



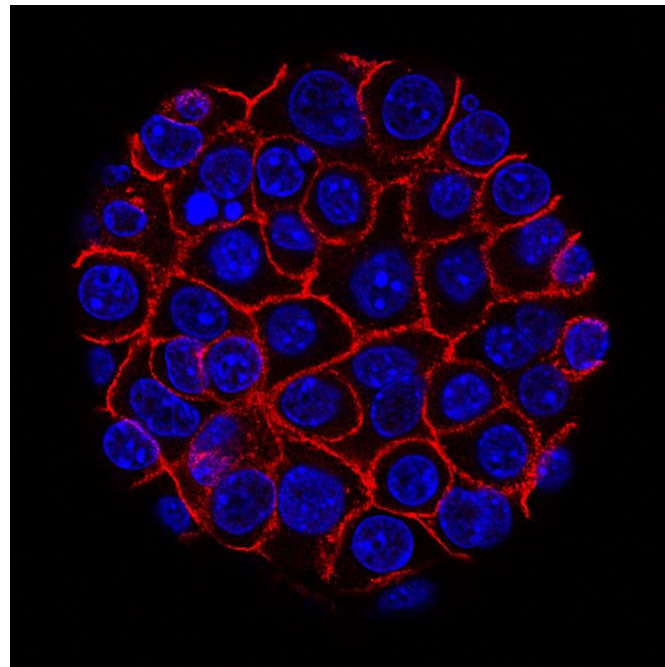
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ALDH3A1 ΣΤΟ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟ
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ»**

**«STUDY OF THE EFFECT OF ALDH3A1 ON PANCREATIC
DUCTAL ADENOCARCINOMA»**



Όνομα Φοιτήτριας: Τσαλκιτζίδου Σοφία του Παρασκευά
Επιβλέπων Καθηγητής: Γιακουντής Αντώνιος
Ιούνιος 2022

Τριμελής Επιτροπή

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της πτυχιακής αυτής δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την βοήθεια του επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Αντώνιο Γιακουντή, που μου έδωσε την ευκαιρία να αναπτυχθώ σαν επιστήμονας και έδειξε υπέρογκη κατανόηση καθ' όλη τη διάρκεια της, με κατατοπίστηκες συμβουλές για όλα τα εμπόδια που συνάντησα. Επιπλέον, θα ήταν παράληψή μου να μην αναφερθώ στην κυρία Θεολογία Σαραφίδου και στην κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, που εκτός από αξιότιμες καθηγήτριες μου, συνέβαλαν και στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω το εργαστήριο που εκπόνησα την Erasmus πρακτική μου που μου χάρισε μοναδικές εμπειρίες και γνώσεις για την μετέπειτα επιστημονική μου ζωή.

Τέλος, δεν ξεχνώ την βοήθεια της οικογένειάς μου που με στήριξε σε όλες μου τις αποφάσεις και έκανε αυτό το ταξίδι πιο εύκολο να πραγματοποιηθεί.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	9
Abstract	10
1. Εισαγωγή	11
1.1. Παγκρεατικό Αδενοκαρκίνωμα	11
1.1.1. Παράγοντες κινδύνου	13
1.1.2. Δυσκολία ανίχνευσης παγκρεατικού καρκίνου	16
1.2. Η δράση των αλδεϋδικών αφυδρογονασών στον παγκρεατικό καρκίνο.....	18
1.2.1. Η δράση της ALDH3A1 και η λειτουργία της στα διάφορα καρκινικά είδη.....	21
1.3. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT και η δράση τους στην εξέλιξη του καρκίνου	24
1.3.1. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFATc1 και η σύνδεσή του με την ALDH3A1	27
2. Σκοπός	29
3. Μέθοδοι	30
3.1. Κυτταροκαλλιέργειες	30
3.2. Εξαγωγή πρωτεϊνών και μέθοδος BCA για ποσοτικοποίηση.....	30
3.3. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανίχνευση τους με Western Blot.	32
3.4. Εκχυλίσματα Οργανοειδών ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο	36
3.5. Πειράματα απόκρισης δόσης της πουρομυκίνης στις κυτταρικές σειρές.....	37
3.6. Επιμόλυνση και επιλογή των AsPC-1 και Suit2-020.....	37
3.7. Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού	39
3.8. Εύρεση κατάλληλης κυτταρικής συγκέντρωσης των κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια 96 – well plates	39
3.9. Αναστολή της ALDH3A1 σε AsPC-1 κύτταρα με τον αναστολέα CB29.....	39
4. Αποτελέσματα.....	41
4.1. Διαφορική έκφραση των ALDH3A1 και NFATc1 σε εκχυλίσματα οργνοειδών ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο	41
4.2. Μέθοδος MTT για την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης των κυττάρων προς καλλιέργεια σε 96-well plates	42
4.2.1. Κυτταρική σειρά AsPC-1	42
4.2.2. Κυτταρική σειρά Suit2-020.....	43
4.3. Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των AsPC-1 με ανεσταλμένη την δράση της ALDH3A1.....	44
4.4. Δημιουργία ALDH3A1 KO και NFATC1 KO κυτταρικών σειρών	47

4.5. Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των AsPC-1 ΚΟ και Suit2-020 ΚΟ κυττάρων.....	48
5. Συζήτηση	51
6. Βιβλιογραφία	55
6.1. Βιβλιογραφία Εικόνες	62

Περίληψη

Ο καρκίνος του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (PDAC) υπολογίζεται να είναι η δεύτερη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα μέχρι το 2030, με συνεχή αυξανόμενα περιστατικά ασθενών και περιπτώσεις θνησιμότητας ανά τα έτη. Τώρα αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο, με 11,5% πιθανότητα πενταετούς επιβίωσης μεταξύ των ασθενών. Η ανάπτυξη του καρκίνου αυτού οφείλεται σε γενετικές και περιβαλλοντικές συνθήκες που υποβοηθούν την ανάπτυξη και μετάστασή του. Εντός αυτών των αλλαγών, παρατηρείται και η υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας αλδεϋδικών αφυδρογονασών (ALDH) που πιο συγκεκριμένα έχει φανεί πως τα μέλη ALDH1A1, ALD1A3 και ALDH3A1 εμφανίζουν σημαντικό ρόλο. Η ALDH3A1 αποτελεί ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση των ενδογενών και εξωγενών αλδεϋδών των κυττάρων στα αντίστοιχα καρβοξυλικά τους οξέα, χρησιμοποιώντας ως συμπάραγοντα τον NAD(P). Η δράση της αυτή, χρησιμοποιείται από τα καρκινικά κύτταρα με στόχο την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα, την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους και την προστασία τους από απόπτωση. Παράλληλα, παρατηρείται και μία αύξηση της συγκέντρωσης του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1 (Νουκλεϊκού παράγοντα ενεργών T-λεμφοκυττάρων, κυτοπλασματικού 1), ο οποίος έχει μελετηθεί κυρίως για την δράση του στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά πρόσφατα μελετήθηκε και η έκφραση του στους ασθενείς με PDAC. Ο NFATC1 στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος υπερεκφράζεται και συμμετέχει σε λειτουργίες, όπως την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά και πρόσφατα προτάθηκε η σχέση του με τη μεταγραφή του γονιδίου της ALDH3A1. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της ALDH3A1 στο ρυθμό πολλαπλασιασμού δύο κυτταρικών σειρών PDAC με την καταστολή της με τη μέθοδο της CRISPR/Cas9. Παράλληλα, έγινε καταστολή και του γονιδίου *nfatc1* για τον προσδιορισμό της σχέσης του με την ALDH3A1 και την μελέτη της εκφραστικής ικανότητας της πρωτεΐνης έπειτα από την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα. Επίσης, ελέγχθηκε και η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων με κατεσταλμένο τον μεταγραφικό παράγοντα για την επιβεβαίωση της δράσης του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από τα πειράματα φάνηκε πως η ALDH3A1 συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων, αλλά περαιτέρω πειράματα πρέπει να γίνουν για να επιβεβαιώσουν την περίπτωση αυτή. Τέλος, παρουσιάστηκε μία σχέση μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1 και της πρωτεΐνης ALDH3A1, με παραπάνω πειράματα να χρειάζεται να γίνουν για την επαλήθευση.

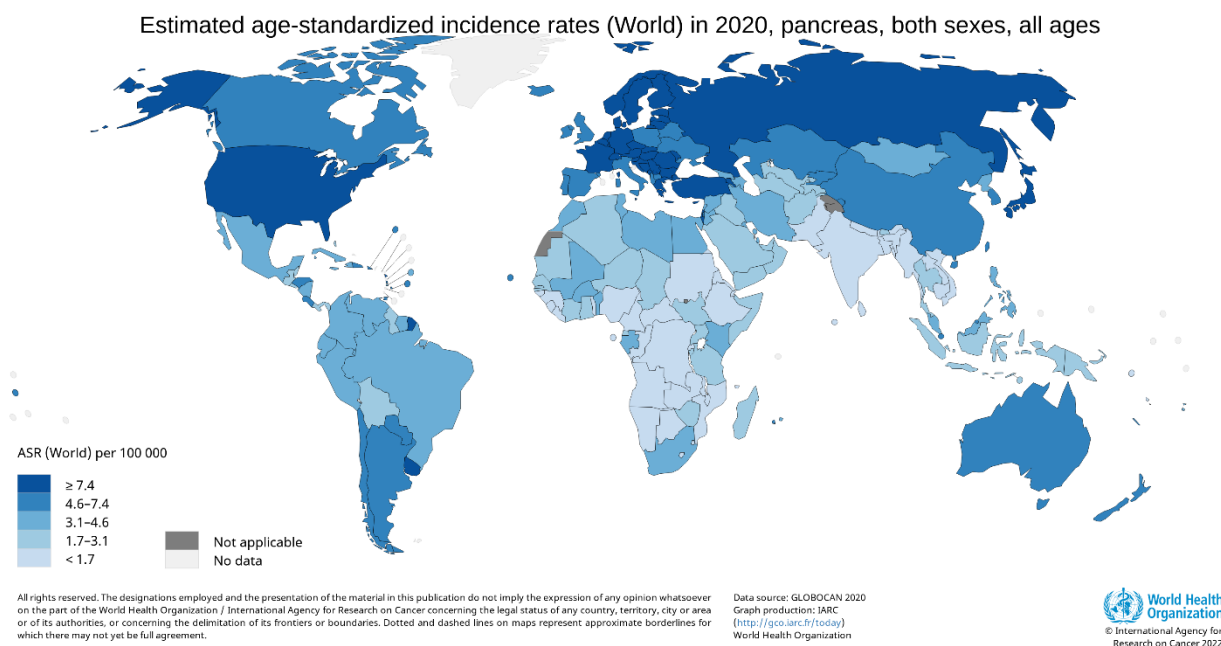
Abstract

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is estimated to be the second leading cause of cancer related death after lung cancer by 2030, with increasing incidents and mortality rates throughout the years. It is now the fourth leading cause of cancer related death, with 11.5% survival rate of five years among patients. The development of this cancer is due to genetic and environmental conditions that help its growth and metastasis. Within these changes, it is also observed a high expression rate of the proteins of the Aldehyde Dehydrogen (ALDH) family, with more specifically, the members ALDH1A1, ALDH1A3 and ALDH3A1 to play an important role. ALDH3A1 is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of the endogenous and exogenous aldehydes to their corresponding carboxylic acids, using NAD(P) as a cofactor. This function is used by cancer cells to resist chemotherapeutic drugs, increase their cell proliferation and protect them from apoptosis. At the same time, it is also observed an increase in the concentration of the transcription factor NFATC1 (Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1), which has been studied mainly for its effect in the function of the immune system, but recently its expression was studied in the patients with PDAC. NFATC1 is overexpressed in pancreatic cancer cells and participate in functions, such as angiogenesis, cell proliferation and the resistance to chemotherapeutic drugs and recently it was proposed a relationship with the transcription of the gene *aldh3a1*. The aim of this thesis is to study the effect of ALDH3A1 in the proliferation rate of two PDAC cell lines, with suppressing its gene following the method of CRISPR/Cas9. At the same time, there was, also, a suppression of the gene *nfatc1* to determine its relationship with ALDH3A1 and to study the expression of this protein after the knockout of the transcription factor. The proliferative rate of the cells with suppressed transcription factor was also observed, for the confirmation of its effect in the cell proliferation. The experiments showed that ALDH3A1 is involved in cell proliferation of pancreatic cancer cells, but further experiments need to be done to confirm this. At last, a relationship among the transcription factor NFATC1 and the protein ALDH3A1 was showed, with more experiments must be done to confirm this.

