τα μεταλλαγμένα BBS είχαν βραχύτερους κροσσούς λόγω έλλειψης συντονισμού του IFT μηχανισμού, δηλαδή της μεταφοράς πρωτεϊνών μεταξύ της άκρης και της βάσης του ακτινωτού άξονα(17). Ακόμη, ζωντανή ανάλυση της μεταφοράς φορτίου σε οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες αποκάλυψε ότι το σύμπλεγμα BBSome κινείται σε συνδυασμό με τον μηχανισμό IFT κατά μήκος των βλεφαρίδων, υποδηλώνοντας ότι το BBSome δρα ως προσαρμογέας φορτίου μεταξύ του φορτίου της μεμβράνης και του IFT(18). Σε άλλη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι το BBSome συνδέεται με την Rab8, τον συντελεστή ανταλλαγής GTP/GDP για τη μικρή GTPase Rab8(17). Η Rab8GTP εντοπίζεται στον κροσσό και προάγει την πρόσδεση και τη σύντηξη κυστιδίων φορέων ροδοψίνης στη βάση του κροσσού. Διατυπώθηκε ότι, το BBSome ελέγχει τη μεταφορά πρωτεϊνών κατά μήκος του κροσσού ρυθμίζοντας την ικανότητα της Rab8 να ενεργοποιεί τη Rab8. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε με την ανακάλυψη ότι ο υποδοχέας τύπου 3 της σωματοστατίνης (*Sstr3*) δεν μπορεί να φθάσει στον πρωτεύοντα κροσσό σε διαγονιδιακούς ποντικούς (*knock out*) για τα BBS4 και BBS2(8)(19).



Εικόνα 6. Το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα BBSome και οι μοριακές αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκεται(17).

2.Κυτταρικά μονοπάτια

Οι κροσσοί συμμετέχουν σε μια πληθώρα σηματοδοτικών οδών και ελέγχουν μέσω αυτών τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, αλλά και τη μορφογένεση και την ανάπτυξη. Υποδοχείς που δίνουν το έναυσμα για την εκκίνηση των οδών αυτών εντοπίζονται κατά μήκος των κροσσών(20).

Οι σηματοδοτικές οδοί στις οποίες συμμετέχουν είναι οι παρακάτω:

2.1. Σηματοδότηση Hedgehog (Hh)

Ο πρωτεύοντας κροσσός είναι κεντρικό και απαραίτητο οργανίδιο για τη μεταγωγή της οδού σηματοδότησης Hedgehog στα σπονδυλωτά. Το Hh γονίδιο ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στη *Drosophila melanogaster* μέσω γενετικών μελετών διερεύνησης των αναπτυξιακών ανωμαλιών των φτερών και αποδείχθηκε πως σχετίζεται με τις

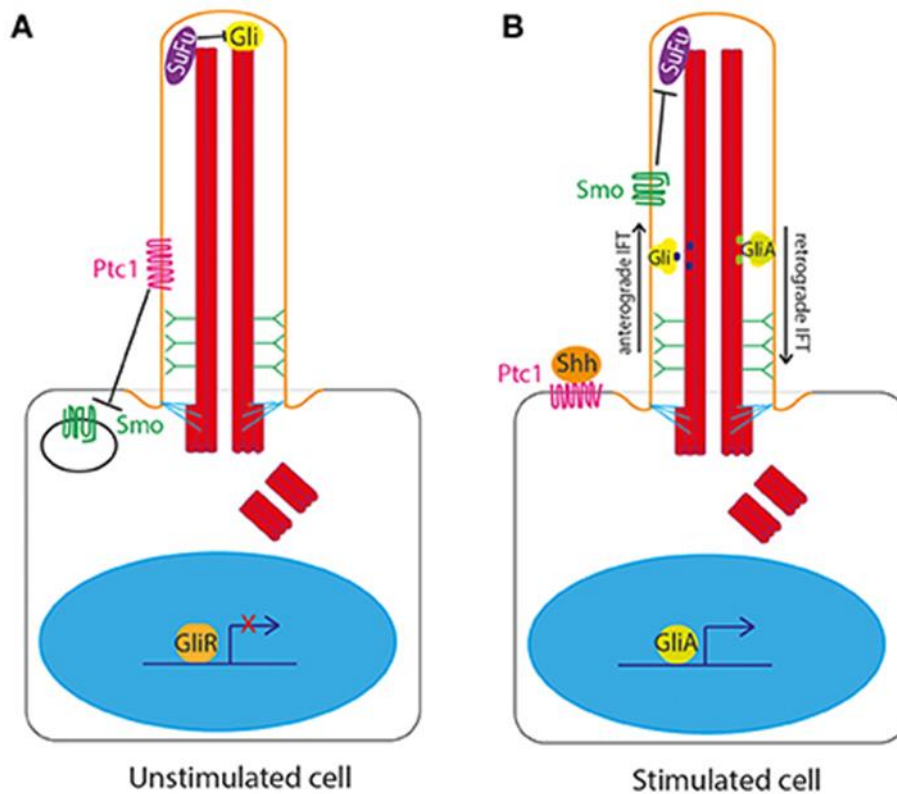
διαφορές που υπάρχουν στο πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του σώματος της. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις διαφορετικοί Hh υπότυποι που σχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών. Αυτοί είναι ο Shh (Sonic Hedgehog) που είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό πολλών οργάνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο Ihh (Indian Hedgehog) που έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των οστών και των χόνδρων και ο Dhh (Desert Hedgehog) που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των όρχεων και των έξω γεννητικών οργάνων. Ακόμη εμπλέκονται και σε άλλες λειτουργίες όπως είναι η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η μετανάστευση των κυττάρων και η κυτταρική επιδιόρθωση και αναγέννηση. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως και οι τρεις υπότυποι χρησιμοποιούν το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι(21).

Στην πλασματική μεμβράνη του πρωτεύοντα κροσσού συναντάται ο υποδοχέας του γονιδίου PTCH1 (Protein patched homolog 1) ο οποίος αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές περιοχές, δύο μεγάλες εξωκυττάρειες θέσεις στις οποίες προσδέεται ο προσδέτης Hh και μια μικρότερη ενδοκυττάρια. Παρουσία της πρωτεΐνης Hh έχουμε ενεργοποίηση του μονοπατιού καθώς προσδέεται στον υποδοχέα PTCH1. **(Εικόνα 7B)**, ενώ απουσία της έχουμε καταστολή του μονοπατιού **(Εικόνα 7A)**(22)(23).

Πιο συγκεκριμένα, με την πρόσδεση της Hh στον PTCH1 έχουμε ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smoothened (SMO) η οποία είναι ένας υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνες και διαθέτει την κλασική δομή των 7 διαμεμβρανικών περιοχών και μια πλούσια περιοχή με κατάλοιπα κυστεΐνης. Ο ρόλος της SMO είναι να μεταφέρει το σήμα από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες Gli (Glioma associated oncogene) οι οποίοι διαθέτουν έναν δακτύλιο ψευδαργύρου, ανήκουν στην οικογένεια Kruppel και ρυθμίζουν τη

μεταγραφή γονιδίων στόχων του μονοπατιού. Το αντίστοιχο ορθόλογο στη *Drosophila* είναι το Ci (Cubitus interruptus), ενώ στα σπονδυλωτά έχουν βρεθεί τρία ομόλογα, το GLI1 που είναι ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής και τα GLI2 και GLI3 που είναι πρωταρχικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης και έχουν τόσο ρόλο ενεργοποιητή όσο και καταστολέα. Οι πρωτεΐνες GLI όταν το μονοπάτι HH είναι ανενεργό συνδέονται με τη πρωτεΐνη Sufu (Suppressor of Fused) που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή όγκων. Η σύνδεση της με τις πρωτεΐνες GLI αποτρέπει την είσοδο τους στον πυρήνα γιατί φωσφορυλιώνονται και μετατρέπονται στην κατεσταλμένη μορφή GLIR, με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων (**Εικόνα 7A**)(23).

Στην αντίθετη περίπτωση όταν το μονοπάτι είναι ενεργό, ο προσδέτης HH προσδέεται στην PTCH1, απελευθερώνεται η SMO και φωσφορυλιώνεται. Η φωσφορυλίωση της SMO διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωσή της (σταθεροποιείται η ενεργή της μορφή και η λειτουργία της) και στον υποκυττάριο εντοπισμό της, καθώς προάγεται με αυτό τον τρόπο η συσσώρευση της στην πλασματική μεμβράνη του πρωτεύοντα κροσσού. Μετά την ενεργοποίησή της το σύμπλοκο Sufu-GLI μεταφέρεται στο άκρο του πρωτεύοντα κροσσού με τη βοήθεια της κινεσίνης KIF7 και διασπάται. Η KIF7 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση στο άκρο του πρωτεύοντα κροσσού και σε περίπτωση απουσίας της το Sufu-GLI εντοπίζεται διάσπαρτο σε διάφορα σημεία του κροσσού. Με τη διάσπαση του συμπλόκου ο GLI μετατρέπεται στην ενεργοποιημένη του μορφή GLIA και εισέρχεται στον πυρήνα με αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (**Εικόνα 7B**)(23).



Εικόνα 7. Α) Απουσία του προσδέτη HH το μονοπάτι είναι ανενεργό, Β) Παρουσία του προσδέτη HH το μονοπάτι ενεργοποιείται(23).

2.2 Σηματοδότηση Notch

Η σηματοδότηση Notch διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευρογένεση και στη διατήρηση της ανάπτυξης των ιστών στους ενθλικούς. Πιο συγκεκριμένα ρυθμίζει τη δυαδική επιλογή της κυτταρικής μοίρας των προγονικών κυττάρων καθώς αυτά διαχωρίζονται σε διαφορετικούς νευρωνικούς υποτύπους. Το σηματοδοτικό σύστημα Notch αποτελείται από τρεις προσδέτες Delta-like (Dll1, Dll3 και Dll4), δύο Jagged προσδέτες (Jagged1, Jagged2) και τέσσερις υποδοχείς (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4)(24). Ο υποδοχέας Notch3 αλληλεπιδρά με την Presenilin-2, ένα ένζυμο υπεύθυνο για τη διάσπαση και την ενεργοποίηση του Notch. Ο υποδοχέας Notch3 έχει αποδειχθεί ότι εντοπίζεται στην ακτινωτή μεμβράνη, ενώ η Presenilin-2

εντοπίζεται στο βασικό σώμα του πρωτεύοντα κροσσού (25). Κατά την ενεργοποίηση, ο υποδοχέας Notch διασπάται με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ενδοκυτταρικής περιοχής Notch (NICD), στον πυρήνα και την ενεργοποίηση βασικών μεταγραφικών παραγόντων όπως τα μέλη της οικογένειας γονιδίων HES και HEY(24). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ασυμμετρία αριστερά-δεξιά ρυθμίζοντας το μήκος των κροσσών του οργανισμού, ενώ σχετίζεται και με τη σηματοδότηση Hedgehog (25). Ωστόσο, από μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται πως η επίδραση του πρωτεύοντα κροσσού στην σηματοδότηση Notch είναι ιστοειδική. Παρατηρήθηκε πως απώλεια των BBS1 και BBS4 προκαλεί συσσώρευση του υποδοχέα Notch σε όψιμα ενδοσώματα zebrafish και μειωμένη λυσοσωμική αποικοδόμηση του. Αντίθετα, σε άλλες αναφορές, έχει περιγραφεί ενεργή σηματοδότηση Notch απουσία του πρωτεύοντα κροσσού στο πάγκρεας ποντικού, σε μια σειρά κυττάρων του μελαγχρωματικού επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς, καθώς και σε κάποιους ιστούς zebrafish. Συνεπώς, ο τρόπος ρύθμισης της σηματοδότησης Notch από τον πρωτεύοντα κροσσό φαίνεται να είναι ειδικός για κάθε κυτταρικό τύπο(26).

2.3 Σηματοδότηση Wnt

Ένα πολύ σημαντικό μονοπάτι που απαιτείται για τη μεταφορά πρωτεϊνών κατά μήκος του πρωτεύοντα κροσσού και τη φυσιολογική ρύθμιση του, είναι τα μονοπάτια Wnt (κανονική και μη κανονική οδός). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt είναι εξελικτικά συντηρημένο σε πολλά είδη, από τη *Drosophila* έως τον άνθρωπο, και η σηματοδότηση διεξάγεται μέσω του πρωτεύοντα κροσσού. Η σηματοδότηση Wnt

εμπλέκεται στην κυτταρική μετανάστευση, στην επίπεδη κυτταρική πολικότητα, στη νευρική διαμόρφωση, στην ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος και στην οργανογένεση(25). Η οικογένεια Wnt, είναι μια ομάδα εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί που ακολουθούνται από τα σηματοδοτικά μόρια Wnt είναι είτε μέσω της κανονικής οδού (καθορισμός της κυτταρικής μοίρας) είτε μέσω της μη κανονικής οδού (έλεγχος της κίνησης των κυττάρων και της ιστικής πολικότητας)(24). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ξεκινά με τη σύνδεση των προσδετών Wnt στους υποδοχείς της οικογένειας Frizzled και στους συνυποδοχείς τους. Ωστόσο, οι προσδέτες μπορούν επίσης να δεσμεύονται και σε μη-Frizzled υποδοχείς, όπως οι υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης ROR2 και RYK(24). Η πρόσδεση του Wnt σε μεμβρανικούς υποδοχείς (frizzled) μπορεί να ενεργοποιήσει τόσο την κανονική (εξαρτώμενη από τη β-κατενίνη) όσο και τη μη-κανονική (ανεξάρτητη από τη β-κατενίνη) σηματοδότηση Wnt. Παρουσία ενός κανονικού σήματος Wnt, τα κυτταροδιαλυτά επίπεδα της β-κατενίνης είναι υψηλά λόγω της αναστολής του συμπλόκου καταστροφής της β-κατενίνης. Συνεπώς, τα επίπεδα της β-κατενίνης αυξάνονται στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να μετατοπίζεται στον πυρήνα λειτουργώντας ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Η β-κατενίνη συνδέεται με τους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες T-cell factor (TCF) και lymphocyte enhancer factor (Lef), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με διάφορους μεταγραφικούς καταστολείς, όπως ο Groucho (25). Η μη κανονική οδός λειτουργεί μέσω των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{++} και των κινασών RhoA και Jnk και είναι σημαντική για την ρύθμιση της επίπεδης κυτταρικής πολικότητας (planar cell polarity;PCP). Η μη κανονική οδός είναι ανεξάρτητη από τη β-κατενίνη, αλλά εξαρτάται από την DSH (dishevelled)(27). Η inversin, αλληλεπιδρά με την DSH και στοχεύει το κυτταροπλασματικό κλάσμα της

DSH προς αποικοδόμηση. Θεωρείται ότι λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης που απαιτείται για τη μη κανονική σηματοδότηση Wnt και την καταστολή της δραστηριότητας της β-κατενίνης(25). Η *inversin* ρυθμίζει έτσι την ισορροπία μεταξύ της κανονικής και της μη κανονικής σηματοδότησης Wnt. Η μη-κανονική σηματοδότηση Wnt εμπλέκεται στον έλεγχο των λειτουργιών των ιστών και στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ιστών μέσω της διαμόρφωσης της μετανάστευσης και του προσανατολισμού των κυττάρων. Πιθανή σύνδεση ανάμεσα στους κροσσούς και την οδό Wnt είναι η πρωτεΐνη *inversin*, η οποία εντοπίζεται στη βάση του κροσσού. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη αυτή οδηγούν σε φαινοτύπους που σχετίζονται με παθήσεις των κροσσών, όπως η νεφρωνόφθιση τύπου 2, και ανωμαλίες στη δεξιά-αριστερή ασυμμετρία. Η κάμψη ή η ενεργοποίηση του κροσσού προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} και φαίνεται να ενεργοποιεί την *inversin*. Η είσοδος ασβεστίου εντός του κυττάρου αδρανοποιεί το κανονικό σκέλος της οδού Wnt και ενεργοποιεί το μη κανονικό. Φαίνεται ότι, η φυσιολογική λειτουργία των κροσσών, διατηρεί σε καταστολή το κανονικό σκέλος της σηματοδοτικής αυτής οδού(27)(28).

2.4 Σηματοδότηση TGF-β (Transforming growth factor beta)

Ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας βήτα (TGF-β) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό της συντήρησης των οστών ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την εναπόθεση της μήτρας και την κυτταρική μετανάστευση(29). Το σύμπλοκο TGF-β1/Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP), το οποίο εντοπίζεται στην εξωκυττάρια οστική μήτρα,

ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της οστεοκλαστικής απορρόφησης και απελευθερώνεται ως απόκριση σε τραυματισμό π.χ. κάταγμα οστού. Από πρόσφατες μελέτες προκύπτει πως υποδοχείς TGF-β1 και TGF-β2 εντοπίζονται εντός και γύρω από τον πρωτεύοντα κροσσό σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες και βλαστικά κύτταρα. Τόσο οι υποδοχείς TGF-β1 όσο και οι υποδοχείς TGF-β2 εντοπίζονται στην άκρη του καθώς και στα ενδοκυτταρικά κυστίδια στη βάση του κροσσού. Η διέγερση του TGF-β αυξάνει τον εντοπισμό των υποδοχέων με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης και την ενεργοποίηση των SMAD2/3 και ERK1/2 στην βάση του κροσσού, η οποία είναι αυξημένη στα βλαστικά κύτταρα που υφίστανται καρδιομυογένεση. Η επαγόμενη από τον TGF-β1 στρατολόγηση των ανθρώπινων μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) ρυθμίζεται επίσης από τον πρωτεύοντα κροσσό. Ο κροσσός μεσολαβεί αυτή την απόκριση μέσω διακριτού χωρικού εντοπισμού των υποδοχέων TGF-β και των συστατικών σηματοδότησης στον πρωτεύοντα κροσσό, με αποτέλεσμα η μεσολαβούμενη από τον TGF-β1 ενεργοποίηση του SMAD3 η οποία λαμβάνει χώρα στη βάση του κροσσού. Η σηματοδότηση μέσω του πρωτεύοντα κροσσού είναι απαραίτητη για την ανίχνευση μιας χημειοτακτικής βαθμίδας TGF-β1 σε ανθρώπινα οστικά MSCs, καταδεικνύοντας έναν νέο μηχανισμό ρύθμισης του σήματος TGF-β και στρατολόγησης σε βλαστικά κύτταρα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν τον πρωτεύοντα κροσσό ως πιθανό στόχο για την ενίσχυση της στρατολόγησης των MSCs και του οστικού σχηματισμού σε ορθοπεδικές παθήσεις(25).

2.5 Σηματοδότηση mTOR

Ο στόχος της ραπαμυκίνης των θηλαστικών (mTOR) είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που λειτουργεί ως κεντρικός ρυθμιστής του κυτταρικού μεταβολισμού, της κυτταρικής ανάπτυξης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και της επιβίωσης. Η mTOR συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες για να σχηματίσει συμπλέγματα ευαίσθητα στη ραπαμυκίνη (mTORC1) και συμπλέγματα χωρίς ευαισθησία στη ραπαμυκίνη (mTORC2). Το ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη σύμπλεγμα mTORC1 ρυθμίζει τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και το μέγεθος του κυττάρου, και επομένως φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική υπερπλασία(25). Η δραστηριότητα του mTORC1 είναι αυξημένη σε κύτταρα νεφρικών κύστεων ασθενών με πολυκυστική νόσο των νεφρών (ΠΚΝ) και η αναστολή της οδού mTOR με χορήγηση ραπαμυκίνης σε ποντίκια-πρότυπα ΠΚΝ περιορίζει την αύξηση των νεφρικών κύστεων(30). Στο φυσιολογικό νεφρό, το σύμπλεγμα πολυκυστίνης 1/πολυκυστίνης 2 αλληλεπιδρά με την τουμπερίνη (TSC2) και την αμαρτίνη (TSC1) γνωστές ως πρωτεΐνες της οζώδους σκλήρυνσης. Οι πολυκυστίνες 1 και 2 καθώς και η TSC1 εντοπίζονται στον πρωτεύοντα κροσσό. Συγκεκριμένα η TSC1 εντοπίζεται ως σύμπλεγμα στο βασικό σωματίο του κροσσού. Η TSC2 όταν βρίσκεται σε αυτό το σύμπλεγμα προστατεύεται από φωσφορυλίωση κι αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της μικρής πρωτεΐνης Rheb (G-πρωτεΐνη, μέλος της υπερ-οικογένειας Ras) και την αναστολή της δραστηριότητας του mTORC1. Αντίθετα, σε νεφρούς ασθενών με ΠΚΝ, η TSC2 φωσφορυλιώνεται μέσω κινασών με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αναστείλει την Rheb, και έτσι να

ενεργοποιείται η οδός mTOR2. Η σηματοδότηση mTOR και ο πρωτεύοντας κροσσός σχετίζονται με τον υπερ-πολλαπλασιασμό των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων, ο οποίος προκαλεί το σχηματισμό νεφρικών κύστεων(31). Πιο συγκεκριμένα η σχέση του σηματοδοτικού μηχανισμού mTOR με την λειτουργία των κροσσών έχει χαρακτηριστεί ως σχέση αισθητήρων ροής. Όταν υπάρχει ροή που προκαλεί παθητική κάμψη του κροσσού, ενεργοποιείται η Lkb1, μία κινάση που βρίσκεται στον κροσσό και η οποία φωσφορυλιώνει την AMP-activated protein kinase (AMPK) στη βάση του κροσσού με αποτέλεσμα να αναστέλλεται ο mTORC1 και να μειώνεται το μέγεθος του κυττάρου. Επιπλέον, ο mTORC1 ρυθμίζει το μήκος του κροσσού και, κατ' επέκταση, τη διατμητική τάση (shear stress) που ασκείται στη βάση του κροσσού. Φαίνεται μάλιστα να υπάρχει μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης ανάμεσα στην αντίληψη ροής υγρού και στο μήκος του κροσσού μέσω της οδού mTOR. Έτσι, όταν υπάρχει αυξημένη ροή υγρού, δηλαδή αυξημένο shear stress, αναστέλλεται ο mTORC1, και μειώνεται το μήκος του κροσσού, ώστε να τείνει να μειωθεί η διατμητική τάση(32)(33). Αντίθετα, μειωμένη ροή, δηλαδή μειωμένη διατμητική τάση, αυξάνει τη δραστηριότητα του mTORC1 με αποτέλεσμα να αυξάνει το μήκος του κροσσού ώστε να τείνει να αυξηθεί η διατμητική τάση. Επομένως, η οδός mTOR ρυθμίζει το μήκος του κροσσού σε συνθήκες μεταβαλλόμενης ροής υγρού και επομένως μεταβαλλόμενης διατμητικής τάσης(34).

2.6 Σηματοδότηση PDGF

Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor;PDGF) και οι υποδοχείς του (PDGFRs) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην επιβίωση των

κυττάρων, στον έλεγχο της ανάπτυξης, στον πολλαπλασιασμό, στη μετανάστευση των κυττάρων, στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στη διατήρηση της ανάπτυξης των ιστών. Ο PDGFR είναι ένας υποδοχέας κινάσης/τυροσίνης που μεσολαβεί σε συμβάντα σηματοδότησης μέσω του πρωτεύοντα κροσσού(35). Η μη φυσιολογική σηματοδότηση του PDGF προκαλεί μια σειρά ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης καρκίνου, της καρδιαγγειακής φλεγμονής ή της ίνωσης. Η σηματοδότηση PDGFR α συντονίζεται από τον πρωτεύοντα κροσσό σε καλλιιεργημένους εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών. Ο PDGFR α είναι ένας υποδοχέας κινάσης/ τυροσίνης που βρίσκεται εντός της μεμβράνης του κροσσού. Στους φυσιολογικούς ινοβλάστες και στην κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος, η πρόσδεση του προσδέτη PDGF-AA ενεργοποιεί τον διμερισμένο υποδοχέα PDGFR- α , ο οποίος επάγει μεταγενέστερες κυτταρικές αποκρίσεις μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών του καταρράκτη MEK/ERK. Αυτά τα μονοπάτια οδηγούν συγκεκριμένα στην κυτταρική ανάπτυξη, την ανάπτυξη του κυτταροσκελετού και την κυτταρική μετανάστευση και τη διαφοροποίησή τους. Ακολούθως, η σηματοδότηση του PDGFR α μέσω του πρωτεύοντα κροσσού των ινοβλαστών μπορεί επίσης να είναι σημαντική για την ομοίωση των ιστών, ενώ ελαττώματα σε αυτό το μονοπάτι πιθανά οδηγούνσε καρκινογένεση(25).

2.7 Σηματοδότηση Ca²⁺

Σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, ο πρωτεύοντας κροσσός εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης ασβεστίου Ca²⁺ μέσω δύο σημαντικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κροσσό,την πολυκυστίνη-1 (PC1) και την πολυκυστίνη-2 (PC2). Στον πρωτεύοντα κροσσό του νεφρικού επιθηλίου και του

αγγειακού ενδοθηλίου, η PC2 συν-εντοπίζεται με την PC1 και λειτουργεί ως συστατικό ενός μηχανοαισθητήριου συμπλέγματος. Η ενεργοποίηση της PC2 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} . Η παθητική κάμψη των κροσσών που προκαλείται από τη ροή υγρού προκαλεί παραμόρφωση του κυτταροσκελετού και κάμψη της μεμβράνης στη βάση του κροσσού. Αυτό βοηθά την εξωκυττάρια εισροή Ca^{2+} μέσω του PC2, γεγονός που διεγείρει περαιτέρω την απελευθέρωση Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρια αποθήκες μέσω της διέγερσης των υποδοχέων ρυανοδίνης. Ενδοκυτταρικοί καταρράκτες σηματοδότησης ενεργοποιούνται από την εισροή Ca^{2+} , οδηγώντας σε τροποποιημένη έκφραση γονιδίων στην αριστερή πλευρά του εμβρύου ή προωθώντας τη μεταφορά νερού στους νεφρούς. Ωστόσο, σε άλλους οργανισμούς η κάμψη του ακτινωτού ως απόκριση στη δύναμη του υγρού δεν ανοίγει τα κανάλια Ca^{2+} . Αντ' αυτού, η εισροή Ca^{2+} , μπορεί να οφείλεται σε διάχυση από το κυτταρικό σώμα ή να προκαλείται από κατεστραμμένη μεμβράνη του κροσσού σε απόκριση σε ακραία επίπεδα διατμητικής δύναμης(25)(34).

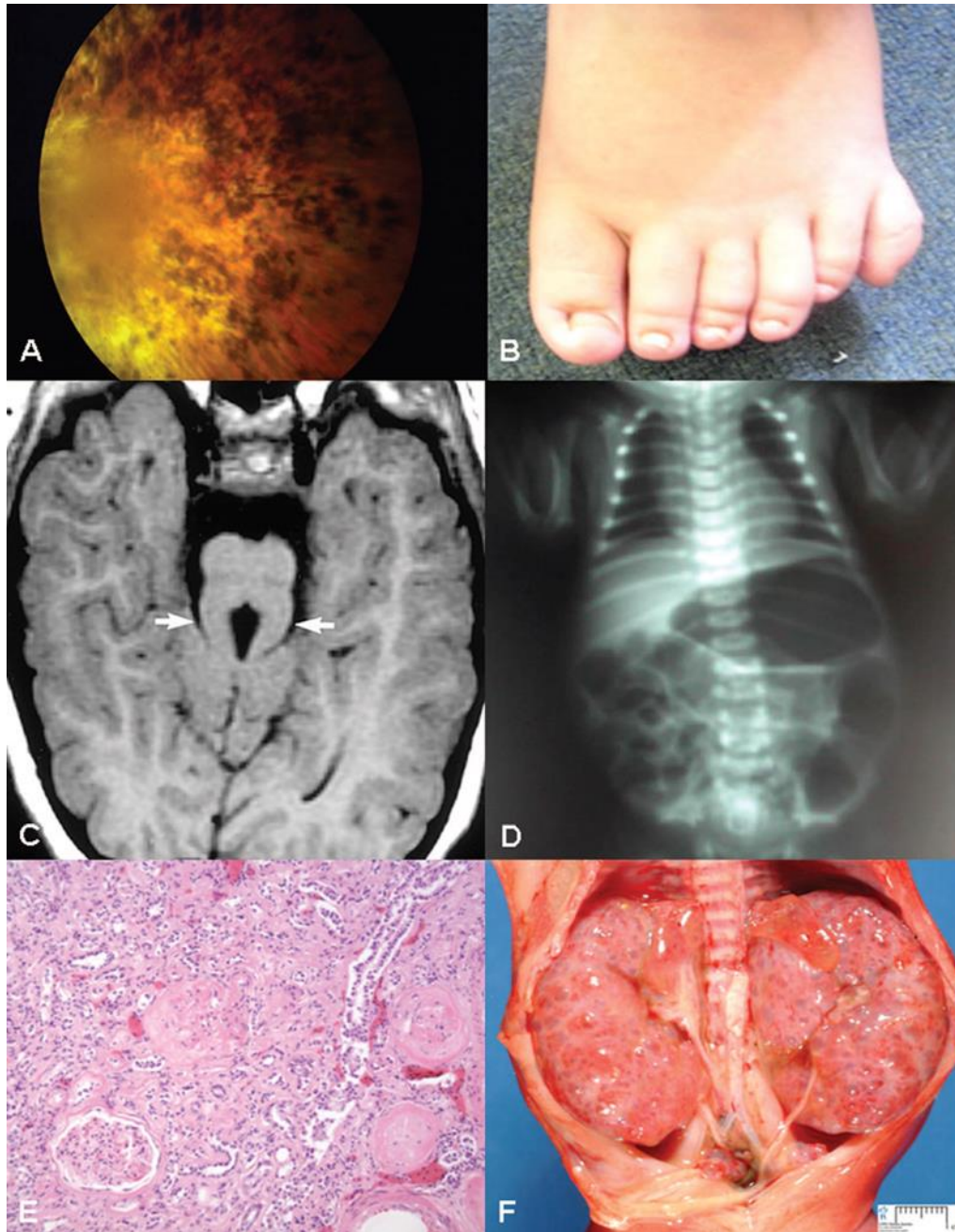
2.8. Παθοφυσιολογία σχετιζόμενη με τον πρωτεύοντα κροσσό

Η δυσλειτουργία του πρωτεύοντα κροσσού οδηγεί σε έναν μεγάλο εύρος αναπτυξιακών και εκφυλιστικών κληρονομικών διαταραχών που συνδυάζονται και δημιουργούν ένα μεγάλο φάσμα ανθρώπινων ασθενειών που επηρεάζουν σχεδόν οποιοδήποτε κύριο όργανο του σώματος. Το γεγονός πως ο πρωτεύοντας κροσσός εμπλέκεται σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια και είναι σημαντικός ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης εντείνει την άποψη πως ελαττώματα στην συναρμολόγηση ή τη λειτουργία του, μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και τη

συνολική φυσιολογία του οργανισμού και να οδηγήσουν σε ασθένειες που είναι γνωστές ως Κροσσοπάθειες (Ciliopathies) πρωτογενών κροσσών. Οι διαταραχές εκδηλώνονται με ποικίλους κλινικούς φαινοτύπους όπως, εκφυλισμό του αμφιβληστροειδούς, πολυδακτυλία, situs inversus (αναστροφή της θέσης των σπλάγγχνων), νοητική υστέρηση, εγκεφαλοκήλη (λόγω αποτυχίας κλεισίματος του νευρικού σωλήνα) και κύστεις στο νεφρό, το συκώτι και το πάγκρεας. Γνωστές Κροσσοπάθειες είναι το σύνδρομο Bardet-Biedl (BBS), το σύνδρομο Meckel-Gruber (MKS), το σύνδρομο Joubert (JBTS) και η πολυκυστική νόσος των νεφρών. Όσον αφορά την πολυκυστική νόσο των νεφρών σε έρευνα επιβεβαιώθηκε η σχέση μεταξύ του πρωτεύοντα κροσσού και της παθογένειας της νόσου(18). Ο διμερισμός της πολυκυστίνης-1 και της πολυκυστίνης-2 έχει ως αποτέλεσμα ένα λειτουργικό κανάλι ευαίσθητο στο ασβέστιο, που εντοπίζεται στους κροσσούς των νεφρών. Οι ανωμαλίες μιας ή και των δύο πολυκυστινών (που υπάρχουν στις βλεφαρίδες των νεφρών) ή η ακτινογένεση μπορεί να αποτελούν τη βάση της παθογένειας της νόσου(36).

Πιο συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί μεσολαβητές της σηματοδότησης Hedgehog (Hh) στην επιφάνεια του πρωτεύοντα κροσσού. Διαταραχές στη συγκεκριμένη οδό έχουν ανιχνευθεί σε μια ποικιλία κακοηθειών (καρκίνος στον πνεύμονα, στον εγκέφαλο, στο πάγκρεας, στον μαστό, στο παχύ έντερο κ.λπ.), καθώς και του μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα(37). Ακόμη νέα δεδομένα δείχνουν ότι σε καρκίνους όπως του προστάτη η απώλεια του πρωτεύοντα κροσσού προκαλεί ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της οδού Wnt, που συνεπάγεται χειρότερη έκβαση για τους ασθενείς(38).

Εξίσου σημαντικός είναι ο ρόλος του πρωτεύοντα κροσσού στην φλεγμονή, καθώς επηρεάζεται από την ιντερλευκίνη-1β(IL-1) και συνεπώς σχετίζεται με την κυτταροπλασματική σηματοδότηση NF-κB, συμμετέχοντας στην φλεγμονώδη απόκριση. Σε πειράματα που έγιναν, πρωτογενή χονδροκύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IL-1 και παρουσίασαν 50 % αύξηση του μήκους των κροσσών μετά από 3 ώρες έκθεσης. Η επαγόμενη από την IL-1 επιμήκυνση των κροσσών παρατηρήθηκε επίσης σε ανθρώπινους ινοβλάστες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως στα χονδροκύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IL-1 παρατηρήθηκε χαρακτηριστική αύξηση στην απελευθέρωση των φλεγμονωδών χημειοκινών, του οξειδίου του αζώτου και της προσταγλανδίνης E2. Ωστόσο, σε κύτταρα με μετάλλαξη στον IFT88, δεν παρατηρήθηκε αυτή η απόκριση στην IL-1. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς ο IFT σχετίζεται άμεσα με το μήκος του πρωτεύοντα κροσσού το οποίο είναι σημαντικό για τη σωστή λειτουργία των κροσσών. Έτσι δυσλειτουργία του πρωτεύοντα κροσσού έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές της κυτταροπλασματικής σηματοδότησης NF-κB(39).