1. Εισαγωγή

1.1. Παγκρεατικό Αδενοκαρκίνωμα

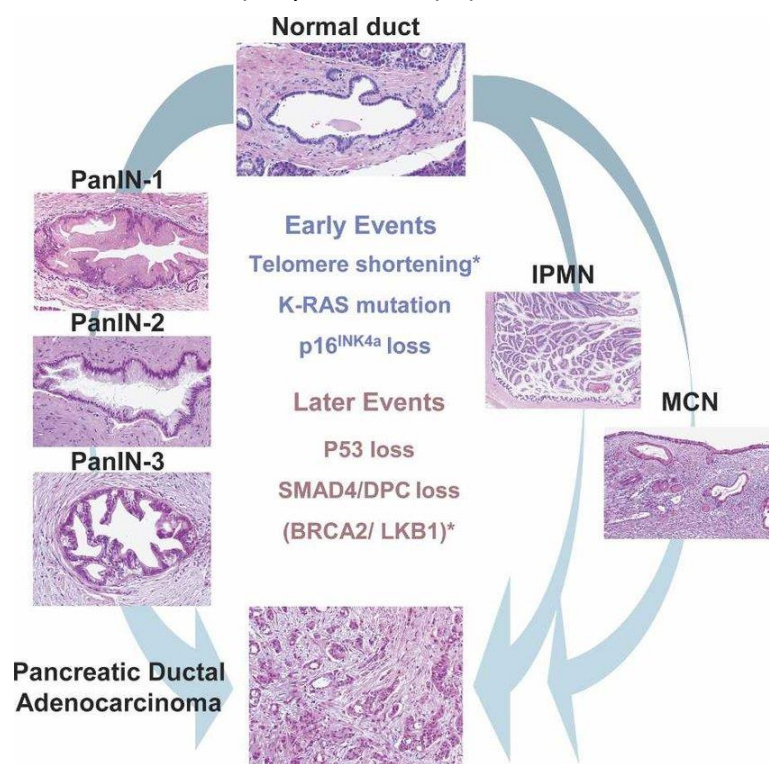
Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη από την συγκεκριμένη νόσο μεταξύ των Δυτικών χωρών και υπολογίζεται να γίνει η δεύτερη αιτία θανάτου μετά τον καρκίνο του πνεύμονα μέχρι το 2030 [1]. Παρά τη βελτίωση των τεχνικών για την ανίχνευση και τη διαχείριση του καρκίνου του παγκρέατος, το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης φτάνει μόνο το 11,5% [2,3]. Το 2020, καταγράφηκαν παγκοσμίως τόσα περιστατικά παγκρεατικού καρκίνου (495.773) όσοι και οι θάνατοι (466.003), λόγω κακής πρόγνωσης, αποτελώντας το 2,5% των νέων περιπτώσεων καρκίνου. Οι νέες περιπτώσεις καρκίνου του παγκρέατος είναι μεγαλύτερες μεταξύ των ανεπτυγμένων χωρών, με τις υψηλότερες να περιλαμβάνουν την Ασία, Ευρώπη και Βόρεια Αμερική, δεδομένου ότι υψηλότερα ποσοστά παχυσαρκίας, κατανάλωσης αλκοόλ και καπνίσματος παρατηρούνται σε αυτές τις ηπείρους (Εικόνα 1) [9]. Το 2022, υπολογίζεται ότι θα διαγνωστούν 62.210 νέες περιπτώσεις και θα σημειωθούν 49.830 θάνατοι λόγω του καρκίνου του παγκρέατος στις Ηνωμένες Πολιτείες [3].



Εικόνα 1 Περιστατικά παγκρεατικού καρκίνου. Τυποποιημένες για την ηλικία επιπτώσεις (Age-standardized incidence rates, ASR) του παγκρεατικού καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα, συμπεριλαμβανομένου και των δύο φύλων και όλων των ηλικιών για το έτος 2020 (Ανακτήθηκε από: <https://gco.iarc.fr/today> [9]).

Ο καρκίνος του παγκρέατος μπορεί να διαχωριστεί σε εξωκρινείς και ενδοκρινείς όγκους, με τους πρώτους να συνιστούν περίπου το 95% της νόσου, με το πιο κοινό να είναι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (PDAC) [2]. Οι ενδοκρινείς όγκοι ή αλλιώς οι παγκρεατικοί νευροενδοκρινείς όγκοι (PanNET) είναι λιγότερο συχνοί (7% των

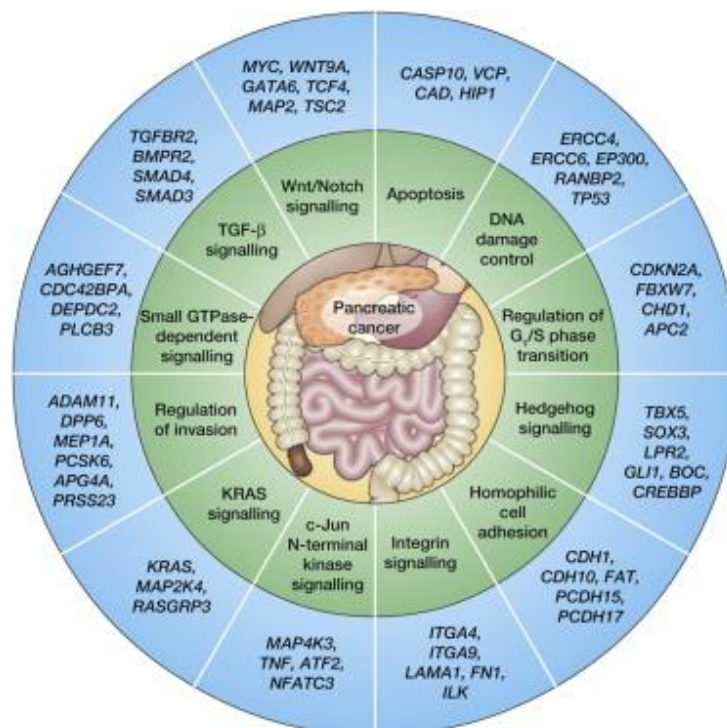
όγκων του παγκρέατος) και σε αντίθεση με το PDAC έχουν πιο ευνοϊκή πρόγνωση [4]. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι το PDAC προέρχεται από μη επεμβατικές πρόδρομες αλλοιώσεις που κατηγοριοποιούνται ως κυστικές ή μη κυστικές αλλοιώσεις [4,5]. Οι διαφορά αυτών των δύο έγκειται κυρίως στην ύπαρξη ενός στρώματος επιθηλιακών κυττάρων στις κυστικές αλλοιώσεις, σε αντίθεση με τις μη κυστικές που περιβάλλονται μόνο από συνδετικό και φλεγμονώδες ιστό [61]. Οι κυστικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν το ενδοπορικό θηλώδες βλεννώδες νεόπλασμα (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm, IPMN), το ενδοπορικό θηλώδες νεόπλασμα (Intraductal Tubulopapillary Neoplasm, ITPN) και το βλεννώδες κυσταδένωμα (Mucinous Cystic Neoplasm, MCN), ενώ οι μη κυστικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν την παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia, PanIN), η οποία είναι ο πιο κοινός τύπος από τον οποίο μπορεί να αναπτυχθεί το PDAC [4,5]. Αυτές οι πρόδρομες αλλοιώσεις, ανάλογα με τον βαθμό της δυσπλασίας τους διακρίνονται σε χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού βαθμού, με την τελευταία να έχει μεγαλύτερο κίνδυνο να εξελιχθεί σε κακοήγη όγκο και να απαιτεί χειρουργική εκτομή, ενώ οι δύο πρώτες έχουν χαμηλό κίνδυνο μετάστασης αλλά απαιτούν κλινική παρακολούθηση [6].



Εικόνα 2 Εξέλιξη των πρόδρομων αλλοιώσεων που προηγούνται του PDAC. Στην εικόνα φαίνονται μερικές από τις πρόδρομες αλλοιώσεις που προηγούνται του PDAC και γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη αυτών. Στα αριστερά φαίνεται η αυξανόμενη πρόοδος των PanIN (1-3) και παράλληλα η αυξανόμενη αλλοίωση του ιστού, που τελικά οδηγεί σε αδενοκαρκίνωμα. Στα δεξιά φαίνεται η εξέλιξη των MCNs και IPMNs. Στο κέντρο φαίνονται οι γενετικές αλλοιώσεις που μπορεί να προκύψουν με βάση το στάδιο εξέλιξης. Με αστερίσκο επισημαίνονται οι περιπτώσεις γενετικών αλλαγών που μπορεί να μην είναι κοινές σε όλες τις πρόδρομες αλλοιώσεις.

1.1.1. Παράγοντες κινδύνου

Το PDAC αναπτύσσεται από τις προαναφερθείσες πρόδρομες αλλοιώσεις λόγω και της συσσώρευσης μεταλλάξεων. Γενετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ανάλογα με τον βαθμό των παγκρεατικών νεοπλασιών ή του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος παρατηρούνται διαφορετικές γενετικές μεταλλάξεις. Γενικά το 10% των ασθενών με PDAC φαίνεται να έχουν παθογενείς μεταλλάξεις με τις πιο σύνηθες στα γονίδια BRCA2, ATM, BRCA1, PALB2, CDKN2A/p16, και LKB1/STK11^[2,6,7]. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η μείωση του μήκους των τελομερών και μεταλλάξεις στην KRAS εμφανίζονται νωρίς στην εξέλιξη του όγκου, ενώ η δράση των ογκοκαταστολέων CDKN2A/p16, p53 και SMAD4 φαίνεται να απουσιάζει σε μεταγενέστερα στάδια της νεοπλασματικής εξέλιξης^[6,7]. Επιπλέον, άτομα με μεταλλάξεις στα BRCA2 και ATM και σε μικρότερο βαθμό τα BRCA1 και STK11, εμφανίζουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος ^[2,16]. Αυτές οι γενετικές μεταλλάξεις είναι απλώς ένα τμήμα μιας μεγαλύτερης υποομάδας γενετικών αλλαγών που όσο περισσότερες συσσωρεύονται τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης πιο επιθετικών καρκινωμάτων (Εικόνα 3) ^[6,7]. Ωστόσο, αυτές οι αλλαγές χρησιμοποιούνται ως στόχοι για εξατομικευμένη θεραπεία από κλινικές δοκιμές που μπορούν να βελτιώσουν τον προ-συμπτωματικό έλεγχο και την πρώιμη ανίχνευση του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος ^[6].