Εικόνα 8. Χαρακτηριστικά των κροσσοπαθειών. Α) Μελαχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, Β) Πολυδακτυλία, Γ) Πεπαχυμένα παρεγκεφαλιδικά σκέλη, Δ) Στενωμένος θώρακας, Ε) Σπειραματική υαλοειδοποίηση και ίνωση, Ζ) Κυστική νόσος νεφρών άμφω σε έμβρυο(40).

3. Μεσοθηλιακά κύτταρα

3.1. Εντόπιση

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα μονόστιβο χιτώνα που καλύπτει την επιφάνεια τριών ορογόνων κοιλοτήτων (υπεζωκοτική, περικαρδιακή και περιτοναϊκή) και τα όργανα που βρίσκονται μέσα σε αυτές τις κοιλότητες. Στα αρσενικά το μεσοθήλιο επενδύει τον σάκο που περιβάλλει τους όρχεις. Το σπλαχνικό μεσοθήλιο καλύπτει τα εσωτερικά όργανα (όπως οι πνεύμονες) ενώ το τοιχωματικό τοίχωμα της ορογόνου κοιλότητας. Δεν έχουν εντοπιστεί σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεσοθηλιακών κυττάρων στον σπλαχνικό ή τον βρεγματικό υπεζωκότα, ή μεταξύ εκείνων στην υπεζωκοτική, περιτοναϊκή ή περικαρδιακή κοιλότητα. Εμβρυολογικά, τα μεσοθηλιακά κύτταρα προέρχονται από το μεσόδερμα, αν και εκφράζουν πολλές ιδιότητες επιθηλιακών κυττάρων. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα μπορεί να ποικίλουν σε σχήμα (από επίπεδα έως κυβοειδή) και σε μέγεθος, που κυμαίνεται από περίπου 10 έως 50 μm σε διάμετρο και από 1 έως πάνω από 4 μm σε πάχος, με κεντρικά εδραζόμενο κυκλικό ή ωοειδή πυρήνα και χαρακτηριστικές επιφανειακές μικρολάχνες (**Εικόνα 9**). Η κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων έχει ένα καλά αναπτυγμένο περίγραμμα μικρολαχνών που ποικίλουν σε μήκος, σχήμα και πυκνότητα. Έχουν αναφερθεί διακυμάνσεις στη συγκέντρωση τους στα μεσοθηλιακά κύτταρα διαφορετικών οργάνων(41). Η σύνδεση μεταξύ των μεσοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιείται μέσω στεγανών συνδέσεων συνδέσεων πρόσφυσης, χασματικών συνδέσεων και δεσμοσωμάτων. Τα κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα έχει παρατηρηθεί πως εκκρίνουν επιφανειακές γλυκοσαμινογλυκάνες, κυρίως υαλουρονικό, το οποίο συγκεντρώνεται πάνω στις μικρολάχνες

προστατεύοντας τα κύτταρα από φυσική ζημιά ή από μολύνσεις. Επίσης η έκκριση του υαλουρονικού πιστεύεται ότι προστατεύει τον οργανισμό από ανάπτυξη όγκων(42).

Ακόμη, τα μεσοθηλιακά κύτταρα περιέχουν μικροσωληνίσκους, μικροϊνίδια, γλυκογόνο, κυστίδια (εμπλέκονται στην μεταφορά υγρού και μορίων κατά μήκος του μεσοθηλίου), κενοτόπια, σύστημα Golgi και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Έχει παρατηρηθεί πως τα κυβοειδή κύτταρα έχουν μεγαλύτερο πυρήνα, άφθονα μιτοχόνδρια και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, καλά αναπτυγμένο σύμπλεγμα Golgi, μικροσωληνίσκους, συγκριτικά μεγαλύτερο αριθμό μικροϊνιδίων και πολυάριθμες μακριές μικρολάχνες σε σχέση με τα πλακώδη. Αυτό ενισχύει την άποψη πως τα κυβοειδή είναι πιο ενεργά μεταβολικά κύτταρα με αυξημένη συνθετική και εκκριτική λειτουργία(42).



Εικόνα 9. Scanning electron micrograph (SEM) της κορυφαίας επιφάνειας του μεσοθηλιώματος που καλύπτεται με ένα στρώμα μικρολαχνών(41).

Παρόλο που το μεσοθήλιο αποτελείται κυρίως από πλακώδη κύτταρα και είναι ο κύριος κυτταρικός τύπος του τοιχωματικού υπεζωκότα, τα κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν να βρεθούν σε διάφορες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των διαφραγματικών πτυχών του υπεζωκότα, των παρεγχυματικών οργάνων (ήπαρ, σπλήνας) και της περιτοναϊκής πλευράς του διαφράγματος. Κύτταρα που είναι μορφολογικά παρόμοια με τα κυβοειδή μεσοθηλιακά κύτταρα μπορούν επίσης να εντοπιστούν μετά από τραυματισμό ή διέγερση των οροδών επιφανειών(41)(42).

3.2. Ρόλος τους στις κοιλότητες

Το μεσοθήλιο αρχικά θεωρήθηκε πως ήταν ένας απλός ιστός με μοναδικό ρόλο την παροχή μιας ολισθηρής, μη κολλητικής και προστατευτικής επιφάνειας ώστε να διευκολύνεται η κίνηση των οργάνων μέσα στις κοιλότητες του σώματος, μέσω της έκκρισης φωσφατιδυλοχολίνης που έχει το ρόλο λιπαντικού με αποτέλεσμα να μειώνονται οι τριβές κατά την αναπνοή. Ωστόσο, πλέον το μεσοθήλιο, θεωρείται μια δυναμική μεμβράνη, η οποία εμπλέκεται σε ποικιλία δράσεων, που αποβλέπουν στη διατήρηση της ακεραιότητας και την υποστήριξη της λειτουργίας φυσιολογικών οροδών επιφανειών. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική και παρακυτταρική μεταφορά νερού και ηλεκτρολυτών, στην παρουσίαση αντιγόνου και στην έκκριση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων, πρωτεασών και συστατικών εξωκυττάριας μήτρας. Όπως αναφέρθηκε τα μεσοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως τον TGF- β , τον αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών, τον αυξητικό παράγοντα ηπατοκυττάρων (HGF), τον

αυξητικό παράγοντα κερατινοκυττάρων (KGF) και μέλη της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), που ξεκινούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγουν την διαφοροποίηση και μετανάστευση των μεσοθηλιακών και υπομεσοθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν μια βλάβη(41)(42).

3.3. Λειτουργίες μεσοθηλιακών κυττάρων

Το μεσοθήλιο είναι ένας αργά ανανεώσιμος ιστός (με 0,16 – 0,5 % των κυττάρων να βρίσκονται σε μίτωση κάθε φορά) που μπορεί να διεγερθεί από μία ποικιλία παραγόντων πολλαπλασιασμού, χημειοτακτικών παραγόντων και από φυσική βλάβη έτσι ώστε να αυξήσει το ρυθμό ανανέωσης του. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά κύτταρα που συμμετέχουν στην ορόδη φλεγμονή εκκρίνοντας διάφορους προ-, αντι- και ανοσορρυθμιστικούς μεσολαβητές. Στους τελευταίους περιλαμβάνονται προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, χημειοκίνες, νιτρικό οξείδιο (NO), ρίζες αζώτου και οξυγόνου, αντιοξειδωτικά ένζυμα, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, μόρια εξωκυτταρικής μήτρας και προϊόντα που σχετίζονται με την ενεργοποίηση της ενδογενούς ή εξωγενούς οδού πήξης. Αυτοί οι μεσολαβητές απελευθερώνονται ως απόκριση σε βακτηριακές ενδοτοξίνες, κυτοκίνες και αμίαντο, με σκοπό την αποκατάσταση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας της ορογόνου μεμβράνης. Όταν τραυματίζονται, τα μεσοθηλιακά κύτταρα ξεκινούν μια σειρά από διαδικασίες που οδηγούν είτε στην πλήρη αναγέννηση του μεσοθηλίου είτε στην ανάπτυξη παθολογιών όπως οι συμφύσεις. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός πως η επούλωση εμφανίζεται κατά μήκος του τραύματος και όχι μόνο στα

άκρα όπως συμβαίνει με τα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτό συμβαίνει λόγω του ελεύθερου πληθυσμού μεσοθηλιακών κυττάρων που έχουν την δυνατότητα να προσκολλώνται στην τραυματισμένη περιοχή (42).

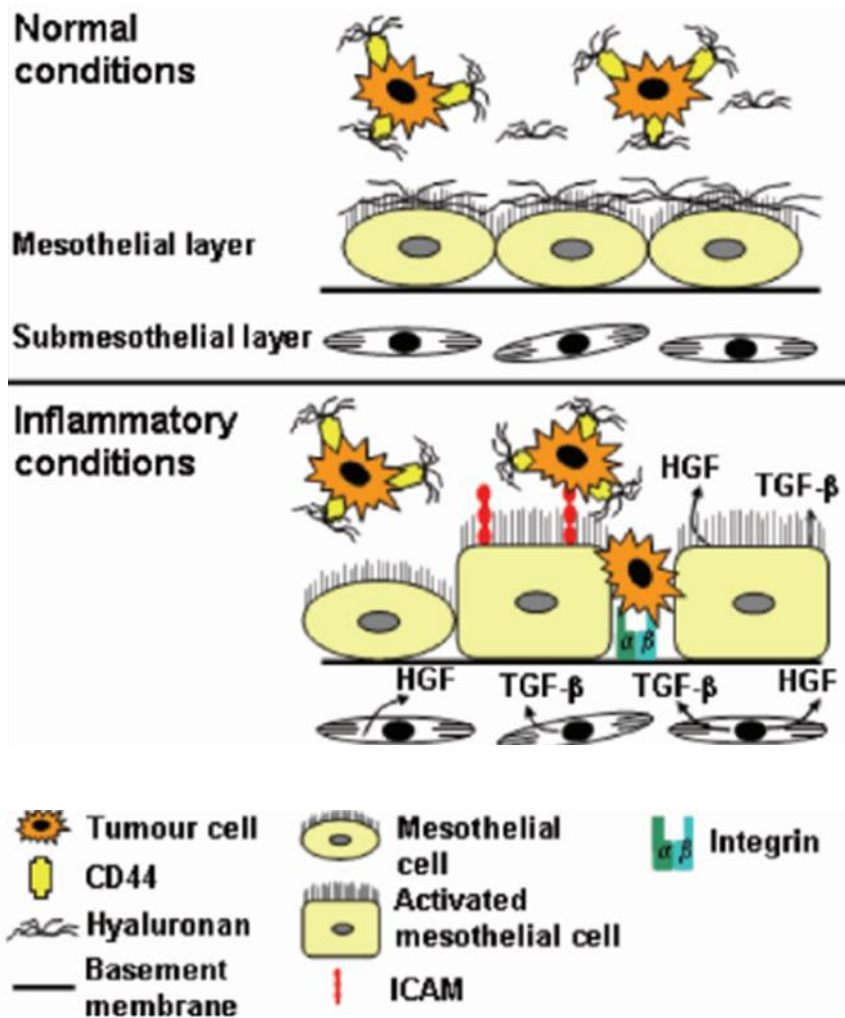
Ακόμη τα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα εκφράζοντας κάποια βοηθητικά μόρια στην επιφάνειά τους. Το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1 είναι το μείζον βοηθητικό μόριο για την παρουσίαση αντιγόνου από τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Η αντιγονοπαρουσίαση και η ενεργοποίηση των T κυττάρων είναι τα πρώτα βήματα στη δημιουργία μίας συγκεκριμένης ανοσιακής απάντησης(43).

Μια από τις πιο βασικές λειτουργίες του μεσοθηλίου είναι πως εμπλέκεται στη μεταφορά υγρού και μορίων κατά μήκος των ορογόνων κοιλοτήτων μέσω πινοκυτταρικών κυστιδίων, ενδοκυτταρικών συνδέσεων και στομάτων (ανοίγματα στην συνένωση δύο ή περισσότερων μεσοθηλιακών κυττάρων, που έχουν διάμετρο 3-12 μm και βρίσκονται κυρίως σε περιοχές όπου υπάρχουν κυβοειδή κύτταρα). Οι πολλές μικρολάχνες αυξάνουν την επιφάνεια της κορυφαίας επιφάνειας του κυττάρου, διευκολύνοντας έτσι την απορρόφηση. Τα επίπεδα μεσοθηλιακά κύτταρα σχετίζονται κυρίως με την μεμβρανική μεταφορά ενώ τα κυβοειδή έχουν ένα ευρύτερο φάσμα λειτουργικών δραστηριοτήτων(42).

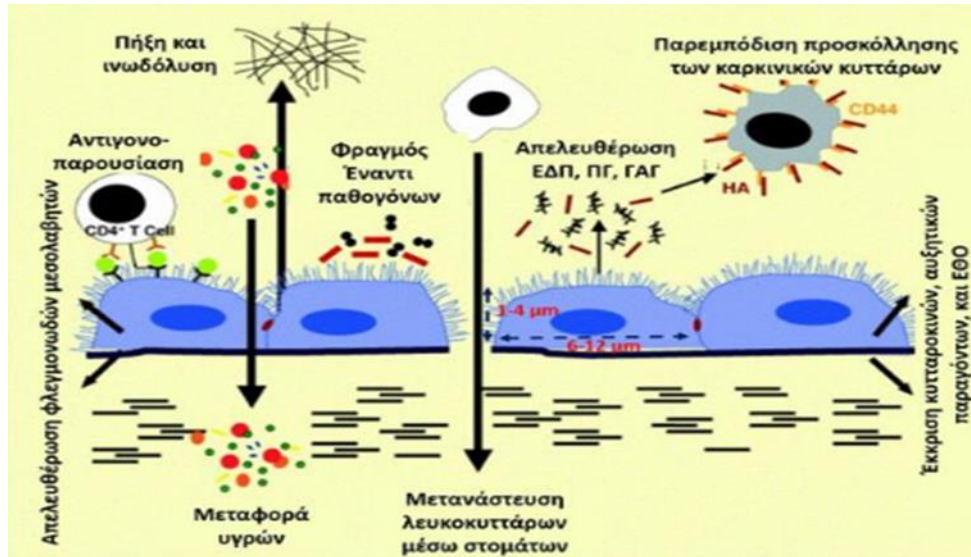
Ακόμη, τα μεσοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζουν την πήξη του αίματος μέσω του ιστικού παράγοντα με τον οποίο ξεκινάει ο καταρράκτης της πήξης. Επίσης έχουν ινωδολυτική δραστηριότητα μέσω της έκκρισης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA) που μετατρέπει το πλασμινογόνο σε ενεργό πλασμίνη η οποία διασπά τους θρόμβους. Η ινωδολυτική δραστηριότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων

παίζει σπουδαίο ρόλο στην παρεμπόδιση και απομάκρυνση θρόμβων αίματος που σχηματίζονται μετά από τραυματισμό και μόλυνση των ορογόνων μεμβρανών. Εάν η ινωδολυτική δραστηριότητα δεν είναι επαρκής, ινώδεις προσκολλήσεις σχηματίζονται μεταξύ απέναντι ορογόνων επιφανειών με σοβαρές παθολογικές συνέπειες(42).

Τέλος, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες το ελεύθερο υαλουρονικό οξύ στο ορώδες υγρό δεσμεύεται στα μόρια CD44(υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος) των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας τη σύνδεση του όγκου με το υαλουρονικό οξύ στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, σε περίπτωση φλεγμονής, οι τραυματισμένες περιοχές του μεσοθηλίου αποτελούν θέσεις που ευνοούν την προσκόλληση νεοπλασματικών κυττάρων πιθανότατα εξαιτίας της πρόσδεσης των κυττάρων αυτών στο περίβλημα υαλουρονικού οξέος των μεσοθηλιακών κυττάρων, λόγω της αυξημένης παραγωγής μορίων προσκόλλησης (συμπεριλαμβανομένων των HGF και TGF-β) σε απάντηση φλεγμονωδών παραγόντων και έκθεσης στην υποκείμενη εξωκυττάρια μήτρα. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο περικυτταρικό περίβλημα υαλουρονικού οξέος των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι ένα σημαντικό βήμα στην περιτοναϊκή εξάπλωση του καρκίνου των ωοθηκών. Παρεμπόδιση των αλληλεπιδράσεων του υαλουρονικού οξέος με τον υποδοχέα CD44 έχει ως αποτέλεσμα μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης(42).



Εικόνα 10. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ελεύθερο υαλουρονικό οξύ στο ορώδες υγρό δεσμεύεται στα καρκινικά κύτταρα μειώνοντας τη σύνδεση του όγκου με το υαλουρονικό οξύ στην επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα σε περίπτωση φλεγμονής μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένων των HGF και TGF- β , παράγονται από ενεργοποιημένα μεσοθηλιακά κύτταρα και τους υπομεσοθηλιακούς ινοβλάστες, γεγονός που οδηγεί σε στρωγγυλοποίηση των μεσοθηλιακών κυττάρων και έκθεση της ECM. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν στα ICAMs (intercellular adhesion molecule) των ενεργοποιημένων μεσοθηλιακών κυττάρων και στην εκτεθειμένη ECM μέσω ιντεγκρινών(44).

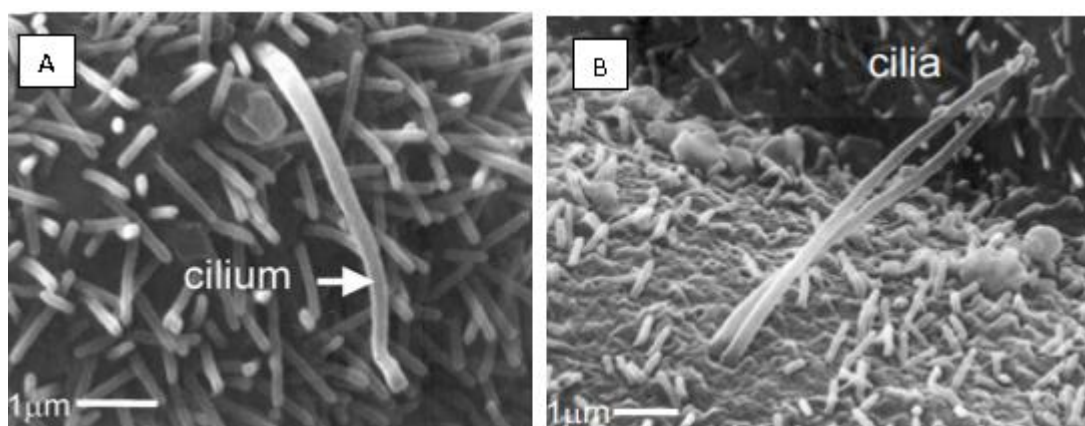


Εικόνα 11. Λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων. (ΕΔΠ:επιφανειοδραστικός παράγοντας, ΠΓ: πρωτεογλυκάνες, ΓΑΓ: γλυκοζαμινογλυκάνες, ΕΘΟ: εξωκυττάρια θεμέλια ουσία)(42).

3.4.Πρωτεύοντας κροσσός στα μεσοθηλιακά κύτταρα

Αν και ο πρωτεύοντας κροσσός έχει χαρακτηριστεί στις περισσότερες επιθηλιακές επιφάνειες και στα διάμεσα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των νεφρικών εγγύς σωληναρίων, των ανθρώπινων ινοβλαστών, των χονδροκυττάρων και του λείου μυός της αρτηρίας, μελέτες έχουν περιγράψει την παρουσία του και σε μεσοθηλιακές επιφάνειες αρκετών ειδών, συμπεριλαμβανομένου του κουνελιού, του αρουραίου, βοός και του ανθρώπου. Στην πλειοψηφία ο πρωτεύοντας κροσσός φαίνεται να προέρχεται από μια κορυφαία και κεντρική θέση σε σχέση με τον πυρήνα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε επίσης σε θέσεις εκτός κέντρου του πυρήνα ή, πιο σπάνια, κατά μήκος των πλευρικών κυτταρικών αφορισμών, γεγονός που σχετίζεται με την κατάσταση διαφοροποίησης τους. Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα α-τουμπουλίνη ο πρωτεύοντας κροσσός των μεσοθηλιακών κυττάρων του περιτοναίου

στον άνθρωπο και το κουνέλι βιάφτηκε ομοιόμορφα με το αντίσωμα και φάνηκε να υιοθετεί έναν τυχαίο προσανατολισμό, κάθετο και παράλληλο σε σχέση με την επιφάνεια του υποστρώματος, με μέγεθος συνήθως πέντε φορές μεγαλύτερο από τις παρακείμενες μικρολάχνες (**Εικόνα 12A**). Ακόμη, παρατηρήθηκαν μεσοθηλιακά κύτταρα με πολλαπλούς κροσσούς, χαρακτηριζόμενα από δύο ή περισσότερες βλεφαρίδες που προεξέχουν από την ίδια ακτινωτή τούφα (**Εικόνα 12B**)(36).



Εικόνα 12. Scanning electron microscopy όπου φαίνεται ο πρωτεύοντας κροσσός σε περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα (A) και η ύπαρξη δύο βλεφαρίδων από το ίδιο σημείο(B)(36).

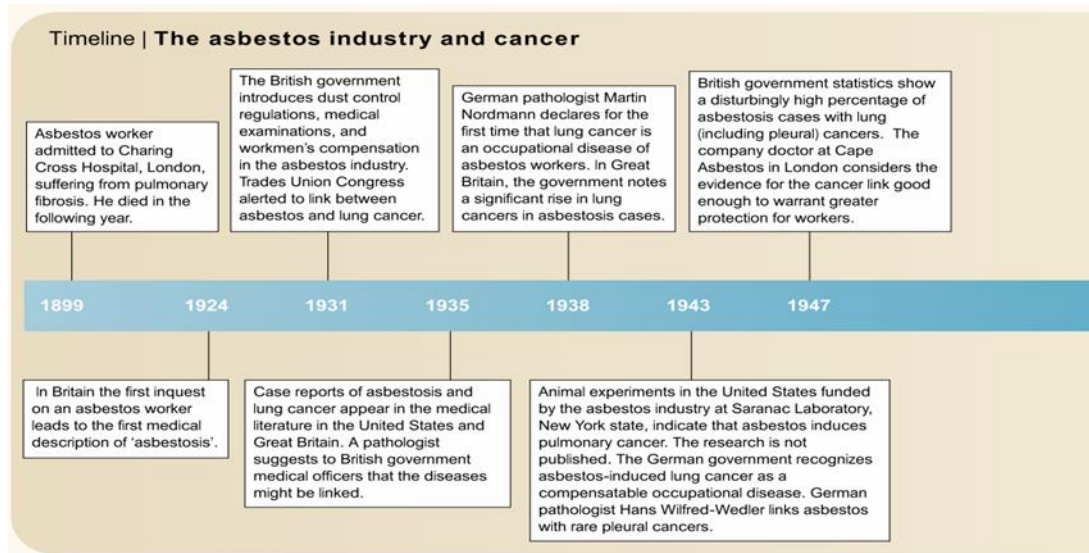
4. Μεσοθηλίωμα

4.1.Επιδημιολογία – Παθογενετικοί παράγοντες

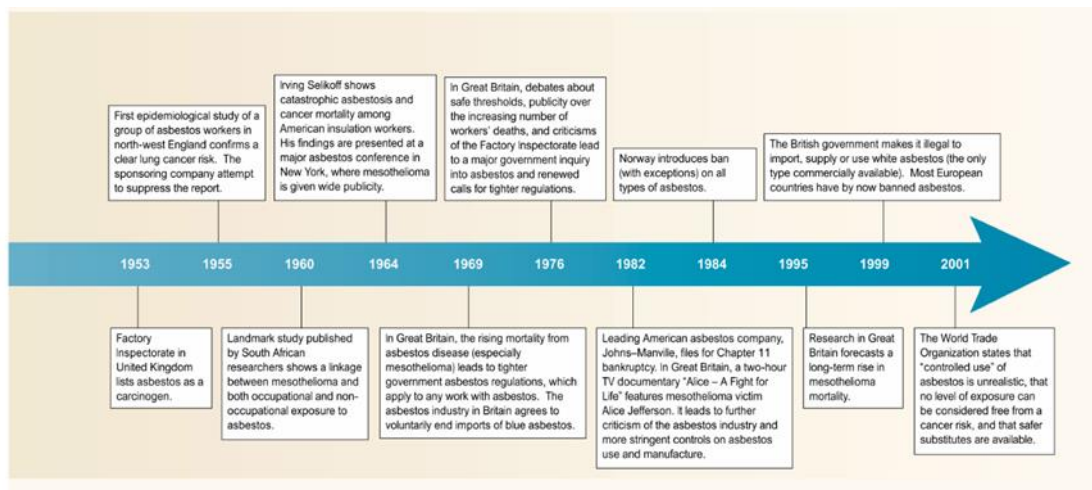
Το κακοήθες μεσοθηλίωμα είναι ένας επιθετικός όγκος των ορογόνων υμένων, όπως ο υπεζωκότας και το περιτόναιο. Αυτός ο όγκος θεωρείται σπάνιος, αλλά η συχνότητά του αυξάνεται παγκοσμίως, πιθανώς ως αποτέλεσμα αύξησης της έκθεσης στον αμίαντο, παράγοντας με τον οποίο σχετίζεται(45).Η ετήσια επίπτωση ποικίλλει από 10 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο άτομα (στις ΗΠΑ) έως 29 περιπτώσεις ανά

εκατομμύριο άτομα (στην Αυστραλία και στο Ηνωμένο Βασίλειο)(46).Στις ΗΠΑ και την Ευρώπη θεωρείται ότι η επίπτωση έχει φτάσει στη μέγιστη δυνατή τιμή, και αναμένεται σε βάθος ετών η μείωση της, λόγω του σημαντικού περιορισμού της χρήσης αμιάντου. Ωστόσο, η εξόρυξη και χρήση του αμιάντου συνεχίζεται σε πολλές χώρες (π.χ. Κίνα, Ινδία, Καζακστάν, Ρωσία). Σύμφωνα με τις προβλέψεις του ΠΟΥ για το 2013 αυτή η συνεχής χρήση είναι πιθανό να οδηγήσει σε επιδημία ασθενειών που σχετίζονται με τον αμιάντο, όπως το κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα, τις επόμενες δεκαετίες(46).

Ο αμιάντος είναι ο κύριος καρκινογόνος παράγοντας που σχετίζεται με το κακόηθες μεσοθηλίωμα. Πράγματι, το κακόηθες μεσοθηλίωμα ήταν σπάνιο πριν από τη διάδοση του αμιάντου. Το 1960 αναφέρθηκαν τα πρώτα αξιόπιστα στοιχεία για σχέση μεταξύ κακοήθους μεσοθηλιώματος και της επαγγελματικής και τυχαίας έκθεσης στον αμιάντο, βάσει δεδομένων από τη Νότια Αφρική(47). Στις **Εικόνες 13 & 14** φαίνεται η ιστορική αναδρομή, για το πως φτάσαμε στην απόδειξη ότι ο αμιάντος οδηγεί σε μεσοθηλίωμα.



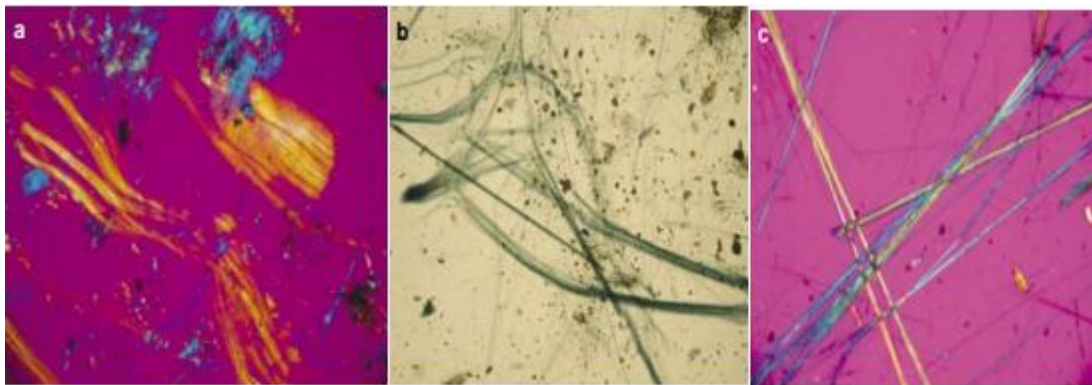
Εικόνα 13. Ιστορική αναδρομή. Τα γεγονότα που συνέβαλαν στο συμπέρασμα πως ο αμιάντος είναι υπεύθυνος για την πρόκληση μεσοθηλιώματος(47).



Εικόνα 14. Ιστορική αναδρομή. Τα γεγονότα που συνέβαλαν στο συμπέρασμα πως ο αμιάντος είναι υπεύθυνος για την πρόκληση μεσοθηλιώματος(47).

Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές αμιάντου: μακριές, λεπτές ίνες γνωστές ως Αμοσίτης (καφέ αμιάντος), ο μπλε αμιάντος ή κροκιδολίτης (crocidolite) και οι φτερωτές ίνες γνωστές ως χρυσότιλος (chrysotile) ή λευκός αμιάντος. Ο καφέ και ο μπλέ αμιάντος ανήκουν σε μία κατηγορία αμιάντου που ονομάζεται αμφίβολοι. Το αν μόνο οι

αμφίβολοι προκαλούν κακοήθες μεσοθηλίωμα ή αν και ο λευκός αμίαντος μπορεί επίσης να προκαλέσει μεσοθηλίωμα δεν είναι γνωστό. Ωστόσο, κάποτε θεωρούνταν πως για να προκαλέσει κακοήθες μεσοθηλίωμα ο λευκός αμίαντος πρέπει να συνυπάρχει με αμφίβολο τρεμολίτη(48). Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υπέδειξαν ότι, ο χρυσότιλος αμίαντος μπορεί να προκαλέσει κακοήθες μεσοθηλίωμα, αν και σε μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με την ομάδα των αμφιβόλων. Τα κακοήθη μεσοθηλιώματα εμφανίζονται αρχικά στην τοιχωματική επιφάνεια του υπεζωκότα και όχι στην σπλαχνική επιφάνεια. Αρκετοί μηχανισμοί μπορεί να εξηγούν αυτό το εύρημα. Μια πιθανότητα είναι ότι οι ίνες αμιάντου βγαίνουν από την επιφάνεια του πνεύμονα και προκαλούν επαναλαμβανόμενους κύκλους βλάβης, φλεγμονής και επιδιόρθωσης στο παρακείμενο στρώμα μεσοθηλιακών κυττάρων(45) .



Εικόνα 14. Οι τρεις μορφές αμιάντου.α) Χρυσότιλος (λευκός αμίαντος),b)Κροκιδολίτης (μπλε αμίαντος), c) Αμοσίτης (καφέ αμίαντος)(47)

Ο ιός Simian Virus 40 (SV40), ένας DNA ιός, έχει εμπλακεί ως συμπαραγοντας στην πρόκληση κακοήθους μεσοθηλιώματος. Αυτός ο ιός, ο οποίος αναστέλλει τα γονίδια καταστολής της φυματίωσης, είναι ένας ισχυρός ογκογόνος ιός σε κύτταρα

ανθρώπων και τρωκτικών. Αλληλουχίες DNA του SV40 έχουν βρεθεί σε όγκους εγκεφάλου και οστών, λεμφώματα και κακοήθη μεσοθηλιώματα, καθώς και σε άτυπους πολλαπλασιασμούς μεσοθηλίου και επιφανειακές μη επεμβατικές βλάβες του μεσοθηλίου. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι ο SV40 μπορεί να μεταδόθηκε ακούσια στον άνθρωπο μέσω του ενέσιμου εμβολίου πολιομυελίτιδας πριν από 35 έως 50 χρόνια(49). Η υπόθεση συμμετοχής του SV40 στην παθογένεση του κακοήθους μεσοθηλιώματος αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα. Σε σπάνιες περιπτώσεις, το κακοήθες μεσοθηλίωμα προκαλείται από ακτινοβολία ή από έναν μικρό αριθμό άλλων παραγόντων(50).

3.2.Ιστολογία

Μακροσκοπικά το νεόπλασμα αρχίζει υπό μορφή οζιδίων στον υπεζωκότα τα οποία συρρέουν και περιβάλλουν του πνεύμονα επεκτεινόμενα στις μεσολόβιες σχισμές. Το θωρακικό τοίχωμα διηθείται συχνά με επινέμηση των μεσοπλεύριων νεύρων, η οποία προκαλεί έντονο πόνο. Η διήθηση των λεμφαγγείων είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μεταστάσεις στους πυλαίους λεμφαδένες. Απομακρυσμένες μεταστάσεις μπορεί να βρεθούνε μέχρι και στο 30% των ασθενών που αποθνήσκουν από μεσοθηλίωμα και νεκροτομούνται(51).

Η ιστολογική εικόνα ποικίλλει. Το 2015 πραγματοποιήθηκε η κατηγοριοποίηση των όγκων του κακοήθους μεσοθηλιώματος σε επιθηλιοειδές, διφασικό (BMM) και σαρκοματώδες (SMM), με το τελευταίο να έχει την χειρότερη πρόγνωση. Η ταξιμόμηση αυτή ήταν πολύ σημαντική,καθώς έχει υψηλή προγνωστική και

θεραπευτική αξία. Συχνότερα συναντάται ο μικτός όγκος(διαγιγνώσκεται όταν υπάρχει πάνω από 10% τόσο επιθηλιοειδές όσο και σαρκωματοειδές συστατικό εντός του όγκου) ο οποίος αποτελείται από επιθηλιοειδές και σαρκωματώδες και η επιβίωση σχετίζεται με την ποσότητα του σαρκοματώδους συστατικού(52).

Διαγνωστικά, είναι συχνά δύσκολη η διάκριση του κακοήθους μεσοθηλιώματος από το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, ένα διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα που προκύπτει όταν το αδενοκαρκίνωμα διηθεί τον υπεζωκότα και απαιτεί χρήση ειδικών ιστολογικών τεχνικών. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα και να μπει η τελική διάγνωση χρησιμοποιείται αρχικά η κυτταρολογική ανάλυση και έπειτα από βιοψία η ιστοπαθολογική μελέτη(51).