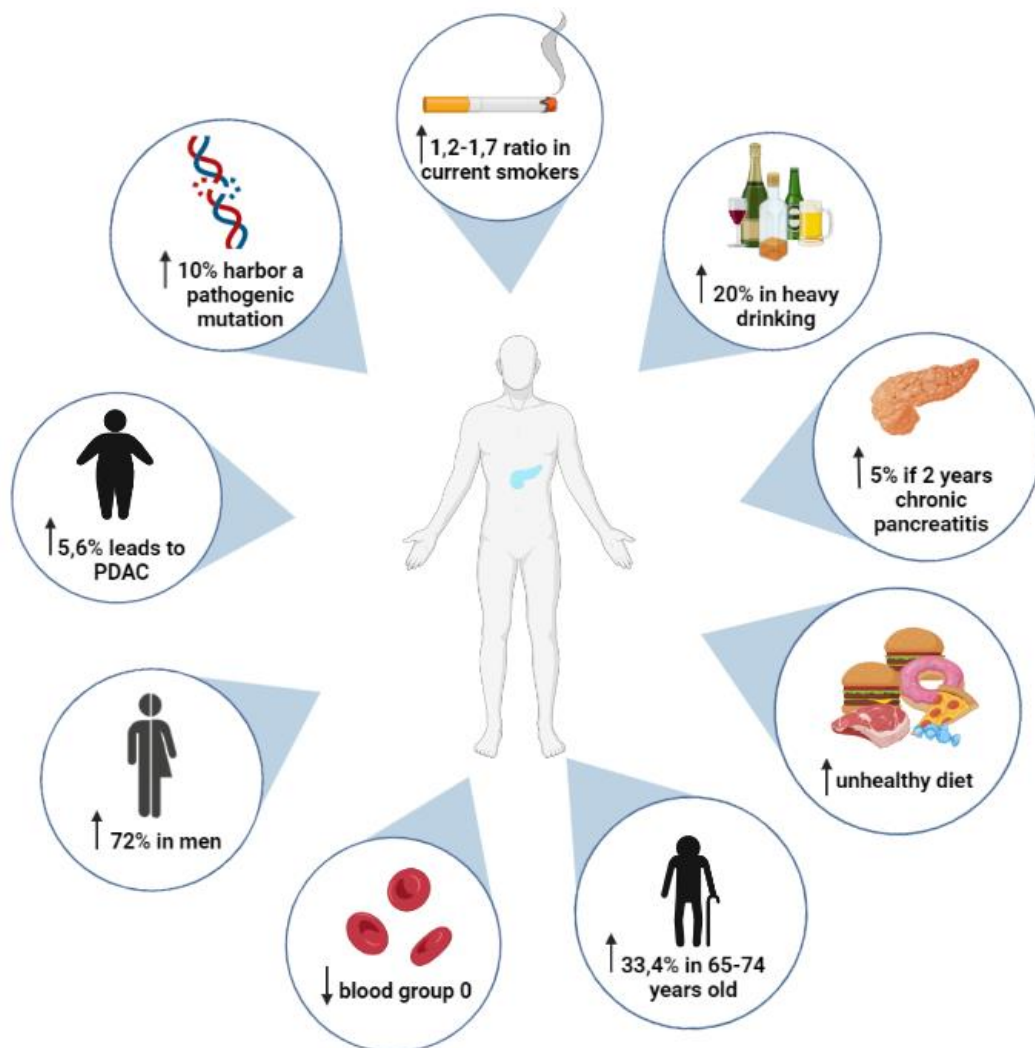
Εικόνα 3 Σηματοδοτικά μονοπάτια και γονιδιακές μεταλλάξεις που εμφανίζονται στους περισσότερους ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος [5].

Εκτός από τις γενετικές παραλλαγές, επιπρόσθετοι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου, περιλαμβάνουν την ηλικία, το φύλο, το σακχαρώδη διαβήτη, την ομάδα αίματος ABO και το οικογενειακό ιστορικό. Έχει παρατηρηθεί ότι το PDAC συνήθως διαγιγνώσκεται σε ηλικίες 65-74 ετών (33,4%) και για τα δύο φύλα, αλλά πιο συχνά στους άνδρες (5,5 ανά 100.000) παρά στις γυναίκες (4,0 ανά 100.000) ^[4,9]. Αρκετές μελέτες, επίσης, έχουν βρει μια συσχέτιση μεταξύ του PDAC και της εθνικότητας του ασθενούς, με περισσότερα κρούσματα να εμφανίζονται μεταξύ των Αφροαμερικανών και των Καυκάσιων και λιγότερα μεταξύ των Ασιατοαμερικανών και των πληθυσμών των νησιών του Ειρηνικού^[4,5]. Ακόμη, είναι ενδιαφέρον ότι οι ερευνητές συσχετίζουν τις ομάδες αίματος ABO, και πιο συγκεκριμένα τους τύπους αίματος A, B και AB, με την ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος ^[4,12], αλλά η συσχέτιση των τύπων αίματος με το συνολικό χρόνο επιβίωσης είναι ακόμα υπό συζήτηση. Οι Li et al. ^[11] διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με ομάδες αίματος A, B και AB είχαν μικρό, αλλά μεταξύ τους παρόμοιο, συνολικό χρόνο επιβίωσης σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδας αίματος O. Αντίθετα, οι Williams et al. ^[10] κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των διαφορετικών ομάδων αίματος και του συνολικού χρόνου επιβίωσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς που νοσούν με διαβήτη τύπου 2 για περισσότερα από 5 χρόνια, παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης PDAC κατά 1,0-1,5 φορές περισσότερο, ενώ οι πιθανότητες μπορεί να αυξηθούν έως και 5,2 φορές υψηλότερα όταν ο διαβήτης βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο (λιγότερο από ένα έτος). Αυτό προέκυψε από την παρακολούθηση της ανάπτυξης του παγκρεατικού καρκίνου έπειτα από 24-36 μήνες διάγνωσης του διαβήτη τύπου 2, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο διαβήτης αποτελεί πρώιμο σημάδι για την ανάπτυξη του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος ^[10].

Επιπροσθέτως, το οικογενειακό ιστορικό μπορεί να αποτελέσει επίσης έναν μη τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου που αποδίδεται σε σχεδόν 5-10% των ασθενών με PDAC. Οι συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών με PDAC έχουν εννέα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του παγκρέατος σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό και μπορούν να φτάσουν έως και 32 φορές υψηλότερα εάν υπάρχουν τρεις ή περισσότεροι συγγενείς πρώτου βαθμού ^[4,7]. Οι οικογένειες, όμως, με μεγαλύτερο οικογενειακό ιστορικό σε PDAC δεν έχουν συνήθως τις κοινές γονιδιακές μεταλλάξεις που χαρακτηρίζουν τα αδενοκαρκινώματα του παγκρεατικού καρκίνου. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις που αναφέρονται στο οικογενειακό ιστορικό είναι

συνήθως συγκεκριμένες και δεν αποδεικνύουν την ύπαρξη παγκρεατικού καρκίνου σε άλλα άτομα εξωτερικά της οικογένειας με τις ίδιες μεταλλάξεις [10].



Εικόνα 4 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του παγκρέατος. Στην εικόνα φαίνονται κάποιοι από τους παράγοντες κινδύνου που μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης παγκρεατικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, στην εικόνα απεικονίζονται ως παράγοντες κινδύνου το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η διατροφή, η ηλικία και ομάδα αίματος του ασθενούς, το φύλο, η παχυσαρκία και οι πιθανές μεταλλάξεις. Τα βελάκια (↑, ↓) υποδεικνύουν την αυξημένη ή μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης PDAC, αντίστοιχα, με την εμφάνιση του παράγοντα. [Η εικόνα δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας την εφαρμογή BioRender.com].

Εκτός από τους παραπάνω κινδύνους, υπάρχουν και τροποποιήσιμοι παράγοντες που αποδίδουν στην ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος. Το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ είναι δύο αρκετά γνωστοί παράγοντες κινδύνου για πολλές ασθένειες. Για τον παγκρεατικό καρκίνο έχει παρατηρηθεί πως τωρινοί καπνιστές και πρώην καπνιστές έχουν 1,7 και 1,2 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης PDAC σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Αντιθέτως, μετά από 20 χρόνια αποχής από το κάπνισμα η σύνδεση του καπνίσματος με την ανάπτυξη του παγκρεατικού καρκίνου μηδενίζεται. Αντίστοιχα, η υψηλή κατανάλωση αλκοόλ (>3 ποτά/ημερησίως, >40g/μέρα) αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης PDAC κατά 20% σε

αντίθεση με μικρότερη κατανάλωση αλκοόλ που δεν έχει βρεθεί να συνδέεται με την ασθένεια^[16,17,18].

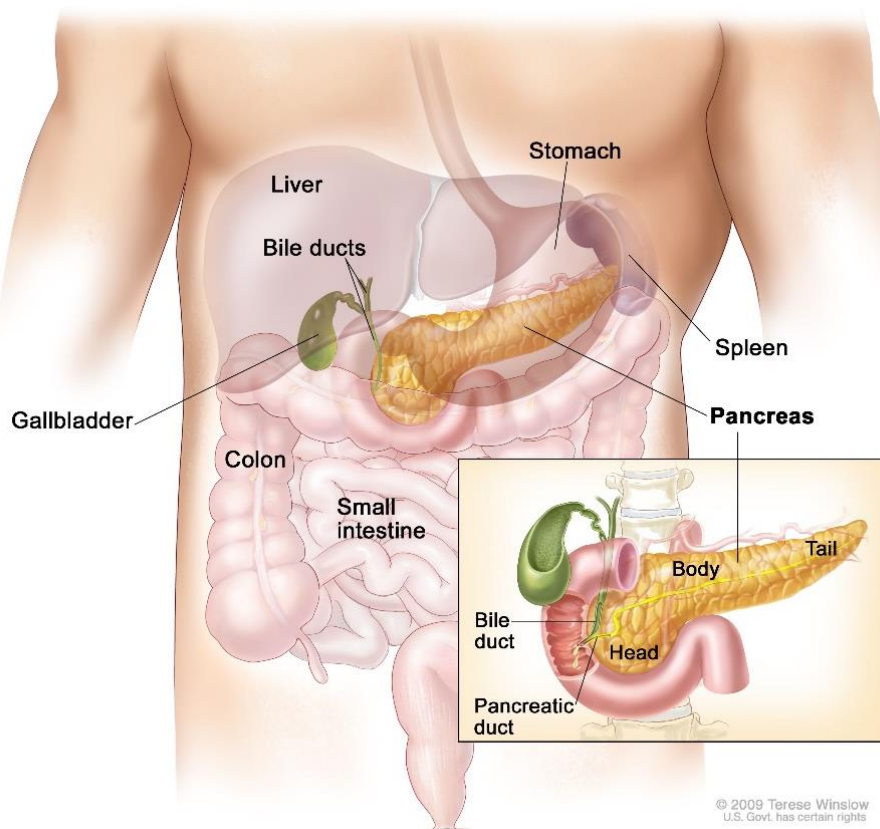
Παρόλο που η σύνδεση του PDAC με την διατροφή δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, η μειωμένη κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος και η αυξημένη κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών, μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος^[13,19]. Επιπλέον, η παχυσαρκία οφείλεται για το 5,6% των παγκρεατικών καρκίνων που σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (39-70 χρονών) μειώνει τον συνολικό χρόνο επιβίωσης^[3,4,9].

Ότι αφορά τους ασθενείς με χρόνια παγκρεατίτιδα 2 ετών, σχεδόν το 5% από αυτούς θα αναπτύξουν καρκίνο του παγκρέατος τις επόμενες 2 δεκαετίες της διάγνωσης τους, λόγω της χρόνιας φλεγμονής που προκαλείται στο πάγκρεας. Ο κίνδυνος αυξάνεται για τα άτομα που καπνίζουν, καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλ, έχουν ανάπτυξη πρώιμου διαβήτη ή είναι ηλικίας άνω των 60 ετών ^[14,15]. Οι ερευνητές, επίσης, ισχυρίζονται ότι εφόσον ο καρκίνος του παγκρέατος και η χρόνια παγκρεατίτιδα έχουν παρόμοια κλινική εικόνα, η εσφαλμένη διαφοροποίησή τους είναι εξαιρετικά υψηλή με αποτέλεσμα οι ασθενείς να οδηγούνται σε διαφορετική θεραπεία με απρόβλεπτα αποτελέσματα^[13,14].

1.1.2. Δυσκολία ανίχνευσης παγκρεατικού καρκίνου

Το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος εμφανίζει πολύ κακή πρόγνωση λόγω της δυσκολίας ως προς την έγκαιρη ανίχνευση, καθώς τα συμπτώματα εμφανίζονται κατά το τελικό στάδιο του καρκίνου που συνοδεύεται από μεταστάσεις. Η χειρουργική αφαίρεση είναι μια πολύ καλή επιλογή που προσφέρει πιθανή θεραπεία ειδικά όταν διεξάγεται συνδυαστικά με χημειοθεραπεία. Ωστόσο, μόνο το 20% των όγκων του παγκρέατος θεωρούνται κατάλληλοι προς αφαίρεση κατά τη στιγμή της διάγνωσης, συμπεριλαμβανομένων και των ασθενών των οποίων τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν εξαπλωθεί σε κρίσιμα όργανα. Η εκτομή αυξάνει το ποσοστό 5ετούς τους επιβίωσης στο 31% ^[6,8].