Κυτταρολογικά στοιχεία υπέρ κακοήθους μεσοθηλιώματος στο υπεζωκοτικό ή ασκитικό υγρό βρίσκονται στο 33% - 84% των περιπτώσεων. Σε ορισμένους ασθενείς, απαιτείται δειγματοληψία με αναρρόφηση με λεπτή βελόνα (FNA) του όγκου για τη διάγνωση κακοήθους μεσοθηλιώματος, ιδιαίτερα όταν δεν υπάρχει συλλογή. Μια ομάδα ανοσοϊστοχημικών δεικτών είναι σημαντική στη διαφορική διάγνωση του κακοήθους μεσοθηλιώματος. Ως πρώτο βήμα, ένας δείκτης όπως η καλρετινίνη ή η πρωτεΐνη του όγκου Wilms (WT1) χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί εάν ο ιστός είναι μεσοθηλιακός. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει δείκτες όπως το επιθηλιακό αντιγόνο της μεμβράνης (EMA; επίσης γνωστό ως CA15-3 και βλεννίνη 1) που προσδιορίζουν εάν ο ιστός είναι κακοήθης. Η χρώση για EMA σε παχιά περιφερική κατανομή υποδηλώνει έντονα κακοήθες μεσοθηλίωμα. Από τα δύο αντισώματα αντι-EMA, το E29 έχει σημαντικά μεγαλύτερη εξειδίκευση από το MC-5. 59.H

κυτταρολογική ανάλυση είναι αρκετή για να κάνει μια διάγνωση με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης σε περίπου 80% των περιπτώσεων κακοήθους μεσοθηλιώματος(45).

Σε συνθήκες έλλειψης υπεζωκοτικού ή ασκίτικού υγρού καθώς και ασάφειας των κυτταρολογικών ευρημάτων μπορεί να απαιτείται βιοψία του όγκου. Η κλειστή βιοψία είναι λιγότερο πιθανό από την άμεση θωρακοσκοπική βιοψία να δώσει θετικά αποτελέσματα. Η ανοσοϊστοχημική χρώση είναι απαραίτητη στη διαγνωστική διαδικασία. Η χρώση με κυτοκερατίνη βοηθά στην επιβεβαίωση της εισβολής και στη διάκριση του κακοήθους μεσοθηλιώματος από το σάρκωμα και το μελάνωμα. Το κακόηθες μεσοθηλίωμα διακρίνεται από το αδενοκαρκίνωμα με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Το κακόηθες μεσοθηλίωμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία χρώσης για EMA, calretinin, WT1, κυτοκερατίνη 5/6, HBME-1 (αντίσωμα κατά των μεσοθηλιακών κυττάρων) ή μεσοθηλίνης (ποσοστό μεγαλύτερο από το 85% των επιθηλιοειδών κακοηθών μεσοθηλιωμάτων είναι θετικά για μεσοθηλίνη) και την απουσία χρώσης για αντιγόνα όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο, ο παράγοντας μεταγραφής θυρεοειδούς-1, οι γλυκοπρωτεΐνες όγκου B72.3, MOC-31 και Ber-EP4 και η επιθηλιακή γλυκοπρωτεΐνη BG8. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι μια χρήσιμη πρόσθετη μέθοδος με την οποία διακρίνεται το κακόηθες μεσοθηλίωμα από το αδενοκαρκίνωμα καθώς και το επιθηλιοειδές ή το σαρκωματώδες μεσοθηλίωμα από την ινώδη πλευρίτιδα. Το μεσοθηλίωμα *in situ* (άτυπος μεσοθηλιακός πολλαπλασιασμός) είναι η πρώιμη βλάβη, που παρομοιάζει με τραυματικές δυσπλαστικές βλάβες(45).

4.3.Κυτταρικές λειτουργίες σημαντικές στην εξάπλωση του όγκου στις κοιλότητες

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα κανονικά διευκολύνουν την ελεύθερη κίνηση των υπεζωκοτικών επιφανειών κατά τη διάρκεια της αναπνοής με τη βοήθεια των λιπαντικών γλυκοπρωτεϊνών. Αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εύκολα ως απόκριση σε τραυματισμούς και αυξητικούς παράγοντες. Ο αμίαντος που είναι η κύρια αιτία του μεσοθηλιώματος πιθανώς προκαλεί μεταλλάξεις σε πολλά από τα 2 δισεκατομμύρια μεσοθηλιακά κύτταρα σε ενήλικες ανθρώπους(45).

Υπάρχουν τέσσερις κύριες διαδικασίες με τις οποίες ο αμίαντος επηρεάζει τον υπεζωκότα:

1. Οι ίνες αμιάντου μπορεί να ερεθίσουν τον υπεζωκότα. Το σχήμα των ινών αμιάντου, ιδιαίτερα η αναλογία του μήκους προς το πλάτος τους, καθορίζει πόσο βαθιά στον πνεύμονα διεισδύουν και την πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου. Οι ίνες που διεισδύουν στον πνεύμονα μπορεί να εισέλθουν ή να ερεθίσουν τον υπεζωκότα και να προκαλέσουν ασθένεια που εκδηλώνεται με ουλές (πλάκες) ή μια νεοπλασματική διεργασία (κακήθες μεσοθηλίωμα)(53).

2. Οι ίνες αμιάντου μπορεί να τρυπήσουν τον μιτωτικό άξονα των κυττάρων και έτσι να διαταράξουν τη μίτωση, με αποτέλεσμα την ανευπλοείδια και άλλες μορφές χρωμοσωμικής βλάβης(53).

3. Ο αμίαντος προκαλεί την έκλυση ελεύθερων ριζών οξυγόνου που σχετίζονται με το σίδηρο και προκαλούν βλάβη στο DNA(54).

4. Ο αμίαντος επάγει την φωσφορυλίωση πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από τη μίτωση (MAP) και κινασών εξωκυτταρικής ρύθμισης σήματος (ERK) 1 και 2. Η

φωσφορυλίωση αυτών των κινασών αυξάνει την έκκριση πρώτο-ογκογονιδίων πρώιμης απόκρισης που κωδικοποιούν μέλη των πρωτεϊνών της οικογένειας Fos – Jun και της πρωτεΐνης 1(55).

4.4.Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση του κακώθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα είναι πολύπλοκη και τα αποτελέσματα μπορεί να είναι απογοητευτικά. Συχνά τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στη θεραπεία χημειοθεραπείας και οι ασθενείς συνήθως διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου εξαιτίας όψιμων και μη ειδικών συμπτωμάτων. Μέχρι σήμερα, δύο κύριες θεραπευτικές στρατηγικές πρώτης γραμμής σε αυτόν τον καρκίνο χρησιμοποιούνται επιπλέον της καλύτερης υποστηρικτικής φροντίδας: χειρουργική επέμβαση με θεραπευτικό σκοπό ή παρηγορητική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία(46).

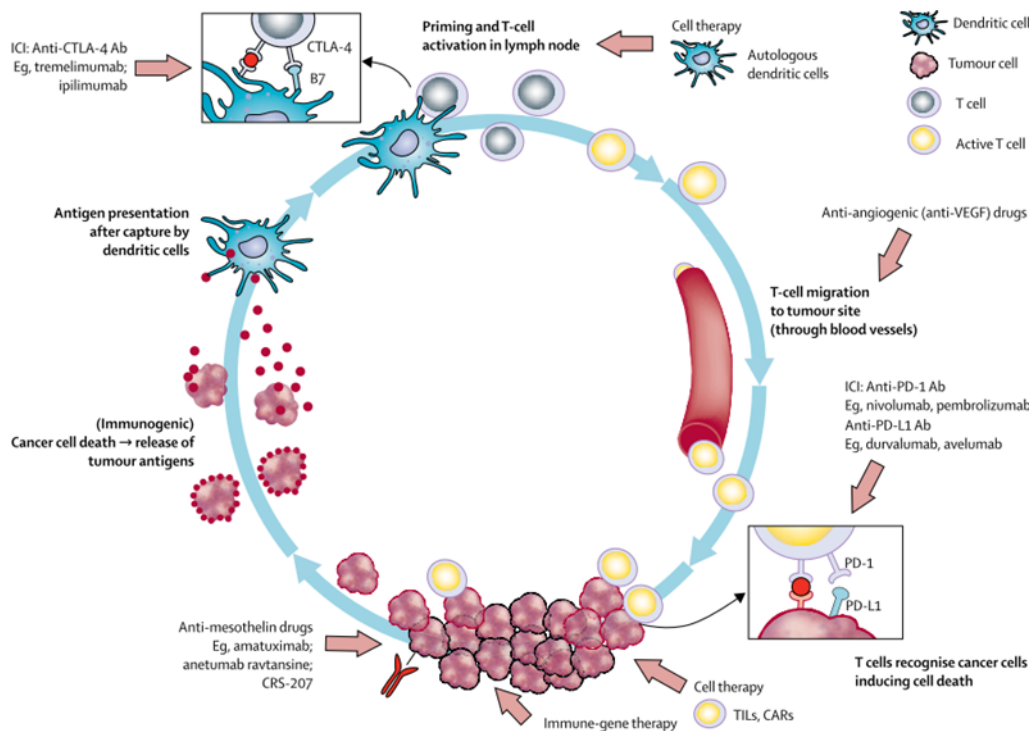
Δυστυχώς, λίγοι ασθενείς είναι υποψήφιοι για χειρουργική επέμβαση. Οι ασθενείς επιλέγονται με βάση την εντόπιση του καρκίνου, το στάδιο του όγκου, την ιστολογία (συνήθως χειρουργείται μόνο ο επιθηλιοειδής υπότυπος), καθώς και το performance status του ασθενή. Επιπλέον, οι περισσότερες διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές για τη διαχείριση ασθενών με κακώθους μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα συνιστούν ότι η χειρουργική επέμβαση (είτε εξωπλευρική πνευμονεκτομή , είτε πλευρεκτομή ή αποκόλληση), πρέπει να αποτελεί μέρος ενός πολλαπλού θεραπευτικού σχήματος (δηλαδή, χειρουργική επέμβαση σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή και τα δύο) και θα πρέπει να γίνεται μόνο σε εξαιρετικά εξειδικευμένα κέντρα με

ομάδες ειδικών ή στα πλαίσια κλινικής δοκιμής. Χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής που συνδυάζει πεμετρεξίδη και σισπλατίνη ή πεμετρεξίδη και καρβοπλατίνη αποτελεί το διεθνές θεραπευτικό πρωτόκολλο τα τελευταία 15 χρόνια. Η Ραλιτρεξίδη έχει αναφερθεί ως μια εναλλακτική λύση στην πεμετρεξίδη, σε συνδυασμό με σισπλατίνη, ως χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής σε κακοήθη μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα(46).

Η μέση επιβίωση έπειτα από θεραπεία με πεμετρεξίδη και πλατίνη δεν υπερβαίνει τους 13-16 μήνες, με τη καλύτερη πρόγνωση να παρατηρείται σε ασθενείς με επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα. Η χρήση ακτινοθεραπείας είναι σπάνια στη θεραπεία ασθενών με κακοήθη μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα και γενικά συνίσταται για ανακούφιση από τον πόνο που προκαλείται από τη διήθηση του θωρακικού τοιχώματος. Η νεοεπικουρική ακτινοθεραπεία του θωρακικού τοιχώματος μετά από χειρουργική επέμβαση για την πρόληψη της σπλαχνικής διασποράς του όγκου θεωρείται αμφιλεγόμενη διαδικασία(56).

Δεδομένης της φτωχής πρόγνωσης που προσφέρουν οι μέχρι σήμερα συνήθεις θεραπευτικές επιλογές νέα φάρμακα που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια δοκιμάζονται. Πολλές μελέτες δοκίμασαν αντι-αγγειογεννητικούς παράγοντες όπως το Bevacizumab [μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του Vascular endothelial growth factor (VEGF)] με μόνο μια να αποδεικνύει αύξηση της μέσης επιβίωσης κατά 2 μήνες με τη πρόσθεση στη γνωστή θεραπεία του Bevacizumab (46)(56). Άλλοι μοριακοί στόχοι όπως οι histone deacetylases (HDAC), Focal adhesion kinase (FAK) και arginosuccinate synthetase-1 (ASS-1) δοκιμάστηκαν χωρίς εμφανή υπεροχή της χρήσης τους για την αύξηση της μέσης επιβίωσης. Τέλος πάρα πολλές

μελέτες διεξάγονται για να δοκιμαστούν διάφορα ανοσοθεραπευτικά φάρμακα κατά του κακοήθους μεσοθηλώματος. Ανοσολογικοί στόχοι σκευασμάτων μονοκλωνικών αντισωμάτων αποτελούν τα παρακάτω: programmed cell death ligand-1 (PD-L1), cytotoxic T lymphocyte-associated protein (CTLA-4), μεσοθηλίνη, Wilms tumor-1 protein (WT-1), με ενθαρρυντικά αποτελέσματα από μελέτες που τα δοκίμασαν στο κακοήθες μεσοθηλίωμα (Εικόνα 15)(46).Επειδή όμως δεν υπάρχει καμία τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη που να συμπεριλαμβάνει κάποιον από αυτούς τους παράγοντες δεν έχουν περάσει ακόμα στη καθ' ημέρα κλινική πράξη.



Εικόνα 15. Αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση και οι πιθανοί στόχοι των κύριων ανοσοθεραπειών στο κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα(46).

4.5.Πρωτεύοντα κροσσός στο μεσοθηλίωμα

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι, η υψηλή γονιδιακή έκφραση του BBS1, το οποίο είναι βασικό μοριακό συστατικό του πρωτεύοντα κροσσού, αποτελεί προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης σε ασθενείς με κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα (MPM)(57). Ακόμη, σε μελέτες μεταγραφομικής ανάλυσης των συστατικών που σχετίζονται με τον πρωτεύοντα κροσσό βρέθηκε πως υψηλή έκφραση των BBS2 και BBS12 ευνοεί την επιβίωση σε ασθενείς με μεσοθηλίωμα(58). Η συσχέτιση ενός ή περισσότερων συστατικών του BBSome με την επιβίωση των ασθενών με MPM αναδεικνύει τη δυνητική σημασία του πρωτεύοντα τα κροσσού στην υπεζωκοτική κακοήθεια και υποδηλώνει τον σημαντικό ρόλο του και σε άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις των μεσοθηλιακών κυττάρων (π.χ. φλεγμονή)(57)(58)

Ειδικό μέρος

5.Στόχος πτυχιακής εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί πως επηρεάζονται σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα όταν αυτά εκτίθενται σε ουσίες (φάρμακα) που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δομή του πρωτεύοντα κροσσού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εργαστηριακές κυτταρικές σειρές μεσοθηλιακών καλοήθων και κακοήθων κυττάρων, καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα που απομονώθηκαν από ασθενείς με παραπνευμονικές (PPEs) ή κακακοήθεις (MPEs) υπεζωκοτικές συλλογές.

Οι κυτταρικές λειτουργίες που μελετήθηκαν είναι η κυτταρική βιωσιμότητα και η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων (με τη μέθοδο επούλωσης πληγών) σε δισδιάστατους (2D) φαινοτύπους, καθώς και ο τρισδιάστατος (3D) κυτταρικός πολλαπλασιασμός (με το σχηματισμό σφαιροειδών) και η επαγωγή συσταλτού φαινοτύπου (μέσω της δοκιμασίας συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα). Τα φάρμακα που επιδρούν στην μοριακή σύνθεση του πρωτεύοντα κροσσού των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα είναι η ένυδρη χλωράλη (chloral hydrate), το θειικό αμμώνιο (ammonium sulphate) και το χλωριούχο λίθιο (lithium chloride). Έχει αποδειχθεί πως η ένυδρη χλωράλη και το θειικό αμμώνιο προκαλούν αποδιάταξη (αυτοτομή) του πρωτεύοντα κροσσού, ενώ το χλωριούχο λίθιο προκαλεί επιμήκυνση.

6.Υλικό και μέθοδος

6.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Μια σειρά καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα, τα MeT5A κύτταρα και 3 κυτταρικές σειρές κακοήθους μεσοθηλιώματος: τα M14K (επιθηλιοειδές), τα MSTO (διφασικό) και τα ZL34 (σαρκωματοειδές) κύτταρα.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (#R5886, Sigma) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS) (#F0804-500, Sigma), αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (#P4333, Sigma), L-Glutamine (#G7513, Sigma) και Plasmocin (Ant-MPP, InvivoGen). Κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας, η αλλαγή του κυτταρικού μέσου γινόταν κάθε 2-3 ημέρες μετά από μια ήπια πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline). Για σκοπούς κυτταρικού συγχρονισμού τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αποστέρηση ορού για 24 ώρες με 0,5% FBS-RPMI.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων των 2D φαινοτύπων, στις πλάκες που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν έγινε επίστρωση ινωδονεκτίνης πλάσματος (plasma fibronectin, FN) για 30 λεπτά. Η παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος απαιτούσε τη διάλυση 1 mg FN βοοειδούς προέλευσης σε 20 mL dH₂O σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL. Έπειτα, το διάλυμα διηθήθηκε προς αποστείρωση με φίλτρο μεγέθους πόρων 0.22 µm και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους 4°C.

6.2 Επώαση των κυττάρων με φάρμακα

Κατά τον συγχρονισμό, 24 ώρες πριν την έναρξη των πειραματικών διεργασιών, τα κύτταρα υποβλήθηκαν επιπλέον και σε θεραπεία με φάρμακα που ρυθμίζουν τον πρωτεύοντα κροσσό. Πιο συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν σε 0,5% FBS-RPMI που περιήχε:

- Ένυδρη χλωράλη → σε συγκέντρωση 50 mM
- Θεικό αμμώνιο → σε συγκέντρωση 30 mM
- Χλωριούχο λίθιο → σε συγκέντρωση 50 mM

6.3. Δοκιμή βιωσιμότητας κυττάρων σε 2D καλλιέργειες (Cell viability assay)

Οι αναλύσεις βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένες πλάκες 96 βοθρίων (#655 180, Griener Bio-one). Σε κάθε βοθρίο προστέθηκαν 50 μl διαλύματος FN για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε βοθρίο 200 μl ελαιώδη συγχρονισμένων κυττάρων (σε συγκέντρωση 5×10^4 κύτταρα/ml) στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (0,5% FBS-RPMI ή 10% FBS-RPMI ή 10% FBS-RPMI εμπλουτισμένο με ένυδρη χλωράλη, θεικό αμμώνιο ή χλωριούχο λίθιο) και καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε, έγινε πλύση με PBS, και ακολούθησε σταθεροποίηση των κυττάρων με 50 μl 4% παραφορμαλδεΐδη (PFA) για 10 λεπτά. Ο παράγοντας σταθεροποίησης αντικαταστάθηκε στη συνέχεια με 50 μl 0.5% χρωστικής crystal violet για 10 λεπτά. Ολόκληρη η πλάκα βυθίστηκε επανειλημμένα σε πλαστικό δοχείο στο οποίο

προστιθόταν συνεχώς νερό βρύσης για την απομάκρυνση της μη δεσμευμένης χρωστικής. Η πλάκα στέγνωσε σε ανεστραμμένη θέση χωρίς το καπάκι, κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η δεσμευμένη crystal violet απελευθερώθηκε με την προσθήκη 100 μl 10% οξικού οξέος και μετρήθηκε το O.D. στα 570 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα.

6.4. Δοκιμή κυτταρικής μετανάστευσης σε 2D καλλιέργειες (Cell migration assay)

Εναιώρημα κυττάρων σε 10% FBS-RPMI τοποθετήθηκε και καλλιεργήθηκε σε πλάκα 48-βοθρίων επικαλυμμένη με FN έως το σχηματισμό μονοστιβάδας ακολουθούμενη από αποστέρηση ορού για 24 ώρες. Το μέσο σε κάθε πηγαδάκι αναρροφήθηκε και στη συνέχεια η μονοστιβάδα των κυττάρων χαραχθηκε σε ευθεία γραμμή με αποστειρωμένο 10 μl ρύγχος πιπέτας χρησιμοποιώντας ως οδηγό ένα χάρακα. Τα αποκολλημένα κύτταρα απομακρύνθηκαν με ήπια πλύση με RPMI και στη συνέχεια προστέθηκε το κατάλληλο θρεπτικό μέσο (0,5% FBS-RPMI ή 10% FBS-RPMI ή 10% FBS-RPMI εμπλουτισμένο με ένυδρη χλωράλη, θειικό αμμώνιο ή χλωριούχο λίθιο). Κάθε πηγαδάκι απεικονίστηκε με 100X και στη συνέχεια η πλάκα επώαστηκε για 4 ή 8 ώρες στους 37°C σε επωαστήρα με 5% CO₂. Στη συνέχεια έγινε αναρρόφηση των μέσων και σταθεροποίηση με 4% PFA για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Κάθε πηγαδάκι απεικονίστηκε σε προκαθορισμένη θέση σύμφωνα με τη σήμανση στον εξωτερικό μέρος το πυθμένα της πλάκας. Οι εικόνες αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού ImageJ και η μετανάστευση του τραύματος υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Δείκτης μετανάστευσης (MI)} = (\text{περιοχή } t_{0,8} - \text{περιοχή } t_0) / \text{περιοχή } t_0$$

6.5. Δοκιμή σχηματισμού σφαιροειδών σε 3D καλλιέργειες (Spheroid formation assay)

Τα σφαιροειδή δημιουργούνται με τη μέθοδο της εκκερεμούς σταγόνας. Συγχρονισμένα κύτταρα 2×10^3 κύτταρα/ml αναδεύθηκαν με vortex μαζί με 250 ng/mL FN. Σε ορισμένα εναιωρήματα προστέθηκαν ένυδρη χλωράλη, θειικό αμμώνιο ή χλωριούχο λίθιο. Τα κύτταρα εντοπίστηκαν στην οροφή του καπακιού του αποστειρωμένου τρυβλίου Petri με όγκο 25 μ l. Στον πυθμένα του τρυβλίου Petri τοποθετήθηκαν 2 mL αποστειρωμένου PBS. Τα καπάκια με τις καλλιέργειες αναποδογυρίστηκαν απαλά ώστε να σχηματιστούν κρεμαστές σταγόνες και τα τρυβλία Petri έκλεισαν με το κάτω μέρος του τρυβλίου και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα CO₂ για 48 ώρες. Για την αξιολόγηση του σχηματισμού σφαιροειδών η πλάκα άνοιξε και το καπάκι ανατράπηκε και παρέμεινε ανοιχτό και ακίνητο για 5-10 λεπτά. Στη συνέχεια απεικονίστηκε σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο καλλιέργειας ιστών με διασύνδεση κάμερας. Από κάθε εικόνα του σφαιροειδούς, μετρήθηκε η περίμετρος με τη χρήση του πολυγώνου το οποίο είναι ένα εργαλείο που διαθέτει το ImageJ. Για την κανονικοποίηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η περίμετρος των σφαιροειδών που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο (control). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα.

6.6. Δοκιμή συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα σε 3D καλλιέργειες (Collagen gel contraction assay)

Πρόκειται για μια λειτουργική δοκιμασία *in vitro* που αντανακλά την επαγωγή της MMM, δηλαδή της μεσοθηλιακής-προς-μεσεγχυματική μετάβασης (mesothelial-to-mesenchymal transition, MMT) των κυττάρων. Για την εκτέλεση των πειραμάτων

χρησιμοποιήθηκαν συγχρονισμένα κύτταρα και όλα τα αντιδραστήρια διατηρήθηκαν σε πάγο. Κολλαγόνο ουράς αρουραίου τύπου I που ανασυστάθηκε με 0,1M οξικό οξύ αναμείχθηκε με το κατάλληλο μέσο (10% FBS-RPMI ή 10% FBS-RPMI εμπλουτισμένο με ένυδρη χλωράλη, θειικό αμμώνιο ή χλωριούχο λίθιο) που περιέχει 10⁶ κύτταρα/ml και έγινε καλή ανάδευση με vortex. Η αναλογία κολλαγόνου : κατάλληλου θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 κολλαγόνο προς 2 θρεπτικό μέσο. Τα 600 μl του ολικού μείγματος που προέκυψαν διανεμήθηκε ανά βοθρίο σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 βοθρίων και οι γέλες αφέθηκαν να πολυμεριστούν στον επωαστήρα για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν επιπλέον 600 μl του αντίστοιχου θρεπτικού μέσου σε κάθε βοθρίο και η πλάκα μεταφέρθηκε σε επωαστήρα CO₂ για καλλιέργεια για 72 ώρες. Στο τέλος των πειραμάτων, η πλάκα σαρώθηκε σε σαρωτή επίπεδης κλίνης Canon Lide. Κάθε βοθρίο που περιείχε την πολυμερισμένη γέλη αξιολογήθηκε στη συνέχεια για μετρήσεις της επιφάνειας με ανάλυση εικόνας με τη χρήση του ImageJ. Για την κανονικοποίηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη control. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα.

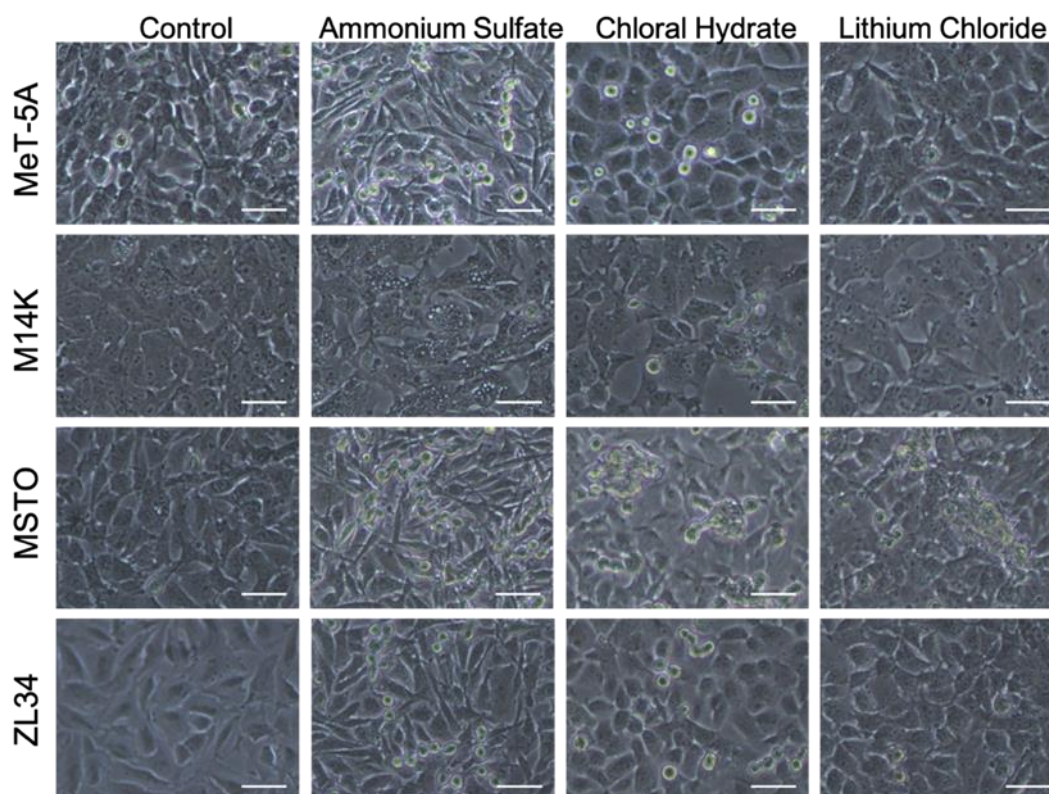
6.7 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism Version 7.00 για Windows. Έγινε έλεγχος κανονικότητας για χαρακτηρισμό των παραμετρικών και μη παραμετρικών τιμών και πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα οι αναλύσεις One-Way ANOVA και Kruskal-Wallis test. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά για $p\text{value} < 0,05$.

7. Αποτελέσματα

7.1 Φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων υπό την επίδραση των φαρμάκων

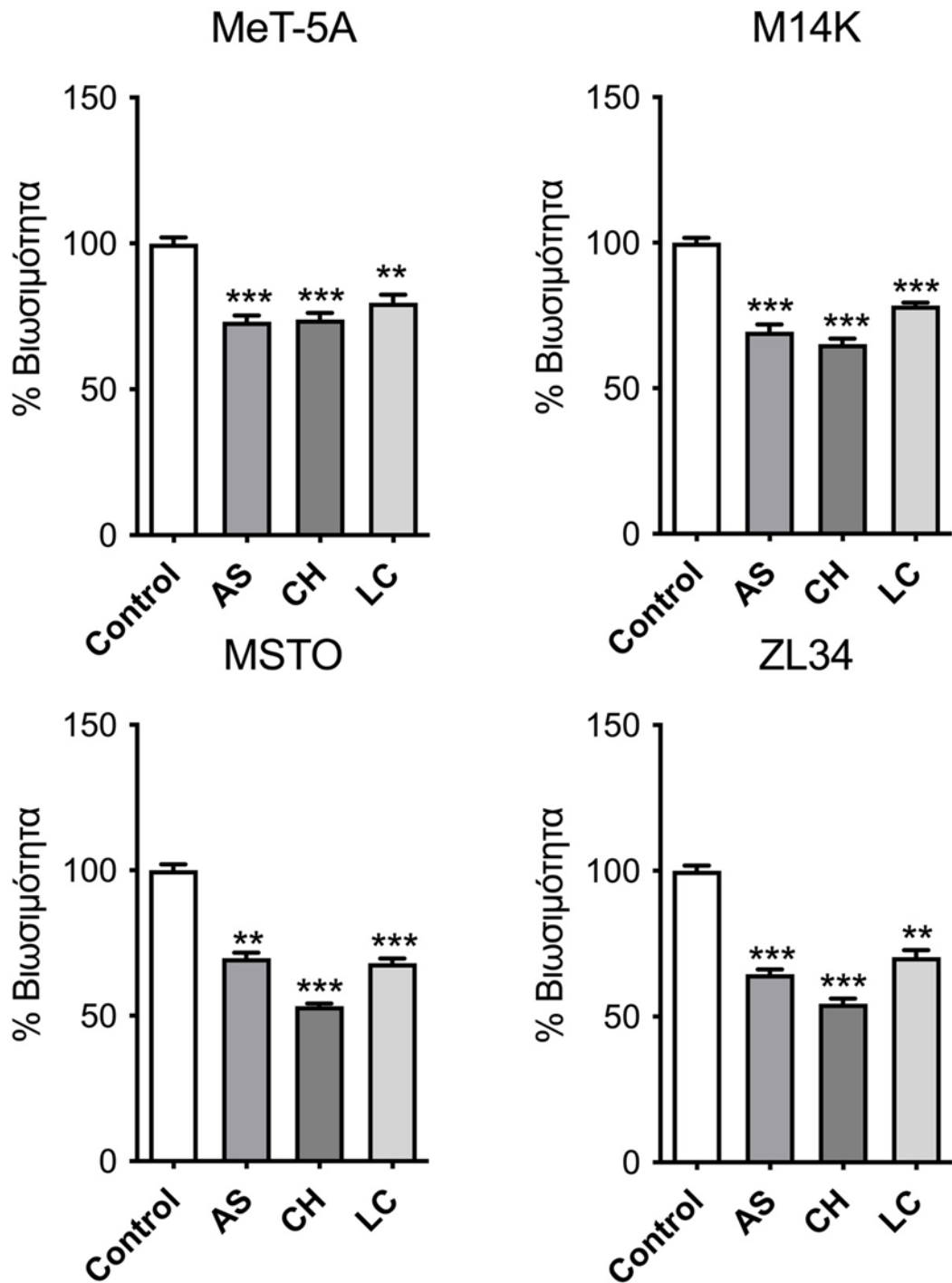
Η επώαση των κυτταρικών σειρών με τα φάρμακα που επηρεάζουν τον πρωτεύοντα κροσσό είχε σαν αποτέλεσμα μεταβολές στην μακροσκοπική εικόνα τους όπως είναι φανερό στο **Σχήμα 1**. Σε καλοήθη κύτταρα MeT-5A μόνο το AS οδήγησε σε εμφανείς αλλαγές στη μακροσκοπική εικόνα των κυττάρων αφού φαίνεται να τα οδηγεί σε ένα φαινότυπο με πιο επιμηκυμένα χαρακτηριστικά. Τα κύτταρα χάνουν την κυβοειδή δομή τους και αποκτούν χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν μεσοθηλιακή-προς-μεσεγγυματική μετάβαση. Στα κακοήθη κύτταρα M14K δεν φάνηκε κάποια αλλαγή στην μακροσκοπική εικόνα τους. Αναφορικά με τις κυτταρικές σειρές κακοήθων κυττάρων MSTO και ZL34 μόνο το AS φάνηκε να προκαλεί μεταβολή στην εικόνα των κυττάρων με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των MeT-5A.



Σχήμα 1. Φαινοτυπικές μεταβολές καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων πριν και μετά την επώαση με ουσίες που τροποποιούν το μήκος του Πρωτεύοντα Κροσσού.