Η δυσκολία του PDAC στην ανίχνευση και τη θεραπεία έγκειται σε ορισμένες θεμελιώδεις προκλήσεις. Πρώτον, το πάγκρεας βρίσκεται πίσω από το στομάχι, το λεπτό έντερο, το ήπαρ, την ουροδόχο κύστη, την σπλήνα, τους χοληφόρους πόρους και τους άνω κύριους κλάδους της αορτής (Εικόνα 5), με αποτέλεσμα ο αναπτυσσόμενος όγκος να μην γίνει άμεσα αισθητός και επομένως να μην ανιχνευτεί γρήγορα. Επιπλέον, η ανάπτυξη του όγκου γύρω από τα αγγεία της αορτής, καθιστά δύσκολη τη διαδικασία της αφαίρεσής του, με αποτέλεσμα, τελικά, μόνο το 15-20% αυτών να μπορούν να αφαιρεθούν, όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Η θέση αυτή στην οποία αναπτύσσεται όγκος οδηγεί και στους πόνους στην άνω κοιλιακή περιοχή και στην απώλεια βάρους που έχει παρατηρηθεί μεταξύ των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο.



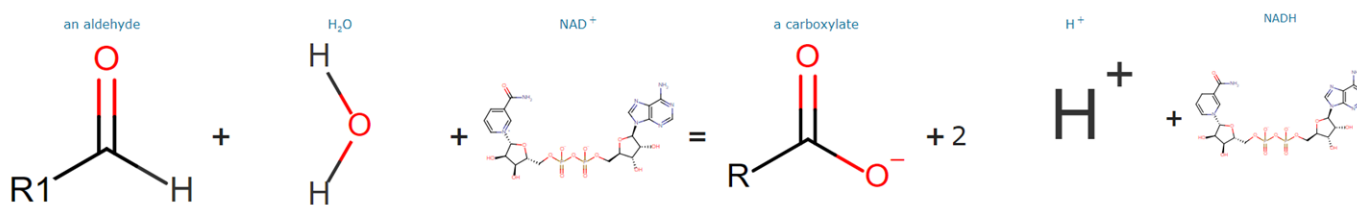
Εικόνα 5 Ανατομία του παγκρέατος. Το πάγκρεας αποτελείται από τρία τμήματα: το κεφάλι, το σώμα και την ουρά. Η κάθε παγκρεατική πρόδρομη αλλοίωση μπορεί να χαρακτηριστεί και από την εμφάνιση της στα συγκεκριμένα τμήματα του παγκρέατος. Η θέση του οργάνου πίσω από το στομάχι, το λεπτό έντερο, το ήπαρ, την ουροδόχο κύστη, την σπλήνα και τους χοληφόρους πόρους, καθιστά δύσκολη την ανίχνευση και την εκτομή κάποιου πιθανού όγκου. [6,62]

Δεύτερον, η φυσιολογία του καρκίνου αυτού παρουσιάζει ταχεία εξέλιξη, επιθετικότητα και πολύ ισχυρή αντοχή έναντι πολλών αντικαρκινικών θεραπειών. Η καθυστερημένη ανίχνευση και η ταχεία και επιθετική συμπεριφορά του όγκου οδηγούν στην γρήγορη αποδυνάμωση των ασθενών ήδη πριν την έναρξη των θεραπειών με αποτέλεσμα να μην αντέχουν τη διαδικασία αυτή. Αυτό αποτελεί και

τον τρίτο λόγο δυσκολίας της θεραπείας της νόσου αυτής. Τέλος, η ταχεία εξέλιξη και επιθετικότητα οδηγούν στην εμφάνιση μεταστατικών όγκων σε περισσότερο από το 50% των ασθενών, ενώ έχει παρατηρηθεί και εμφάνιση όγκων σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί χειρουργική αφαίρεση, 4 έτη μετά την επέμβαση, με το 90% αυτών να πεθαίνουν λόγω της εμφάνισης νέου όγκου. Αυτό δείχνει την παρουσία ήδη μεταστάσεων που πιθανώς δεν είχαν ανιχνευτεί [2,5,20,62].

1.2. Η δράση των αλδεϋδικών αφυδρογονασών στον παγκρεατικό καρκίνο

Οι αλδεϋδικές αφυδρογονάσες (aldehyde dehydrogenases, ALDHs) είναι μεταβολικά ένζυμα που εξαρτώνται από το συμπράγοντα NAD(P) και συμμετέχουν στην οξείδωση αλδεϋδών στα αντίστοιχα καρβοξυλικά τους οξέα (Εικόνα 6)^[21,44]. Στον άνθρωπο κωδικοποιούνται από 19 γονίδια και αποτελούνται από

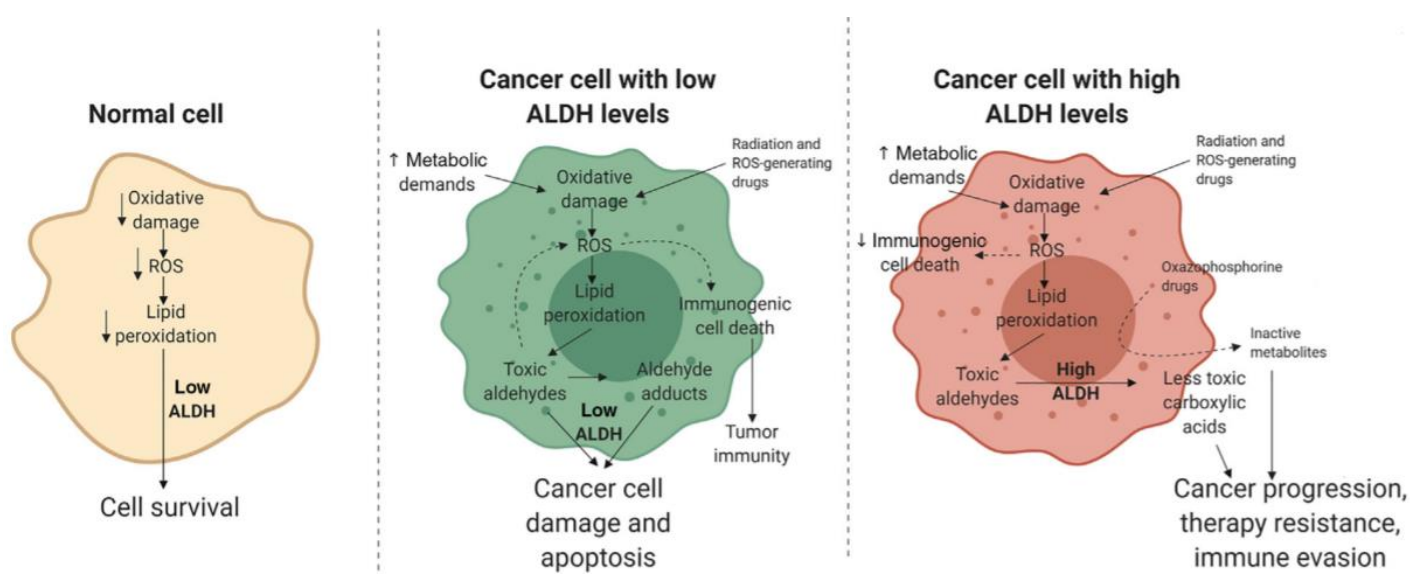


Εικόνα 6 Οξείδωση αλδεϋδών έπειτα από την δράση των ALDH. Οι ALDH οξειδώνουν ενδογενείς ή εξωγενείς αλδεϋδες στα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα τους.

11 οικογένειες που η κάθε μία από αυτές αποτελείται από 1 έως 11 υποοικογένειες^[44]. Οι ALDHs μέσω της οξείδωσης των ενδογενών και εξωγενών αλδεϋδών συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και επιβίωση, καθώς και απόκριση στο οξειδωτικό στρες^[21,44]. Οι αλδεϋδες που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες αποτελούν ισχυρά ηλεκτρόφιλα μόρια που μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς με νουκλεόφιλα, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Στόχος των ALDHs αποτελεί η οξείδωση αυτών των κυτοτοξικών μορίων σε μορφές λιγότερο δραστικές. Παρόλα αυτά, οι αλδεϋδες είτε ενδογενείς (προερχόμενες από το μεταβολισμό των αμινοξέων, βιταμινών, στεροϊδών, ή λιπιδίων) είτε εξωγενείς (προερχόμενες από το μεταβολισμό των φαρμάκων ή προϊόντων του περιβάλλοντος), μπορεί να έχουν επωφελή ρόλο στην υγεία του ανθρώπου, συμμετέχοντας στην όραση, την εμβρυική ανάπτυξη και τη νευροδιαβίβαση^[44], αλλά και να εμφανίζουν μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο και κυτταροτοξικό ρόλο^[21,23,44]. Αυτό μπορεί να φανεί από μελέτες που αποδεικνύουν την δράση των ALDH ισοενζύμων στην επαγόμενη από αλδεϋδες κυτοτοξικότητα, αλλά και από την επίδραση στην υγεία του ανθρώπου όταν υπάρχει κάποια μετάλλαξη στα γονίδια των ALDH που οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας, άρα και στη

συσσώρευση κυτοτοξικών αλδευδών, με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών^[21,44]. Μερικά παραδείγματα ασθενειών που προκύπτουν από απώλεια λειτουργίας των γονιδίων ALDH αποτελούν το σύνδρομο Sjögren–Larsson, την υπερπρολιναιμία τύπου 2, την γ-υδροξυβουτυρική οξέωση, τη νόσο Alzheimer με όψιμη έναρξη καθώς και ασθένειες σχετιζόμενες με αλκοόλ ^[21,44].

Εκτός από τον ρόλο τους στην οξείδωση αλδευδών, ορισμένες ALDHs, όπως οι ALDH1A1, ALDH2, ALDH3A1 και ALDH4A1 εμφανίζουν δράση εστεράσης, με την ALDH2 να έχει και δράση νιτρικής αναγωγάσης^[22,24]. Επιπλέον, οι ALDH εμφανίζουν και αντιοξειδωτικό ρόλο, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής NAD(P)H, της απορρόφησης της ακτινοβολίας UV και της απομάκρυνσης των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)^[44].



Εικόνα 7 Δράση των ALDHs στον καρκίνο. Στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχουν χαμηλότερες μεταβολικές απαιτήσεις, με αποτέλεσμα η απόκριση στο οξειδωτικό στρες και η παραγωγή αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) να είναι μικρότερη, επομένως η δράση των ALDH να μην είναι τόσο απαραίτητη για αποτοξίνωση. Αντιθέτως τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερη οξειδωτική βλάβη που προκύπτει από τις αυξημένες μεταβολικές τους απαιτήσεις και τη προστασία τους από φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του καρκίνου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση των ROS που οδηγεί σε ανοσολογική καταστροφή και την παραγωγή υπεροξειδωμένων λιπιδίων και όξινων αλδευδών. Τα καρκινικά κύτταρα με μειωμένα επίπεδα ALDH, δεν θα καταφέρουν να απομακρύνουν τις τοξικές αλδεΐδες και να προστατευτούν από το οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα να επέλθει η απόπτωση. Ενώ τα καρκινικά κύτταρα με αυξημένα επίπεδα ALDH θα οδηγήσουν στην μείωση της οξειδωτικής βλάβης, της παραγωγής ROS και τοξικών αλδευδών, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία και την ανοσολογική απόκριση . [23]

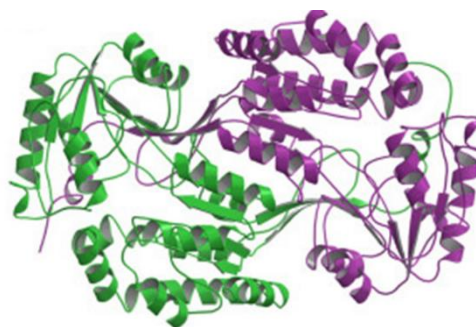
Οι ALDH πρωτεΐνες έχει φανεί ότι δρουν συνεργατικά, καθώς έπειτα από έρευνα από τους Gasparetto et al. ^[30] καταστολή της ALDH1A1 σε ποντίκια δεν συνοδεύτηκε από κάποια ιδιαίτερη αλλαγή στην φυσιολογία, υποδηλώνοντας την επικάλυψη της δράσης της από άλλα ένζυμα. Η επιβεβαίωση προήλθε έπειτα από πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα ALDH1A1^{-/-} ποντίκια και την παρατήρηση της ανεμπόδιστης δράσης των υπόλοιπων ALDH ισομορφών. Παρόλα αυτά, με την καταστολή της δράσης της ALDH3A1, τα ποντίκια εμφάνισαν παρόμοιο φαινότυπο με τα

ALDH1A1/3A1^{-/-} ποντίκια, υποδηλώνοντας πως η απουσία της λειτουργικής *ALDH3A1* μπορεί να αναπληρώνεται λειτουργικά από τις υπόλοιπες *ALDH*, όπως επίσης και η απουσία της *ALDH1A1*, μπορεί να επικαλύπτεται μερικώς από την δράση της *ALDH3A1*. Αυτό μπορεί να εξηγήσει και την ύπαρξη των πολλών ισομορφών της *ALDH* οικογένειας.

Η αυξημένη δράση των *ALDHs* μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά προβλήματα υγείας, όπως αυτής του καρκίνου. Έχει φανεί πως υψηλά επίπεδα *ALDH* εμφανίζονται συνήθως σε καρκινικά κύτταρα (καρκίνος του πνεύμονα, μαστού, εντέρου, παγκρέατος κ.α.)^[21,44], καθώς και σε φυσιολογικά ή καρκινικά βλαστικά κύτταρα^[21,22,23]. Η αύξηση της έκφρασης των *ALDHs*, στα καρκινικά κύτταρα, προσφέρει αύξηση της επιβίωσης και προστασίας τους από τις οξειδωτικές μορφές αλδεϋδών που παράγονται κατά το οξειδωτικό στρες και οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Με την αυξημένη δράση των *ALDH* τα καρκινικά κύτταρα καταφέρνουν να οξειδώνουν αυτές τις μορφές των αλδεϋδών και να αποτρέπουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (Εικόνα 7)^[21,22,23]. Οι κυριότερες ισομορφές που συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου αποτελούν τις *ALDH1A*, *ALDH3A1*, *ALDH18A1*, *ALDH5A1* και *ALDH7A1*^[23]. Από αυτές οι *ALDH1A1*, *ALDH1A3* και *ALDH3A1* φαίνεται να έχουν αυξημένη δράση και λειτουργία ιδιαίτερα στα καρκινικά κύτταρα που φέρνουν χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες βλαστικών καρκινικών κυττάρων^[21,22,25,26]. Ωστόσο, η αυξημένη έκφραση της κάθε ισομορφής *ALDH* σχετίζεται με τον κάθε τύπο καρκίνου, χωρίς όμως να καθορίζει πως όλοι οι τύποι καρκίνου θα εμφανίσουν αυξημένη έκφραση των *ALDHs*^[21]. Όπως φάνηκε από την έρευνα των Qu et al. στον καρκίνο του στόματος παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση της *ALDH3A1* σε αντίθεση με άλλους τύπους καρκίνων^[31]. Στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων έχει παρατηρηθεί κυρίως η υπερέκφραση των *ALDH1A1* και *ALDH3A1* σε σύγκριση με τις υπόλοιπες *ALDHs*^[27].

1.2.1. Η δράση της ALDH3A1 και η λειτουργία της στα διάφορα καρκινικά είδη

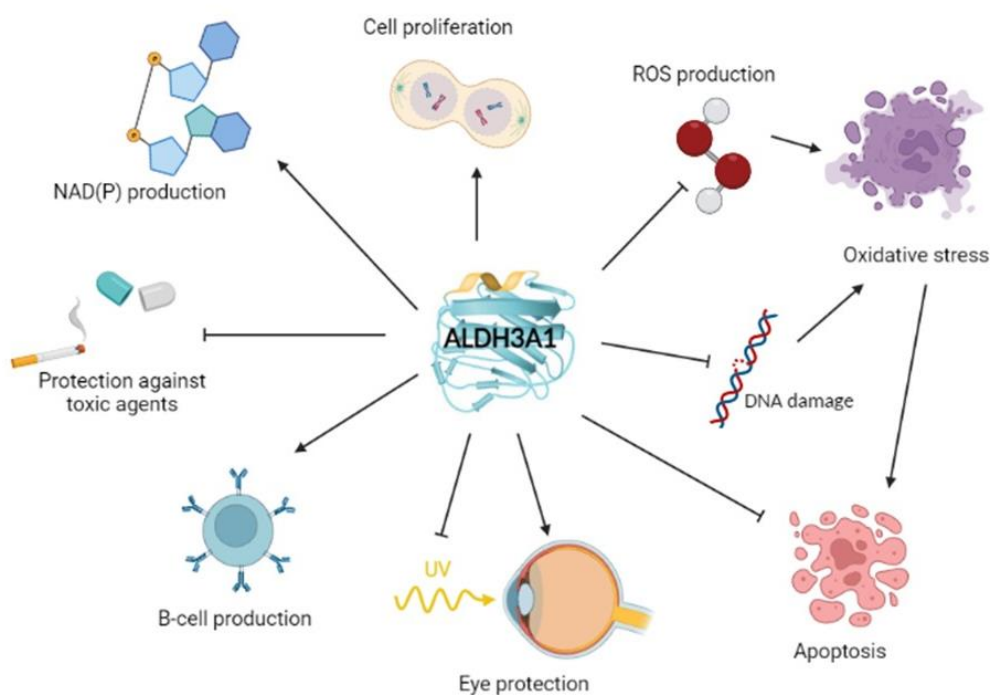
Η ALDH3A1 είναι μία ομοδιμερή πρωτεΐνη (Εικόνα 8) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στον άνθρωπο και εκφράζεται κυρίως στο κυττόσολιο των κυττάρων συμμετέχοντας στην οξείδωση των αρωματικών και αλειφατικών αλδεϊδών στα αντίστοιχα καρβοξυλικά τους οξέα, χρησιμοποιώντας τα NAD και NADP ως συνένζυμο^[21,39]. Το ένζυμο αναφέρεται, επίσης, ως κρυσταλλίνη του κερατοειδούς στα θηλαστικά, καθώς αποτελεί το 10-40% της συνολικής υδατοδιαλυτής πρωτεΐνης του κερατοειδούς τους^[32]. Η δράση της ALDH3A1 στον κερατοειδή, αλλά και στους υπόλοιπους ιστούς που εκφράζεται φυσιολογικά, όπως στους ιστούς των πνευμόνων, του στομάχου και του επιθηλίου^[36,44], είναι σημαντική για την άμυνα των κυττάρων και την διατήρηση της ομοιόστασης κατά το οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, έχει φανεί πως αυξημένα επίπεδα ALDH3A1 προστατεύουν τα κύτταρα του κερατοειδούς από την δράση του 4-HNE. Το 4-HNE αποτελεί μία πολύ αντιδραστική και κυτοτοξική αλδεΐδη, παραγόμενη από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (lipid peroxidation, LPO), η οποία επάγεται από την ακτινοβολία UV. Η ALDH3A1 οξειδώνει το 4-HNE στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ (4-hydroxy-2-nonenic acid, 4-HNA), προστατεύοντας τα κύτταρα από απόπτωση^[32,35]. Επιπλέον, η ALDH3A1 ελαττώνει την δράση των ROS κατά την οξειδωτική αντίδραση^[30,38], την βλάβη του DNA και την απόπτωση^[37] και συμμετέχει στην προστασία των κυττάρων από



Εικόνα 8 Δομή της ανθρώπινης ALDH3A1. Αναπαράσταση της συνολικής δομής της διμερούς ανθρώπινης ALDH3A1 με κάθε μονομερές ξεχωριστά χρωματισμένο [39].

τοξικούς παράγοντες, όπως τον καπνό του τσιγάρου [36]. Συμμετέχει στην αιμοποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (hematopoietic stem cells, HSCs)[30], στην παραγωγή NAD(P) συμμετέχοντας στην διατήρηση της γλουταθειόνης[44], ενώ φέρει και λειτουργίες που ομοιάζουν με αυτές των chaperones, όπως φάνηκε από την μελέτη των Voulgaridou et al.[34]. Απώλεια λειτουργίας της ALDH3A1 έχει φανεί πως επηρεάζει την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων πιθανότατα μέσω της συσσώρευσης κυτοτοξικών αλδεϋδών[21,44].

Επιπλέον, η ALDH3A1 φάνηκε να επηρεάζει και το ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω της επίδρασης στην ανάπτυξη των Β- λεμφοκυττάρων[30] και μέσω της αλλαγής της ικανότητας κυττάρων να εκφράζουν ανοσοκατασταλτικές και ανοσοδιεγερτικές κυτοκίνες[26]. Για την ακρίβεια, οι Terzuoli et al.[26] μελετώντας την ανοσία των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα παρατήρησαν πως η αυξορρύθμιση της ALDH3A1 οδηγούσε σε αύξηση των ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών όπως IL-6 και IL-13 και μείωση των ανοσοδιεγερτικών κυτοκινών όπως IFN γ και IL-12/23.



Εικόνα 9 Δράση της ALDH3A1 στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Η ALDH3A1 φάνηκε πως συμμετέχει στην προστασία των κυττάρων κατά το οξειδωτικό στρες και απόπτωση, μέσω της δράσης της έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου και της βλάβης στο DNA [30,37,38]. Επιπλέον προστατεύει το κύτταρο από τοξικούς παράγοντες που μπορούν να προκύψουν από την εισπνοή καπνού (τσιγάρου ή καυσαερίων) και κάποιες φαρμακευτικές ουσίες [36,38], καθώς και από τις ακτίνες UV που εισέρχονται στο εσωτερικό του ματιού [32,35]. Η συμμετοχή του ενζύμου είναι, επίσης, σημαντική και για την παραγωγή του συμπαραγόντα NAD(P) καθώς και για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [38,44]. Η δράση της ALDH3A1 εμφανίζεται και στο ανοσοποιητικό σύστημα, με την συμμετοχή στην παραγωγή β λεμφοκυττάρων, όπως και ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών [26,30]. [Η εικόνα δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας την εφαρμογή BioRender.com].