7.2 Μειωμένη βιωσιμότητα καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση φαρμάκων

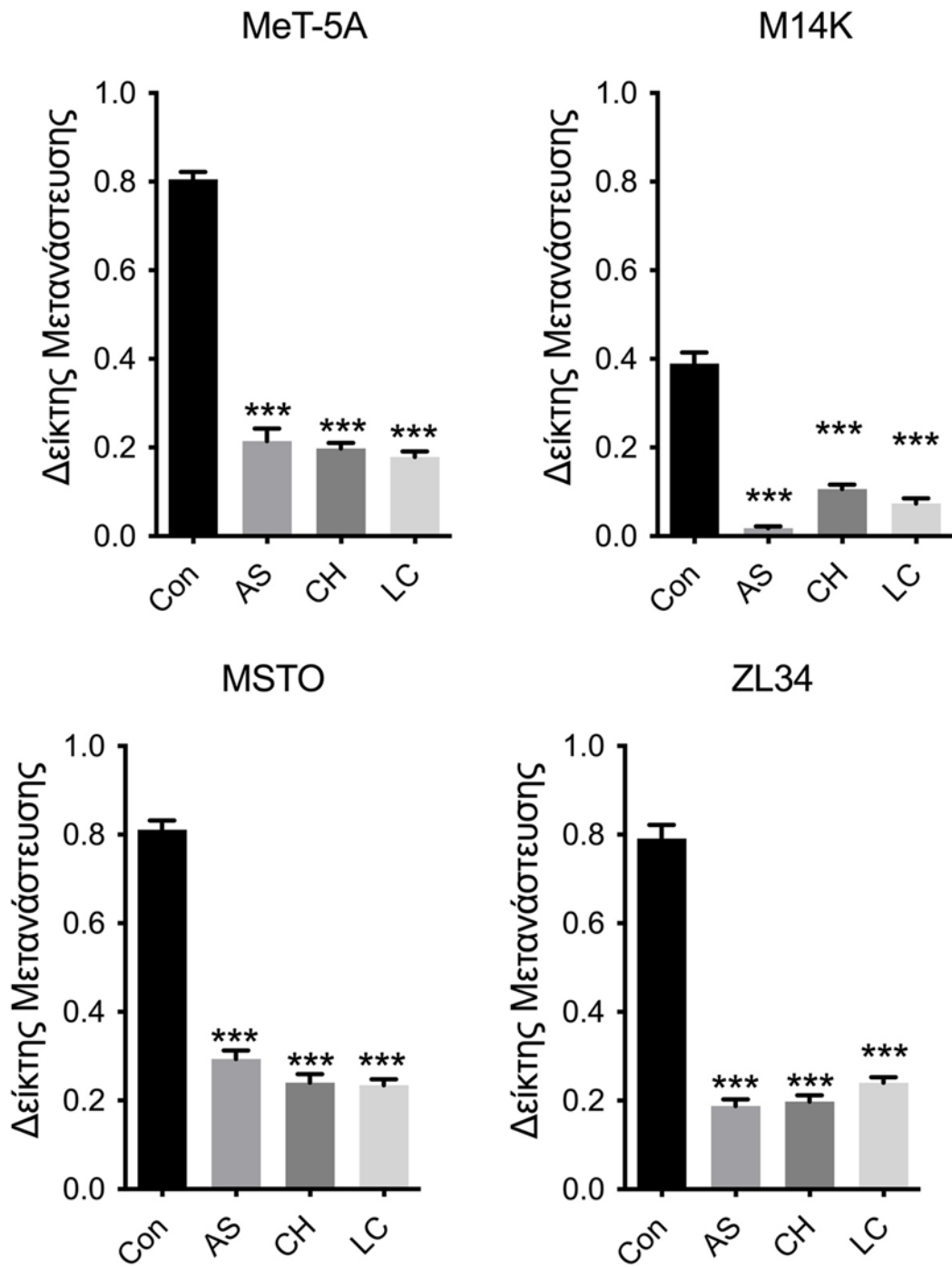
Και τα 3 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη οδήγησαν στη σημαντική μείωση ($p < 0.001$ σε όλες τις περιπτώσεις) της βιωσιμότητας των καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τις κανονικοποιημένες τιμές των πειραμάτων αναφοράς που τέθηκαν στο 100%. Η επώαση με AS οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας (MeT-5A, $73 \pm 2.1\%$; M14K, $69 \pm 2.6\%$; MSTO, $70 \pm 1.9\%$; ZL34, $65 \pm 1.6\%$) και παρόμοια ήταν τα ευρήματα με την επώαση με CH (MeT-5A, $74 \pm 2.1\%$; M14K, $65 \pm 1.9\%$; MSTO, $53 \pm 0.9\%$; ZL34, $55 \pm 1.7\%$). Η επώαση με LC όπου επιμηκύνει τον πρωτεύοντα κροσσό επίσης οδήγησαν σε μείωση της βιωσιμότητας (MeT-5A, $80 \pm 2.7\%$; M14K, $78 \pm 0.9\%$; MSTO, $68 \pm 1.7\%$; ZL34, $70 \pm 2.4\%$). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο **Σχήμα 2**.



Σχήμα 2. Μεταβολές της βιωσιμότητας καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων που επώαστηκαν με ουσίες που τροποποιούν το μήκος του Πρωτεΐοντα Κροσσού. *** $p < 0.001$ σε σχέση με το πείραμα αναφοράς.

7.3 Μειωμένη κινητικότητα καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση φαρμάκων

Και τα 3 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη οδήγησαν στη σημαντική μείωση ($p < 0.001$ σε όλες τις περιπτώσεις) της μεταναστευτικής ικανότητας των καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τις τιμές των πειραμάτων αναφοράς. Η επώαση με AS οδήγησε σε μείωση του δείκτη μετανάστευσης (MeT-5A, $0,21 \pm 0,03$; M14K, $0,02 \pm 0,01$; MSTO, $0,30 \pm 0,02$; ZL34, $0,19 \pm 0,01$) και παρόμοια ήταν τα ευρήματα με την επώαση με CH (MeT-5A, $0,2 \pm 0,01$; M14K, $0,11 \pm 0,01$; MSTO, $0,24 \pm 0,02$; ZL34, $0,2 \pm 0,01$). Η επώαση με LC όπου επιμηκύνει τον πρωτεύοντα κροσσό επίσης οδήγησαν σε μείωση της βιωσιμότητας (MeT-5A, $0,18 \pm 0,01$; M14K, $0,07 \pm 0,01\%$; MSTO, $0,23 \pm 0,01\%$; ZL34, $0,24 \pm 0,01$). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο **Σχήμα 3**.

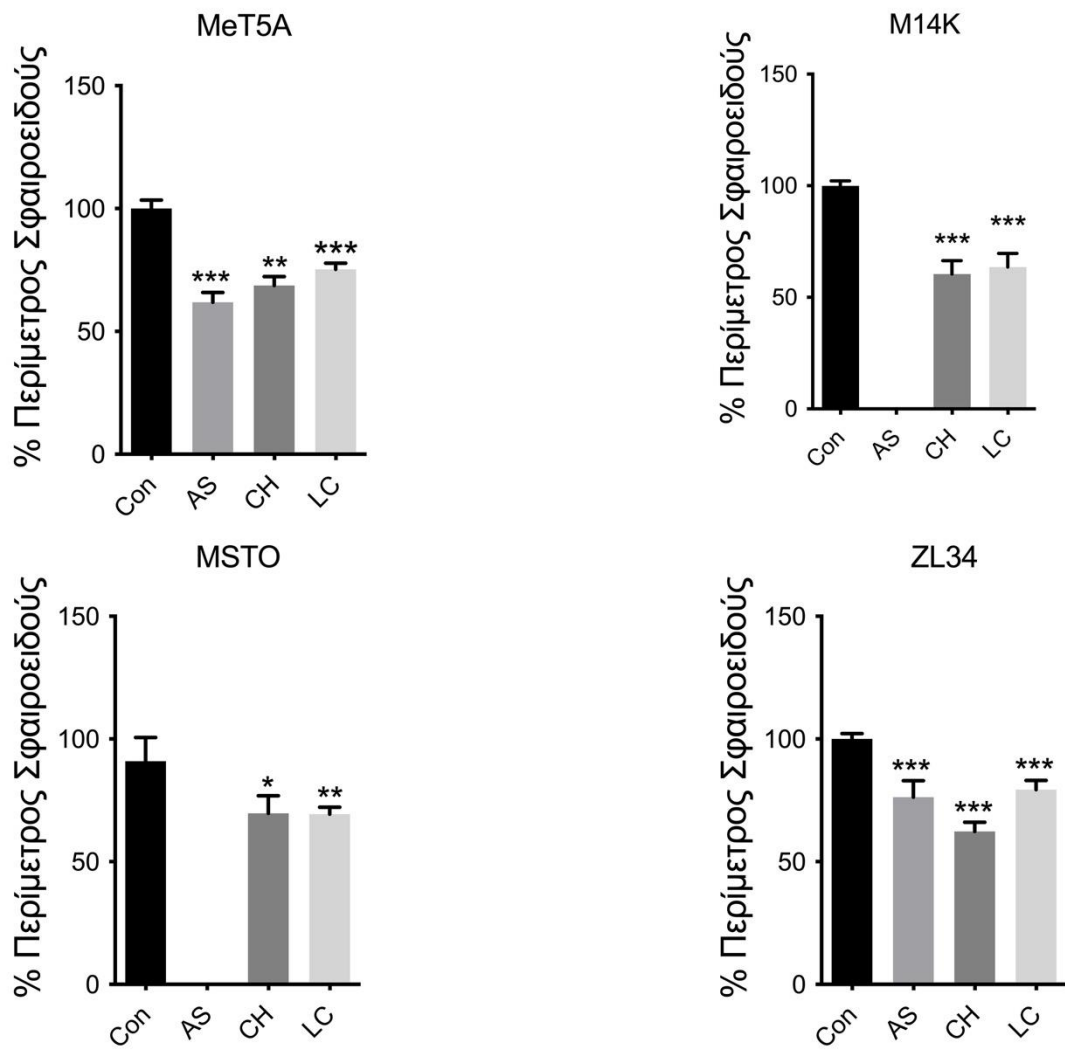


Σχήμα 3. Μεταβολές του Δείκτη Μετανάστευσης καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων που επώαστηκαν με ουσίες που τροποποιούν το μήκος του Πρωτεΐοντα Κροσσού. *** $p < 0.001$ σε σχέση με το πείραμα αναφοράς.

7.4 Ο σχηματισμός 3D σφαιροειδών μειώνεται υπό την επίδραση των φαρμάκων

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα υπό εναιώρημα συσσωματώνονται για να σχηματίσουν πολυκυτταρικές σφαιρικές δομές που αναφέρονται ως σφαιροείδη. Οι μέσες τιμές \pm Τυπικό Σφάλμα της περιμέτρου των σφαιροειδών χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί εάν ο σχηματισμός σφαιροειδών αλλάζει υπό την επίδραση των φαρμάκων. Οι τιμές των ομάδων ελέγχου θεωρήθηκαν 100% για τους σκοπούς των περαιτέρω αναλύσεων.

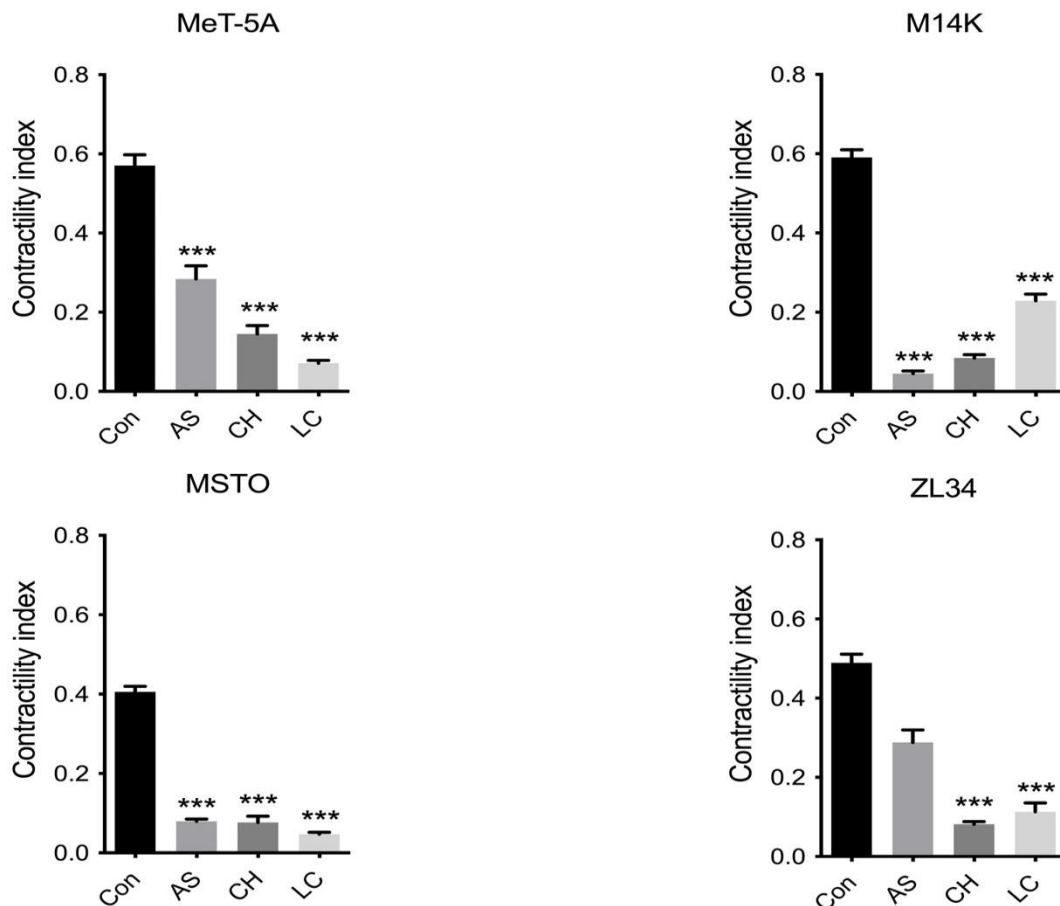
Και τα 3 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη οδήγησαν στη σημαντική μείωση ($p < 0.001$ σε όλες τις περιπτώσεις) της ικανότητας σχηματισμού σφαιροειδών των καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τις τιμές των πειραμάτων αναφοράς. Η επώαση με AS οδήγησε σε σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού σφαιροειδών στα κύτταρα MeT-5A ($61,9 \pm 3,9\%$, $p < 0,001$), οδήγησαν σε αδυναμία σχηματισμού σφαιροειδών στα M14K και στα MSTO, ενώ παρατηρήθηκε μικρότερη περίμετρος και μειωμένη δυνατότητα σχηματισμού στα ZL34 ($75 \pm 2,5\%$, $p < 0,001$). Η επώαση με CH οδήγησε σε σχηματισμό μικρότερων σφαιροειδών (MeT-5A, $68,7 \pm 3,6\%$; M14K, $60,5 \pm 6\%$, ZL34; $62 \pm 3,7\%$ και στα δύο $p < 0.001$, MSTO; $70 \pm 7.1\%$, $p < 0,05$). Η επώαση με LC οδήγησε σε σημαντική μείωση σε όλα τα κύτταρα (MeT-5A $75,3 \pm 3,5\%$; M14K $63,6 \pm 6,1\%$; ZL34 $79,4 \pm 3,7\%$ και στα δύο $p < 0.001$, MSTO; $69.4 \pm 2.8\%$, $p < 0.01$). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο **Σχήμα 4**.



Σχήμα 4. Μεταβολές της περιμέτρου σφαιροειδών καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων που επώαστηκαν με ουσίες που τροποποιούν το μήκος του Πρωτεύοντα Κροσσού. *** $p < 0.001$ σε σχέση με το πείραμα αναφοράς.

7.5 Μείωση της συσταλτότητας γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα

Κύτταρα ενσωματωμένα σε εξουδετερωμένο μίγμα κολλαγόνου-θρεπτικού υλικού με ή χωρίς την προσθήκη φαρμάκων καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες. Και τα 3 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη οδήγησαν στη σημαντική μείωση ($p < 0.001$ σε όλες τις περιπτώσεις) της ικανότητα συσταλτότητας των καλοήθων και κακοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τις τιμές των πειραμάτων αναφοράς. Μόνη εξαίρεση η προσθήκη AS σε κύτταρα ZL34.



Σχήμα 5. Μεταβολές στην συσταλτότητα γέλης κολλαγόνου από καλοήθη και κακοήθη μεσοθηλιακά κύτταρα που επώαστηκαν με ουσίες που τροποποιούν το μήκος του Πρωτεΐοντα Κροσσού. *** $p < 0.001$ σε σχέση με το πείραμα αναφοράς.

8. Συζήτηση

Ο πρωτεύοντας κροσσός είναι ένα αισθητήριο οργανίδιο ο λειτουργικός ρόλος του οποίου για πολλά χρόνια ήταν άγνωστος. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες ερευνητικές ομάδες εστιάζουν στη μελέτη της λειτουργίας του αναδεικνύοντας την ενεργό συμμετοχή του στην κυτταρική σηματοδότηση και απόκριση. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει κενό γνώσης αναφορικά με το ρόλο του πρωτεύοντα κροσσού στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση των φαρμάκων θειικό αμμώνιο (AS), χλωριούχο λίθιο (LC) και ένυδρη χλωράλη (CH) στην καλοήγη σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων (MeT5A) καθώς και σε 3 κακοήθεις κυτταρικές σειρές (M14K, MSTO και ZL34). Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν η κυτταρική βιωσιμότητα, η δυνατότητα μετανάστευσης, ο σχηματισμός σφαιροειδών και η δυνατότητα συστολής γέλης κολλαγόνου, κυτταρικοί φαινότυποι που αντανακλούν σημαντικές λειτουργικές αποκρίσεις των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία πως το θειικό αμμώνιο και η ένυδρη χλωράλη προκαλούν αποδιάταξη του κροσσού, ενώ το χλωριούχο λίθιο προκαλεί επιμήκυνση(59)(60)(58).

Στη παρούσα μελέτη, η χορήγηση AS οδήγησε σε μείωση των δεικτών των υπό διερεύνηση φαινοτύπων σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, η χορήγηση AS σε κύτταρα M14K και MSTO απέτρεψε εξολοκλήρου τον σχηματισμό σφαιροειδών ενώ δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τη συσταλτικότητα γέλης κολλαγόνου κατά την ενσωμάτωση των ZL34. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με εκείνα άλλων πειραματικών μελετών που διεξήχθησαν στα πλαίσια διερεύνησης τοξικότητας των υπό δοκιμή φαρμάκων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η διατμητική τάση κατά την

ενεργό μεταφορά του ASP1 από κύτταρα νεφρού Madin-Darby Canine Kidney(MDCK) με τη μεσολάβηση των OCT2 και MATE1 και η επίδραση της αφαίρεσης του πρωτεΐοντα κροσσού στη λειτουργία των μεταφορέων με την προσθήκη AS. Παρατηρήθηκε αποδιάταξη του πρωτεΐοντα κροσσού που είχε ισχυρότερη επίδραση στην ενεργό μεταφορά του ASP1 κατά την έκθεση των MDCK σε υψηλή διατμητική τάση συγκριτικά με την έκθεση σε χαμηλότερη τάση, ενώ παρατηρήθηκε επίδραση και στην λειτουργία των μεταφορέων(61). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι, ότι ο πρωτεΐοντας κροσσός ανταποκρίνεται σε ένα κατώτατο επίπεδο διατμητικής τάσης και σηματοδοτεί αλλαγές στην έκφραση και τη λειτουργία των μεταφορέων προτού εμφανιστούν μετρήσιμες επιδράσεις στη μεταφορά. Προκύπτει επίσης πως είναι απαραίτητος στη ρύθμιση της μεταφοράς οργανικών κατιόντων. Βλάβες στο σχηματισμό και τη λειτουργία του πρωτεΐοντα κροσσού έχουν επιπτώσεις στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία των νεφρών και άλλων οργάνων. Σε αντίστοιχα πειράματα μελέτης της διατμητικής τάσης μέσω αποδιάταξης των κροσσών με AS παρατηρήθηκε η καταστολή της έκφρασης ενός υποσυνόλου γονιδίων, ενώ γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση TGF- β , MAPK και Wnt επηρεάστηκαν ελάχιστα. Τα αποτελέσματα αυτά, στο σύνολο τους ενισχύουν τον ρόλο του πρωτεΐοντα κροσσού ως μηχανοαισθητήριου οργάνου και υποδεικνύουν ότι, η επίδρασή του στα κύτταρα πιθανά σχετίζεται και με άλλους μηχανοαισθητήρες(62). Τα αποτελέσματα μας αναφορικά με την συσταλτικότητα γέλης κολλαγόνου στην κυτταρική σειρά ZL34 σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές και φάρμακα,ενδεχομένως να αντανakλούν την εμπλοκή και άλλων παραγόντων ή στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του AS ώστε να σημειωθεί μια στατιστικώς σημαντική αλλαγή.

Μειωμένοι ήταν οι δείκτες των υπό μελέτη φαινοτύπων σε όλες τις κυτταρικές σειρές μετά την προσθήκη της ένυδρης χλωράλης (CH). Σε πειραματική μελέτη με κύτταρα MDCK στα οποία προστέθηκε CH ώστε να μελετηθεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} κατά την αύξηση της ροής υγρού παρατηρήθηκε αποδιάταξη του πρωτεύοντα κροσσού και αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων. Η επίδραση του CH φαίνεται ότι, εξασθενεί με το πέρασμα του χρόνου καθώς τα κύτταρα αφήνονται να ανακάμψουν σε κανονικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας για αρκετές ημέρες και οι κροσσοί αναπτύσσονται ξανά ενώ αποκαθίσταται και η απόκριση Ca^{2+} που προκαλείται από τη ροή. Η ένυδρη χλωράλη, πιθανώς μέσω αποσυναρμολόγησης των μικροσωληνίσκων, αποσταθεροποιεί τη σύνδεση μεταξύ του αξονήματος και του βασικού σωματίου. Έχει αποδειχθεί ακόμη πως διαταράσσει τη μιτωτική άτρακτο σε ωκύτταρα ποντικού παρεμβαίνοντας στους μικροσωληνίσκους(63). Σε πειράματα που είχαν ως στόχο να αναδείξουν την σημαντικότητα του πρωτεύοντα κροσσού στον καρκίνο προστέθηκαν παράγοντες του κροσσού σε κύτταρα CFPAC-1 (cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line) και παρατηρήθηκε πως οι περισσότερες ενώσεις εξασθένησαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τουλάχιστον εν μέρει μέσω της επαγωγής του πρωτεύοντα κροσσού. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με την προσθήκη CH που οδήγησε σε απώλεια του κροσσού. Παρόλο που η ανάπτυξη του καρκίνου συνοδεύεται συχνά από απώλεια του πρωτεύοντα κροσσού ο οποίος ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η αποκατάσταση του κροσσού στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποτελέσει μια νέα πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την επιβράδυνση της ανάπτυξης του όγκου(64).

Τέλος, μείωση των δεικτών όλων των φαινοτύπων σημειώθηκε και με την προσθήκη του χλωριούχου λιθίου (LC). Ο τρόπος δράσης του LC σχετίζεται άμεσα με την α-τουμπουλίνη (η οποία είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση του πρωτεύοντα κροσσού) καθώς η προσθήκη LC προωθεί την ακετυλίωση της α-τουμπουλίνης, που έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση του κροσσού. Ο ρόλος του LC έχει μελετηθεί αρκετά σε χονδροκύτταρα βοοειδών στα οποία παρατηρήθηκε επιμήκυνση του αξονήματος και ταυτόχρονη καταστολή της σηματοδότησης Hedgehog, λόγω μείωσης της Arl13b (σημαντικό συστατικό για τη σωστή διαμόρφωση της σηματοδότησης) εντός του αξονήματος. Αυτό δείχνει πως η επιμήκυνση των βλεφαρίδων διαταράσσει τη διακίνηση εντός του αξονήματος, καθώς το μέγεθος, η συχνότητα και η ταχύτητα των σωματιδίων IFT μέσα στον κροσσό επηρεάζονται από το μήκος του κροσσού. Επιπλέον, επηρεάζεται η παράδοση του φορτίου στην άκρη του κροσσού κι έτσι οι μακρύτεροι κροσσοί έχουν μειωμένο επίπεδο εισόδου πρωτεϊνών, το οποίο αναμφίβολα επηρεάζει τη σηματοδότηση που διαμεσολαβείται από τον πρωτεύοντα κροσσό(65). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από in vivo πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν χονδροκύτταρα ανθρώπου και ποντικού. Από τα πειράματα που έλαβαν χώρα προέκυψε πως η επιμήκυνση του κροσσού in vitro είναι ταχεία αλλά όταν χορηγούνται χαμηλές συγκεντρώσεις LC είναι παροδική. Άλλα πειράματα που ανέδειξαν την επιρροή του LC στη δομή του πρωτεύοντα κροσσού ήταν σε οστεοβλάστες από ασθενείς με ιδιοπαθή σκολίωση (IS) στους οποίους βρέθηκαν σπάνιες παραλλαγές σε γονίδια με ρόλο στην κυτταρική μηχανική μεταγωγή. Οι ασθενείς με IS είχαν μακρύτερα και περισσότερα κύτταρα με επιμήκεις κροσσούς. Μέσω πειραμάτων σε knocked down ζωικά μοντέλα βρέθηκε ότι, πως πολλά γονίδια που σχετίζονται με τους κροσσούς σχετίζεται με φαινότυπο

καμπυλότητας της σπονδυλικής στήλης, χαρακτηριστικό το οποίο συναντάται σε πολλές κροσσοπάθειες(66).

Τα ευρήματά μας αναδεικνύουν τον λειτουργικό ρόλο του πρωτεύοντος κροσσού στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα δεδομένου ότι, τα φάρμακα θειικό αμμώνιο, χλωριούχο λίθιο και ένυδρη χλωράλη που τροποποιούν το μήκος του πρωτεύοντος κροσσού είχαν επίδραση σε όλους τους λειτουργικούς φαινότυπους μεσοθηλιακών κυττάρων που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματά μας αποτελούν τη βάση για περαιτέρω διερεύνηση της λειτουργίας των κροσσών και της εμπλοκή τους σε σηματοδοτικά μονοπάτια στο κακόηθες μεσοθηλίωμα και δύναται να έχουν θεραπευτικές προεκτάσεις για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

9. Βιβλιογραφία

1. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology*. 2007 ;69:377-400
2. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*. 2009;137(1):32–45.
3. Sorokin SP. RECONSTRUCTIONS OF CENTRIOLE FORMATION AND CILIOGENESIS IN MAMMALIAN LUNGS. Vol. 3, *J. Cell Sci*. 1968.
4. Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science*. 2010;123(4):499–503.
5. Pazour GJ. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: The ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. Vol. 15, *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004. p. 2528–36.
6. Seeley ES, Nachury M v. The perennial organelle: Assembly and disassembly of the primary cilium. Vol. 123, *Journal of Cell Science*. 2010. p. 511–8.
7. Li X.,POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE. Department of Internal Medicine,Department of Biochemistry and Molecular Biology,University of Kansas Medical Center,Kansas City,KS66160,USA8. Pala R, Jamal M, Alshammari Q, Nauli S. The Roles of Primary Cilia in Cardiovascular Diseases. *Cells*. 2018 Nov 27;7(12):233.
8. Pala R, Jamal M, Alshammari Q, Nauli S. The Roles of Primary Cilia in Cardiovascular Diseases. *Cells*. 2018 Nov 27;7(12):233.
9. Wei Q, Zhang Y, Li Y, Zhang Q, Ling K, Hu J. The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nature Cell Biology* [Internet]. 2012;14(9):950–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2560>
10. Lancaster MA, Gleeson JG. The primary cilium as a cellular signaling center: lessons from disease. Vol. 19, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2009. p. 220–9.
11. Conkar D, Firat-Karalar EN. Microtubule-associated proteins and emerging links to primary cilium structure, assembly, maintenance, and disassembly. Vol. 288, *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 786–98.
12. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: Building the cell’s antenna. Vol. 12, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011. p. 222–34.
13. Pan J, Seeger-Nukpezah T, Golemis EA. The role of the cilium in normal and abnormal cell cycles: Emphasis on renal cystic pathologies. Vol. 70, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. p. 1849–74.
14. Daviest F, Coles GA, Harperf PS, Williams AJ, Evansj C, Cochlinj D. Polycystic Kidney Disease Re-evaluated: A Population-based Study. Vol. 79, *Quarterly Journal of Medicine*. 1991.
15. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, et al. Chlamydomonas IFT 88 and Its Mouse Homologue, Polycystic Kidney Disease Gene Tg

- 737, Are Required for Assembly of Cilia and Flagella [Internet]. Vol. 151, The Journal of Cell Biology. 2000. Available from: <http://www.jcb.org/cgi/content/full/151/3/709>
16. Nachury M v., Loktev A v., Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1201–13.
 17. Jin H., Nachury V. M., The BBSome, *Current Biology* Vol 19 No 12,2009
 18. Bernabé-Rubio M, Alonso MA. Routes and machinery of primary cilium biogenesis. Vol. 74, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2017. p. 4077–95.
 19. Hernandez-Hernandez V, Pravicumar P, Diaz-Font A, May-Simera H, Jenkins D, Knight M, et al. Bardet-biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(19):3858–68.
 20. Fry AM, Leaper MJ, Bayliss R. The primary cilium: Guardian of organ development and homeostasis. Vol. 10, *Organogenesis*. Landes Bioscience; 2014. p. 62–8.
 21. Choy SW, Cheng SH. Hedgehog Signaling. In: *Vitamins and Hormones*. Academic Press Inc.; 2012. p. 1–23.
 22. Choy SW, Cheng SH. Hedgehog Signaling. In: *Vitamins and Hormones*. Academic Press Inc.; 2012. p. 1–23.
 23. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the primary cilium. Vol. 6, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
 24. Eguether T, Hahne M. Mixed signals from the cell’s antennae: primary cilia in cancer. *EMBO reports*. 2018 Nov;19(11).
 25. Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary cilium-dependent signaling mechanisms. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
 26. Chang CF, Schock EN, Attia AC, Stottmann RW, Brugmann SA. The ciliary baton: Orchestrating neural crest cell development. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc.; 2015. p. 97–134.
 27. Lal M, Song X, Pluznick JL, di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND, et al. Polycystin-1 C-terminal tail associates with β -catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Human Molecular Genetics*. 2008;17(20):3105–17.
 28. Lancaster MA, Gleeson JG. Cystic kidney disease: The role of Wnt signaling. Vol. 16, *Trends in Molecular Medicine*. 2010. p. 349–60.
 29. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. Vol. 19, *Cell Research*. 2009. p. 71–88.
 30. Tao Y, Kim J, Schrier RW, Edelstein CL. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;16(1):46–51.
 31. Abdul-Majeed S, Nauli SM. Calcium-mediated mechanisms of cystic expansion. Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011. p. 1281–90.

32. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Bredt S, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nature Cell Biology*. 2010 Nov;12(11):1115–22.
33. Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. In: *Acta Physiologica*. 2009. p. 65–80.
34. Kotsis F, Boehlke C, Kuehn EW. The ciliary flow sensor and polycystic kidney disease. Vol. 28, *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013. p. 518–26.
35. Christensen ST, Clement CA, Satir P, Pedersen LB. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. Vol. 226, *Journal of Pathology*. 2012. p. 172–84.
36. Bird SD, Legge M, Walker RJ. Cultured peritoneal mesothelial cells exhibit apical primary cilia. *Cell Biology International*. 2004;28(2):79–92.
37. Shi Y, Moura U, Opitz I, Soltermann A, Rehrauer H, Thies S, et al. Role of hedgehog signaling in malignant pleural mesothelioma. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(17):4646–56.
38. Hassounah NB, Nagle R, Saboda K, Roe DJ, Dalkin BL, McDermott KM. Primary Cilia Are Lost in Preinvasive and Invasive Prostate Cancer. *PLoS ONE*. 2013 Jul 2;8(7).
39. Wann AKT, Knight MM. Primary cilia elongation in response to interleukin-1 mediates the inflammatory response. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012 Sep;69(17):2967–77.
40. Tobin JL, Beales PL. The nonmotile ciliopathies. Vol. 11, *Genetics in Medicine*. 2009. p. 386–402.
41. Mutsaers SE. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair.
42. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004;36(1):9–16.
43. Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A. Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. Vol. 57, *Kidney International*. 2000.
44. Mutsaers SE, Wilkosz S. Structure and Function of Mesothelial Cells.
45. Robinson BWS, Lake RA. Advances in Malignant Mesothelioma [Internet]. Vol. 15, *n engl j med*. 2005. Available from: www.nejm.org
46. Scherpereel A, Wallyn F, Albelda SM, Munck C. Novel therapies for malignant pleural mesothelioma. Vol. 19, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2018. p. e161–72.
47. Tweedale G. Asbestos and its lethal legacy. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):311-5
48. Rogers A, Major G. Letters to the editor: The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure: The Wittenoom data. Vol. 46, *Annals of Occupational Hygiene*. Oxford University Press; 2002. p. 127–8.

49. Pacini F, Vivaldi A, Santoro M, Fedele M, Fusco A, Romei C, et al. Simian virus 40-like DNA sequences in human papillary thyroid carcinomas. 1998.
50. van Kaick G, Dalheimer A, Hornik S, Kaul A, Liebermann D, Lührs H, et al. Supplement: The International Workshop on the Health Effects of Thorotrast, Radium, Radon and Other Alpha-Emitters. Vol. 152, Source: Radiation Research. 1999.
51. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier - Health Sciences Division; 2017.
52. Atre ID, Watane GV, Harisinghani MG. Malignant peritoneal mesothelioma: correlation between CT imaging features and histologic subtypes. *Abdom Radiol (NY)*. 2021 Aug 3.
53. Jeffrey G. Ault, Richard W. Cole, Cynthia G. Jensen, Lawrence C. W. Jensen, Lori A. Bachert, and Cozily L Rieder. Behavior of Crocidolite Asbestos during Mitosis in Living Vertebrate Lung Epithelial Cells. (*CANCERRESEARCH*55, 792-798, February 15, 1995)
54. Okayasu R, Takahashi S, Yamada S, Hei TK, Ullrich RL. Asbestos and DNA Double Strand Breaks 1. 1999.
55. Zanella CL, Posada J, Tritton TR, Mossman BT. Asbestos Causes Stimulation of the Extracellular Signal-regulated Kinase 1 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade after Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor'. *Physiology & Biophysics (J P)*. 1996;1.
56. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2016 Apr 2;387(10026):1405–14.
57. Vavougiou GD, Solenov EI, Hatzoglou C, Baturina GS, Katkova LE, Molyvdas PA, et al. Computational genomic analysis of PARK7 interactome reveals high BBS1 gene expression as a prognostic factor favoring survival in malignant pleural mesothelioma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;309(7):L677–86.
58. Effect of primary cilium-associated genes expression on the survival of mesothelioma patients_ In silico investigation of TCGA data _ European Respiratory Society.
59. Kunnen SJ, Leonhard WN, Semeins C, Hawinkels LJAC, Poelma C, ten Dijke P, et al. Fluid shear stress-induced TGF- β /ALK5 signaling in renal epithelial cells is modulated by MEK1/2. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017 Jun 1;74(12):2283–98.
60. Ding D, Yang X, Luan H qin, Wu X tong, He C, Sun L wen, et al. Pharmacological Regulation of Primary Cilium Formation Affects the Mechanosensitivity of Osteocytes. *Calcified Tissue International*. 2020 Dec 1;107(6):625–35.
61. Jayagopal A, Brakeman PR, Soler P, Ferrell N, Fissell W, Kroetz DL, et al. Apical shear stress enhanced organic cation transport in Human OCT2/MATE1-transfected madin-darby canine kidney cells involves ciliary sensing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;369(3):523–30.

62. Kunnen SJ, Malas TB, Semeins CM, Bakker AD, Peters DJM. Comprehensive transcriptome analysis of fluid shear stress altered gene expression in renal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2018 Apr 1;233(4):3615–28.
63. Praetorius HA, Spring KR. Removal of the MDCK cell primary cilium abolishes flow sensing. *Journal of Membrane Biology*. 2003 Jan 1;191(1):69–76.
64. Khan NA, Willemarck N, Talebi A, Marchand A, Binda MM, Dehairs J, et al. Oncotarget 9975 www.impactjournals.com/oncotarget Identification of drugs that restore primary cilium expression in cancer cells [Internet]. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
65. Thompson CL, Wiles A, Poole CA, Knight MM. Lithium chloride modulates chondrocyte primary cilia and inhibits Hedgehog signaling. *FASEB Journal*. 2016 Feb 1;30(2):716–26.
66. Oliazadeh N, Gorman KF, Eveleigh R, Bourque G, Moreau A. Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients. *Scientific Reports*. 2017 Mar 14;7.