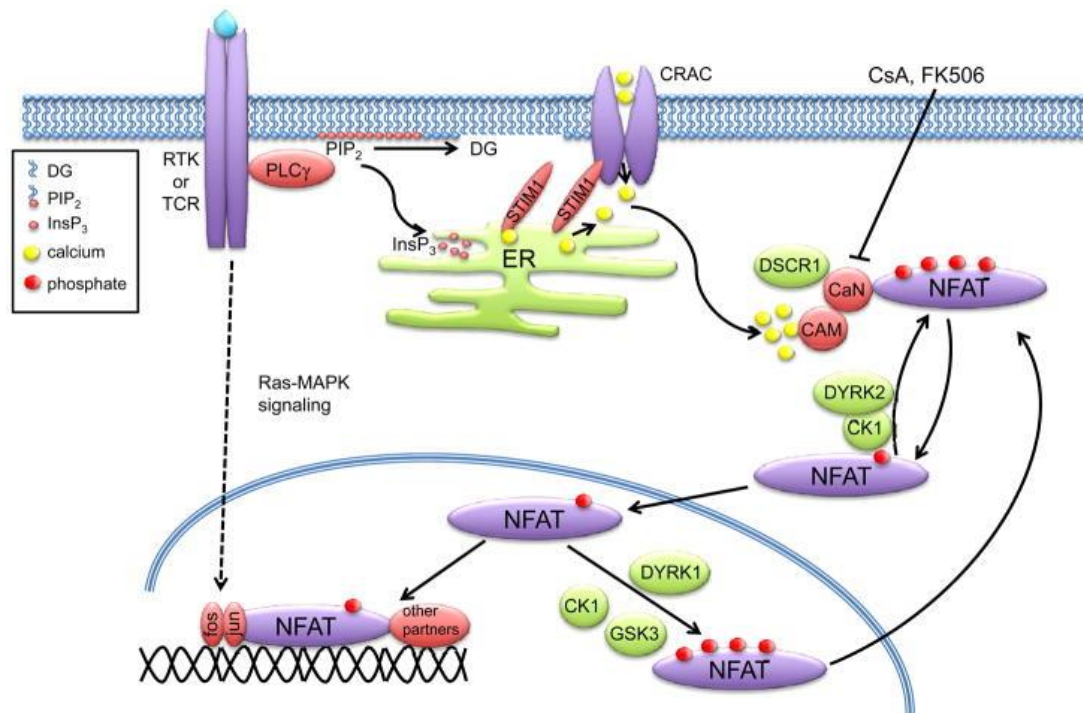
Εφόσον η δράση της ALDH3A1 είναι τόσο σημαντική στην αντιοξειδωτική προστασία^[32,35,38], στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου^[30,31,37] και στη διατήρηση της ομοιόστασης^[32,35,38] στα φυσιολογικά κύτταρα, ήταν επακόλουθο να ελεγχθεί η δράση της στην καρκινογένεση. Η ALDH3A1, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, φαίνεται να υπερεκφράζεται στους περισσότερους τύπους καρκίνου, χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα, όπως στην περίπτωση του καρκίνου του στόματος^[31]. Παρόλα αυτά, η χρήση της ALDH3A1 ως καρκινικό βιοδείκτη φάνηκε να απασχόλησε αρκετούς επιστήμονες, με τους Kim et al. (2007)^[45] να αποδεικνύουν πως η ALDH3A1 μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη για τον καρκίνο του πνεύμονα. Επιπλέον, καθώς η ALDH3A1 συμμετέχει και στην αύξηση και διαφοροποίηση των φυσιολογικών αλλά και καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs), προτάθηκε μαζί με την ALDH1A1, και ως βιοδείκτης για την ανίχνευση των CSCs^[22,26,30,33]. Σημαντική φαίνεται να είναι και η δράση της στην εξέλιξη και μετάσταση του καρκίνου, όπως φάνηκε στις μελέτες των Yan et al.^[33] για τον καρκίνο του προστάτη, και των Terzuoli et al.^[26] και Fan et al.^[40] για τον καρκίνο του πνεύμονα. Μία όμως από τις πιο καλά μελετημένες λειτουργίες που παρουσιάζει η ALDH3A1, όπως και άλλες ισομορφές της ALDH οικογένειας, είναι η ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα που εμφανίζουν τα κύτταρα με υψηλή έκφραση στην ALDH3A1. Το ένζυμο αυτό μέσω της ικανότητας του να μεταβολίζει τοξικές αλδεΐδες που προκύπτουν από χημειοθεραπευτικά φάρμακα, προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα προστασία έναντι ουσιών όπως γεμισιταβίνη^[25,28,29], 5-FU^[25,27], δοξορουβικίνη^[25], μαμφοσφαμίδη^[42], ετοποσίδη^[25], σισπλατίνη^[41] και 4-υδροξυυπεροξυκυκλοφοσφαμίδη (4-HNE)^[25,43], που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία πολλών ειδών καρκίνων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν, χτίζοντας ανοσία στις οξειδωτικές συνθήκες που προκύπτουν κατά την χημειοθεραπεία^[21-23,26].

Όσον αφορά την δράση της ALDH3A1 στο καρκίνο του παγκρέατος δεν έχουν υπάρξει αρκετές μελέτες για την δράση της. Οι Zhou et al.^[46] έδειξαν από τα πειράματά τους υψηλά επίπεδα της ALDH3A1 σε δείγματα παγκρεατικού καρκίνου, ενώ από τις μελέτες των Liu et al.^[47] φάνηκε πως η ALDH3A1 εμφάνιζε μεταλλάξεις σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο. Ακόμη, με τη συμβολή των Duong et al.^[27] και Matsumoto et al.^[28] απεδείχθη πως η ALDH3A1 συμμετέχει στην ανθεκτικότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως 5-FU και γεμισιταβίνη^[27,28].

1.3. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT και η δράση τους στην εξέλιξη του καρκίνου

Οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες ενεργών T-λεμφοκυττάρων (Nuclear factor of activated T-cells, NFAT) αποτελούνται από πέντε μέλη, με τον NFAT5 να θεωρείται ο παλαιότερος^[48]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα των B-, T-λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κύτταρων^[58]. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως συμμετέχουν και στο σχηματισμό των βαλβίδων της καρδιάς, στην καρδιακή υπερτροφία^[49], στον πολλαπλασιασμό των β παγκρεατικών κυττάρων^[50], στην εξέλιξη του καρκίνου^[51], καθώς και στην αντοχή στα φάρμακα σε διάφορα είδη καρκίνων^[58,59].

Όλα τα μέλη της οικογένειας NFAT, εκτός από τον NFAT5, ρυθμίζονται από το μονοπάτι Ca^{2+} /καλσινευρίνης. Συγκεκριμένα, οι NFAT1-4 βρίσκονται σε ανενεργή μορφή στο κυτοσόλιο των T λεμφοκυττάρων, που βρίσκονται σε ηρεμία, έχοντας φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης στο μόριό τους. Κατά την διέγερση των κυττάρων ενεργοποιείται το μονοπάτι Ca^{2+} /καλσινευρίνης κατά το οποίο αυξάνονται τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ιόντων Ca^{2+} με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η καλσινευρίνη. Αυτή με την σειρά της αποφωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα σερίνης και οι NFAT1-4, ενεργοποιούνται και μετακινούνται στον πυρήνα για την μεταγραφή γονιδίων όπως των κυτοκινών IL-3, IL-4, IL-10, GM-CSF και IFN- γ ^[48,49]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT δεσμεύονται στο DNA σχηματίζοντας ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και πιο συχνά αλληλεπιδρούν με τις περιοχές σύνδεσης DNA άλλων μεταγραφικών παραγόντων (όπως AP-1, EGFR, MEF2 που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση κυττάρων) ώστε να εξασφαλιστεί η ισχυρότερη δέσμευση τους. Η επαναφωσφορυλίωση των NFAT από κινάσες όπως η κινάση σύνθεσης γλυκογόνου (glycogen synthase kinase 3, GSK-3), η καζεϊνική κινάση 1 (Casein kinase 1, CK1) και η διπλής ειδικότητας κινάση ρυθμιζόμενη από φωσφορυλίωση τυροσινών 1 (dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases 1, DYRK1) σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση της καλσινευρίνης, οδηγεί στην μεταφορά των NFAT από τον πυρήνα στο κυτοσόλιο και στον τερματισμό της ρυθμιζόμενης από τους NFAT μεταγραφής γονιδίων^[60].



Εικόνα 10 Σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης των NFAT1-4. Η ενεργοποίηση των NFAT1-4 γίνεται μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης των ιόντων Ca²⁺ στο εσωτερικό του κυττάρου. Συγκεκριμένα, ανοσοϋποδοχείς (όπως οι T cell receptors, TCR) και υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Receptor, Tyrosine Kinases, RTKs) ενεργοποιούν την φωσφολιπάση C (phospholipase C, PLCγ), η οποία υδρολύει τη φωσφατιδυλοδιφωσφορική ινοσιτόλη (phosphatidylinositol (PI)-4,5-bisphosphate, PIP₂) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol-1,4,5-trisphosphate, IP₃) και διακυλογλυκερόλη (diacylglycerole, DAG). Στη συνέχεια, η IP₃ συνδέεται στον υποδοχέα της IP₃ (IP₃ receptor, IP₃R) στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmatic reticulum, ER), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων Ca²⁺ στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μείωση των ιόντων Ca²⁺ στο ER γίνεται αισθητή από τις πρωτεΐνες STIM1 (stromal interaction molecule 1), οι οποίες ενεργοποιούν τα κανάλια CRAC στην κυτταρική μεμβράνη και οδηγούν στην είσοδο περαιτέρω ιόντων Ca²⁺ στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα ιόντα Ca²⁺, με τη σειρά τους, συνδέονται και ενεργοποιούν την καλμοδουλίνη (calmodulin, CAM) και αποτελεσματικά και άλλα ένζυμα που εξαρτώνται από αυτήν, όπως την καλσινευρίνη (calcineurin, CaN). Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης στο μόριο των NFAT και τους ενεργοποιεί, οδηγώντας τους να μετακινηθούν στο εσωτερικό του πυρήνα. Εκεί αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τα συστατικά του ετεροδιμερούς μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (Fos και Jun), η ενεργοποίηση των οποίων μπορεί να γίνει μέσω του μονοπατιού ERK. Το σύμπλοκο NFAT:AP1 συνδέεται με συγκεκριμένα, για αυτά, στοιχεία του DNA και οδηγούν στην μεταγραφή γονιδίων στόχων. Η επαναφωσφορυλίωση των παραγόντων NFAT από κινάσες όπως οι GSK-3, CK1 και DYRK1, οδηγεί στην έξοδο του μορίου από τον πυρήνα και στον τερματισμό της σηματοδότησης του μονοπατιού της καλσινευρίνης. Ακόμη, η δράση της καλσινευρίνης μπορεί να ανασταλεί και από ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως η κυκλοσπορίνη A (cyclosporin A, CsA) και το FK506, καθώς επίσης και από αρνητικούς ρυθμιστές της που βρίσκονται φυσικά στο κύτταρο, όπως ο DSCR1 (Down syndrome candidate region 1). Τα ιόντα Ca²⁺ θα απομακρυνθούν από το εσωτερικό του κυττάρου προς το εξωτερικό του ή προς το ER μέσω ATP αντλιών Ca²⁺, οδηγώντας στο τερματισμό της σηματοδότησης.

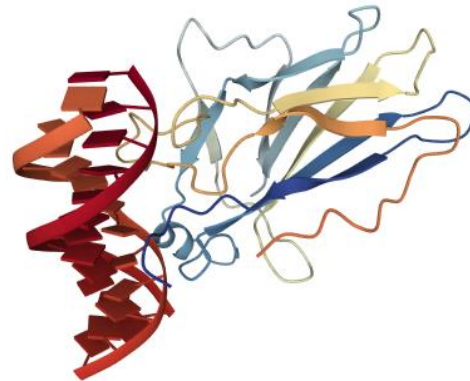
Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT εμφανίζουν σημαντικές λειτουργίες στην εξέλιξη του καρκίνου, με την κάθε ισομορφή της οικογένειας να εμφανίζει διαφορετικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, έχει φανεί πως ο NFAT1 (ή αλλιώς NFATc2) δρα ως ογκοκαταστολέας σε αντίθεση με τον NFAT2 (ή αλλιώς NFATc1) που δρα ως ογκογονίδιο. Αυτό φάνηκε από μελέτες σε ινοβλάστες όπου ο NFATc2 οδηγούσε σε

διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση, ενώ ο NFATc1 συμμετείχε στον πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό των ινοβλαστών. Παρόλα αυτά, έρευνες έδειξαν πως ο NFATc2, όπως και οι NFATc1 και NFAT5, επάγουν την μετάσταση και διήθηση (εκτός του NFAT5) των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ακόμη, ο NFATc1 συμμετέχει και στην ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής αδράνειας στα βλαστικά κύτταρα. Επιπλέον, σημαντικό στάδιο για την εξέλιξη του καρκίνου αποτελεί και η αγγειογένεση που περιλαμβάνει τα στάδια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετάστασης και διαφοροποίησης, όπου όπως φάνηκε από την διπλή σίγηση των NFAT3/4 σε ποντίκια, το μονοπάτι καλσινευρίνης-NFAT εμφανίζει σημαντικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα με την ενεργοποίηση του αγγειακού αυξητικού ενδοθηλιακού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξάνονται τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το μονοπάτι καλσινευρίνης-NFAT^[59]. Τέλος, σίγηση του NFATc2 και NFATc1 οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα στον καρκίνο του μαστού και του παγκρέατος ^[59,60].

Η δράση των NFAT στον πολλαπλασιασμό, την μετάσταση και την διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων μπορεί να περιορισθεί μέσω σίγησης του μονοπατιού της καλσινευρίνης με αναστολείς. Δύο από τους πιο καλά μελετημένους αναστολείς αποτελούν οι ανασοκαταστολείς κυκλοσπορίνη A (cyclosporine a, CsA) και FK506, που χρησιμοποιείται και για την αναστολή του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τις μεταμοσχεύσεις οργάνων ^[50,53,59,60]. Και οι δύο αναστολείς παρεμβαίνουν στην ενεργοποίηση της καλσινευρίνης και παρεμποδίζουν την πυρηνική μεταφορά του NFAT. Παρόλα αυτά, με τη συνεχή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος σε ασθενείς, φάνηκε πως η εξέλιξη και η μετάσταση του καρκίνου επισπεύδεται, καθώς εκτός από την μείωση της αντίστασης του ανοσοποιητικού συστήματος, υπάρχουν και άλλοι στόχοι της καλσινευρίνης που ρυθμίζουν την εξέλιξη του καρκίνου, όπως τον πολλαπλασιασμό. Για αυτό τον λόγο η θεραπεία που θα πρέπει να ακολουθηθεί κατά του NFAT θα πρέπει να είναι πιο συγκεκριμένη προς τα καρκινικά κύτταρα που αποτελούν στόχους του μεταγραφικού παράγοντα. Άλλοι αναστολείς των NFAT που έχουν μελετηθεί αποτελούν το πεπτιδίο VIVIT που μπλοκάρει την αποφωσφορυλίωση και μετακίνηση του NFAT προς τον πυρήνα, τον L-732531 που αποτελεί ανάλογο του FK506 και τον ISATX47, ανάλογο της CsA. Επιπλέον ο DSCR1 αποτελεί ενδογενή αναστολέα του μονοπατιού NFAT, αναστέλοντας την λειτουργία της καλσινευρίνης. Η χρήση φαρμάκων που θα στόχευε στην αλληλεπίδραση του DSCR1 και της καλσινευρίνης θα πετύχαινε την παρεμπόδιση της αποφωσφορυλίωσης του NFAT με αποτέλεσμα και την παρεμπόδιση της δράσης του. Τελικά, οποιαδήποτε θεραπεία κατά του NFAT θα πρέπει να έχει λάβει υπόψη όλες τις λειτουργίες που εμφανίζει η οικογένεια του μεταγραφικού παράγοντα στα καρκινικά κύτταρα, ενώ σημαντική είναι η στοχευμένη παρεμπόδιση ισομορφών της οικογένειας, ανάλογα με τον τύπο καρκίνου που εξετάζεται. ^[60]

1.3.1. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFATc1 και η σύνδεσή του με την ALDH3A1

Ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT2 ή αλλιώς NFATc1 ρυθμιζόμενος από το μονοπάτι Ca^{2+} /καλσινερίνης έχει φανεί πως έχει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων και σε περίπτωση απουσίας του, έμβρυα ποντικών οδηγούνται σε πρόωρο θάνατο^[52]. Πέραν της δράσης του στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, ο NFATc1 συμμετέχει και σε διαδικασίες της φυσιολογικής λειτουργίας του παγκρέατος, όπως την ανάπτυξη, την ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό των

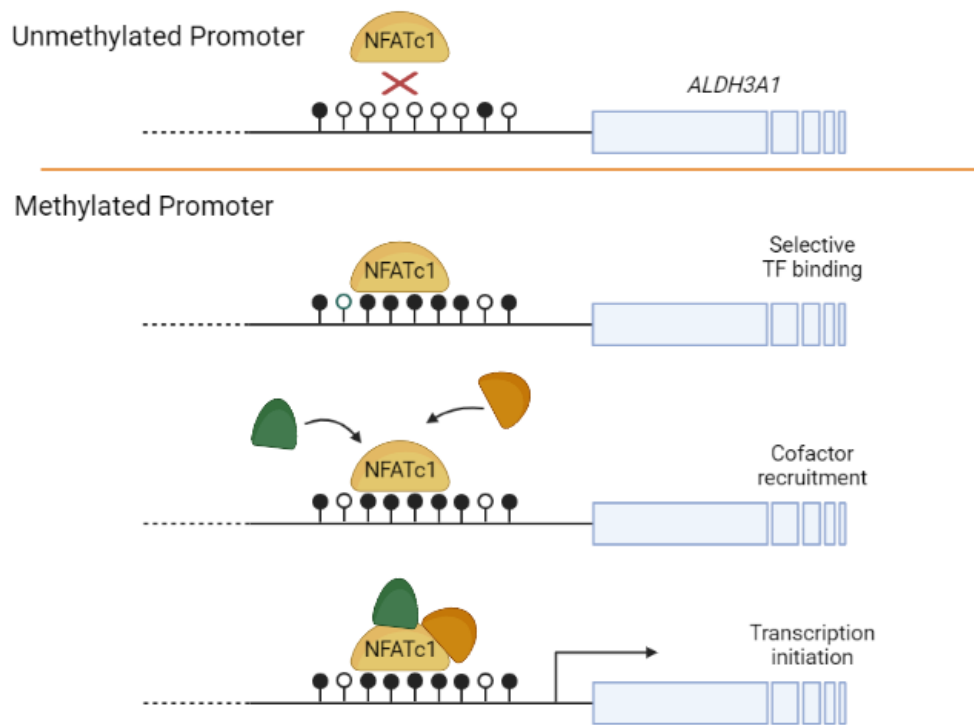


Εικόνα 11 Δομή του ανθρώπινου μεταγραφικού παράγοντα NFATc1. Αναπαράσταση του μεταγραφικού παράγοντα NFATc1 σε σύνδεση με την διπλή έλικα του DNA.

β κυττάρων^[50,53], καθώς και σε μη φυσιολογικές λειτουργίες, όπως την ανάπτυξη των PanIN και εν συνεχεία του PDAC^[54,55]. Συγκεκριμένα, οι Goodyer et al.^[53] έδειξαν πως τα επίπεδα mRNA του NFATc1 ήταν κατά 50% υψηλότερα σε νησίδες παγκρεατικών κυττάρων την 10^η – 15^η μέρα μετά την γέννηση των ποντικών σε σύγκριση με τα ώριμα ποντίκια, αποδεικνύοντας τη ρυθμιζόμενη δράση του NFATc1 από τα αναπτυξιακά στάδια. Επίσης, από τα πειράματά τους φάνηκε πως ο NFATc1 κωδικοποιεί για ρυθμιστές του κύκλου των β – παγκρεατικών κυττάρων, ενώ οι Heit et al.^[57] έδειξαν πως σίγηση του NFATc1 στο πάγκρεας ποντικών οδήγησε σε μειωμένη σύνθεση και έκκριση ινσουλίνης, καθώς και σε εμφάνιση διαβήτη τύπου 2 σε ποντίκια 12 βδομάδων. Επιπλέον, οι Goodyer et al.^[53] παρατήρησαν ένα αυτορρυθμιζόμενο μονοπάτι του NFATc1, όπου η προσθήκη παραγόντων που διεγείρουν τον πυρηνικό εντοπισμό και τη δραστηριότητα του NFATc1 είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του NFATc1 mRNA σε παγκρεατικά κύτταρα ποντικών.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NFATc1 εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα στο PDAC, όπως φάνηκε και από μελέτες σε ανθρώπινες βιοψίες^[55,60], προάγοντας την εξέλιξή του μέσα από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την αγγειογένεση^[59,60]. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα NFATc1 σχετίζονται με κακή κλινική εικόνα των ασθενών που πάσχουν από παγκρεατικό καρκίνο, ενώ υποβοηθούν την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα^[59]. Η έλλειψη του NFATc1 μπορεί να καθυστερήσει την ανάπτυξη των PanIN και να επάγει την έκφραση της *Cdkn1a* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21 που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου^[54].

Ενδιαφέρον εμφάνισε η έρευνα των Wu et al.^[56] κατά την οποία οι ερευνητές μελέτησαν την διαφορετική έκφραση γονιδίων κατά την σίγηση του μεταγραφικού παράγοντα NFATc1 σε κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου. Από τα πειράματά τους φάνηκε πως από το σύνολο των γονιδίων τα οποία εμφάνισαν μείωση της λειτουργικότητας τους λόγω της σίγησης του μεταγραφικού παράγοντα, τρία από αυτά, συμπεριλαμβανομένου της ALDH3A1, παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση στην περιοχή των υποκινητών τους σε ιστούς PDAC σε σύγκριση με υγιείς ιστούς. Όπως έδειξαν στην συνέχεια με την μελέτη της ALDH1A3, η υπερμεθυλίωση οδηγεί τον μεταγραφικό παράγοντα στην υπερέκφραση του γονιδίου *aldh1a3* άρα και την συσσώρευση της πρωτεΐνης του. Επομένως το ίδιο ίσως να ισχύει και για την ALDH3A1. Αναμφισβήτητα πάντως τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως υπάρχει μία σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα NFATc1 και της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης ALDH3A1 (Εικόνα 12).



Εικόνα 12 Πιθανή σχέση του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1 με το γονίδιο της ALDH3A1. Στα καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα φάνηκε πως ο υποκινητής του γονιδίου της ALDH3A1 υπερμεθυλιώνεται σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτή η υπερμεθυλίωση πιθανώς να οδηγεί τον μεταγραφικό παράγοντα NFATc1 να αλληλεπιδρά με τον υποκινητή του γονιδίου και με την βοήθεια και άλλων συμπαραγόντων να οδηγεί στην μεταγραφή του γονιδίου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του γονιδίου *aldh1a3*. [56] [Η εικόνα δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Biorender.com].

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αφορά την μελέτη της υπερέκφρασης της ALDH3A1 στα κύτταρα του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Συγκεκριμένα, θελήσαμε να ελέγξουμε την επιρροή που εμφανίζει το ένζυμο αυτό στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αρχικά με την μερική αναστολή της έκφρασης του και στη συνέχεια με την ολική καταστολή της μέσω της μεθόδου CRISPR/Cas9 και και εν συνεχεία μέτρηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των επιμολυσμένων κυττάρων. Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1 στην έκφραση της ALDH3A1, για την οποία σχέση δεν έχουν υπάρξει ακόμα βιβλιογραφικές αναφορές. Για το σκοπό αυτό έγινε καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα σε δύο κυτταρικές σειρές PDAC ακολουθώντας την μέθοδο της CRISPR/Cas9, και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ALDH3A1, καθώς και η πολλαπλασιαστική ικανότητα των επιμολυσμένων κυττάρων.

3. Μέθοδοι

3.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Για τα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές AsPC-1 και Suit2-020 που αφορούν κύτταρα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος και αναπτύσσονται σε μονόστιβες καλλιέργειες. Και οι δύο κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν στους 37 °C με 5-6% CO₂, σε στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την σειρά AsPC-1 αποτελεί το RPMI-1640, ενώ για την κυτταρική σειρά Suit2-020 χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο το DMEM, με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% P/S (Penicillin/ Streptomycin) και για τις δύο κυτταρικές σειρές, σύμφωνα με τις οδηγίες του American Type Culture Collection, ATCC. Οι κυτταρικές σειρές ανακαλλιεργούνταν (passaged) όταν τα κύτταρα καλύπταν το 70-80% της επιφάνειας των φιαλών καλλιέργειας (confluent 70-80%), δηλαδή κάθε 72 ώρες για τα AsPC-1 σε αναλογία 1:4 – 1:6 και κάθε 48 ώρες για τα Suit2-020 σε αναλογία 1:6 – 1:8. Για την ανακαλλιέργεια χρησιμοποιούταν διάλυμα Θρυψίνης/EDTA (0,05%) σύμφωνα με τις οδηγίες του ATCC. Το μέτρημα των κυττάρων για την καλλιέργειά τους σε πιάτα καλλιιεργειών 6 και 96 πηγαδιών (6-well και 96 well plates) γινόταν χειροκίνητα με Neubauer improved cell counting chamber και την βαφή τους με Trypan Blue Stain (0,4%).

3.2. Εξαγωγή πρωτεϊνών και μέθοδος BCA για ποσοτικοποίηση

Για την εξαγωγή και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε πιάτα καλλιιεργειών 6 well plates με πυκνότητα $0,3 \times 10^6$ κύτταρα ανά πηγάδι για 72 ώρες, μέχρι να καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας, στους 37 °C και 5-6% CO₂, σε στείρες συνθήκες. Μετά το πέρας των 72 ωρών, τα κύτταρα ξεπλένονταν δύο φορές με 2 mL PBS σε πάγο, σε μη στείρες συνθήκες, και πραγματοποιούταν λύση χρησιμοποιώντας 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer). Για την παρασκευή του Lysis Buffer, παρασκευαζόταν αρχικά το Lysis Buffer Stock το οποίο διατηρούταν στους 4°C και χρησιμοποιούταν κάθε φορά για την παρασκευή του lysis buffer (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Συστατικά των Lysis Buffer Stock και Lysis Buffer που χρησιμοποιήθηκαν για την λύση των κυττάρων.

Lysis Buffer Stock	Lysis Buffer
20 mM Tris-HCL (pH 7,5)	1 mM PMSF
150 mM Sodium chloride	1 mM Sodium Orthovanadate
1% Triton-X-100	5 µg/mL Leupeptin
10 mM Sodium fluoride	10 µg/mL Aprotinin
1 mM EDTA (pH 8)	3 µg/mL Pepstatin
ddH ₂ O	lysis buffer stock

Με τη χρήση κυτταρικής ξύστρας, τα κύτταρα αποκολλούνται από την επιφάνεια των πηγαδιών και μεταφέρονταν σε 1,5 mL Eppendorf tubes. Στη συνέχεια τα διαλύματα επωάζονταν για 30 λεπτά σε πάγο, και αναδεύονταν σε δίνη (vortex) κάθε 10 λεπτά. Ακολουθούσε, η φυγοκέντρηση των διαλυμάτων σε 14.000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφερόταν με προσοχή σε καινούργιους 1,5 mL Eppendorf tubes, χωρίς να διαταράσσεται το ίζημα, το οποίο πετιόταν. Στο τέλος, τα κυτταρικά λύματα και 1,5 mL από το lysis buffer αποθηκεύονταν στους -20 °C.

Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των lysates πραγματοποιούνταν η μέθοδος BCA (Pierce BCA Assay) (bicinchoninic acid, BCA), χρησιμοποιώντας το Pierce BCA Protein Assay Kit. Τα πρότυπα διαλύματα της μεθόδου (bovine serum albumin, BSA, standarts) ετοιμάζονταν σύμφωνα με τον Πίνακα 2, μία φορά, και επαναχρησιμοποιούνταν σε κάθε επανάληψη του πειράματος, μέχρι να θεωρηθούν αναξιόπιστα. Τα protein lysates διαλύονταν σε αναλογία 1:2 σε lysis buffer και 10 µL του μείγματος μεταφερόταν σε πιάτο BSA (BSA plate), δύο φορές (duplicates) για το κάθε δείγμα. Παρομοίως, 10 µL από τα BSA standards μεταφέρονταν στο πιάτο, δύο φορές για το κάθε standard. Πριν την μεταφορά των δειγμάτων στα πιάτα, πραγματοποιούνταν η ετοιμασία του working reagent σε αναλογία 1:50, σε σωλήνα προστατευόμενο από το φως, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, ώστε 200 µL από αυτό να μεταφερθούν σε κάθε πηγαδάκι. Η προσθήκη του working reagent στα

Πίνακας 2 Προετοιμασία των πρότυπων αραιωμένων διαλυμάτων bovine serum albumin (BSA)

**Σχέδιο αραιώσης για τυπικό πρωτόκολλο με test tube και διαδικασία microplate
(Εύρος εργασίας = 20–2,000 µg/mL)**

Φιαλίδιο	Όγκος Πρότυπου Διαλύματος (µL)	Όγκος και Πηγή BSA (µL)	Τελική Συγκέντρωση BSA (µg/mL)
A	0	300 του Stock	2000
B	125	375 του Stock	1500
C	325	325 του Stock	1000
D	175	175 του φιαλιδίου B	750

E	325	325 του φιαλιδίου C	500
F	325	325 του φιαλιδίου E	250
G	325	325 του φιαλιδίου F	125
H	400	100 του φιαλιδίου G	25
I	400	0	0 = Blank

δείγματα έπρεπε να γίνει σχετικά γρήγορα, προκειμένου για όλα τα δείγματα η αντίδραση να ξεκινήσει παρόμοια ώρα. Το πιάτο σφραγιζόταν καλά με προστατευτική μεμβράνη προς αποφυγή ανάμειξης των δειγμάτων και μεταφερόταν στους 37 °C σε shaker σε 50 rpm για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια επωαζόταν για 30 λεπτά στους 37 °C. Στο τέλος, έπρεπε να επιβεβαιωθεί η απουσία φυσαλίδων που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα. Στην περίπτωση φυσαλίδων πραγματοποιούταν μία μικρή φυγοκέντρηση του πιάτου για 1-2 λεπτά. Η απορρόφηση μετρίοταν σε A562 και μία πρότυπη καμπύλη δημιουργούταν κάθε φορά, σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις των standards. Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) έπρεπε να είναι πάνω από 0,98 προκειμένου να γίνουν αποδεκτές οι συγκεντρώσεις. Τα cell lysates και τα standards αποθηκεύονταν στους -20 °C στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

3.3. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανίχνευση τους με Western Blot

Έπειτα από την εύρεση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (protein lysates) με την BSA assay ακολούθησε η ανίχνευση των πρωτεϊνών με την μέθοδο του SDS-PAGE και Western Blot. Τα συστατικά των ρυθμιστικών διαλυμάτων και του gel που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα φαίνονται στους Πίνακες 3 και 4. Αρχικά, παρασκευάστηκε το gel πολυακρυλαμίδης (1 mm) που συνίσταται από 10% πηκτή διαχωρισμού και 5% πηκτή συσσώρευσης και χρησιμοποιήθηκε είτε άμεσα είτε αποθηκεύτηκε στους 4°C μέχρι 5 μέρες.

Πίνακας 3 Ρυθμιστικά διαλύματα των μεθόδων SDS - PAGE και Western Blot.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Τελική Συγκέντρωση
1.5 M Tris, pH 6.6	
<i>Trizma hydrochloride</i>	1.5 M
<i>Add up with ddH₂O</i>	

1.5 M Tris, pH 8,8

Trizma base

1.5 M

Add up with ddH₂O**Anode buffer I**

Trizma base

300 mM

Methanol

20 % (v/v)

Add up with ddH₂O**Anode buffer II**

Trizma base

25 mM

Methanol

20 % (v/v)

Add up with ddH₂O**Cathode buffer**

6 - Aminocaproic acid

40 mM

Methanol

20 % (v/v)

Add up with ddH₂O**SDS- polyacrylamide gel electroforesis (PAGE) running buffer (10 x)**

Trizma base

250 mM

Glycine

1.92 M

SDS

35 mM

Add up with ddH₂O**SDS-PAGE running buffer (1x)**

10 x SDS-PAGE running buffer

100 mL SDS – Page running buffer (10x)

Add up with ddH₂O

Add up to 1L

4x Laemmli sample buffer

Dithiotheitol (DTT)

100 µL

Laemmli sample buffer

900 µL

Tris buffered saline (TBS) (10 x), pH 7.6

Trizma hydrochloride

150 mM

Trizma base

50 mM

Sodium chloride

1.5 M

Add up with ddH₂O and autoclave

TBS-Tween (TBS-T) (1x), pH 7.6

10 x TBS

Tween20

Add up with ddH₂O**Blocking Buffer**

Skim milk powder

TBS-T x1

APS (10%)

APS

ddH₂O**SDS (10%)**

SDS

ddH₂O

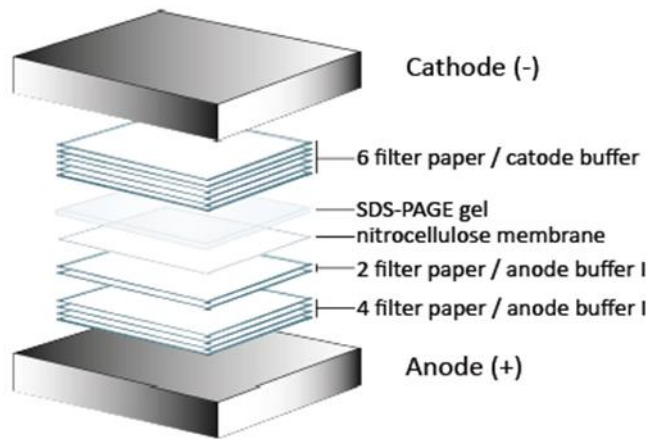
1x
0.1 %
5 g
100 MI
0.05 g
500 µL
5 g
50 mL

Πίνακας 4 Συστατικά gel πολυακρυλαμίδης (1 mm) με πηκτή συσσώρευσης 5% και πηκτή διαχωρισμού 10%

Αντιδραστήριο	Πηκτή Διαχωρισμού (10%)	Πηκτή Συσσώρευσης (5%)
1.5 M Tris (pH8.8)	1.25 mL	-
1.5 Tris (pH 6.6)	-	1.2 mL
Acrylamid/bisacrylamid (30%)	1.67 mL	0.83 mL
H ₂ O	2.0 mL	2.9 mL
SDS 10 %	50 µL	50 µL
APS 10 %	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Τα δείγματα αραιώθηκαν σε lysis buffer ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα συγκέντρωσης 20 µg σε τελικό όγκο 18-24 µL. Μετά την αραιώση των δειγμάτων, ακολούθησε η προσθήκη 6-8 µL Laemmil Buffer x4 και μετουσίωση των δειγμάτων στους 95 °C για 5 λεπτά. Ακολούθησε η φόρτωση του gel με τον ολικό όγκο (18-24 µL) των δειγμάτων και 15 µL του πρωτεϊνικού μάρτυρα (protein ladder) και αφήνοντας το gel να τρέξει για 25 λεπτά στα 75 V, οι πρωτεΐνες συσσωρεύονταν στην πηκτή συσσώρευσης και στη συνέχεια αυξάνοντας τα Volt στα 110 V για 90 λεπτά, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονταν περνώντας στην πηκτή διαχωρισμού.

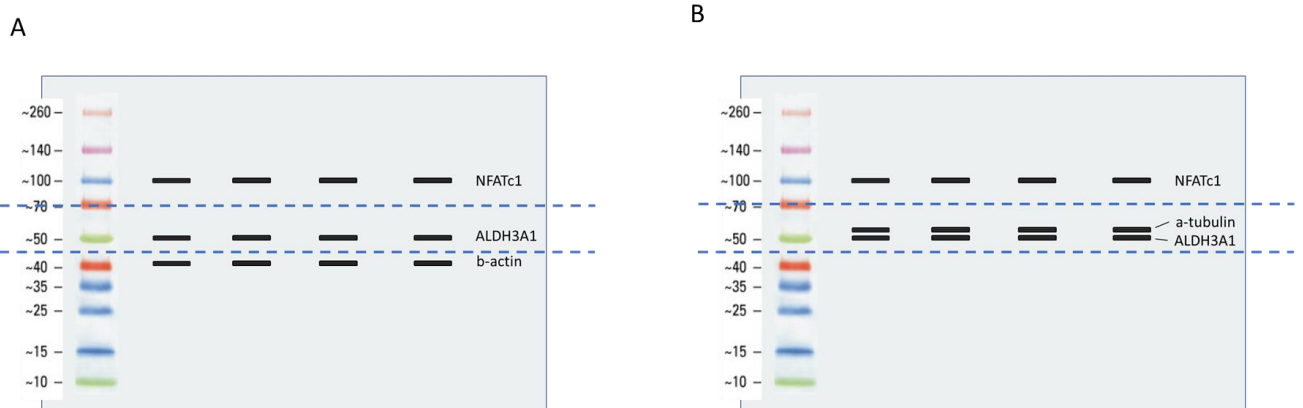
Στη συνέχεια το gel με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης 0,45 nm, χρησιμοποιώντας Whatman papers που είχαν επωαστεί στα ρυθμιστικά διαλύματα Anode buffer1, Anode buffer2 και Cathode buffer, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13**. Οι φυσαλίδες που δημιουργήθηκαν μεταξύ των χαρτιών,



Εικόνα 13 Western Blot, μεταφορά πρωτεϊνών. Παρουσίαση της μεταφοράς πρωτεϊνών από το gel στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και του πως στοιβάζονται οι μεμβράνες με τα Whatman papers.

απομακρύνθηκαν χρησιμοποιώντας έναν λεπτό σωλήνα και

ασκώντας μικρή πίεση προς την στοίβα των Whatman papers. Ακολούθως η μεμβράνη με τα Whatman papers μεταφέρθηκε σε 25 V και 1,0 A για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη που έφερε τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες απομονώθηκε και ξεπλύθηκε δύο φορές με TBS-T x1 για 5 λεπτά σε shaker με 50 rpm. Έπειτα, η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα σε blocking buffer σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ αναδεύονταν σε 50 rpm. Ακολούθησε, παρόμοιο ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T x1 δύο φορές και η μεμβράνη κοβόταν



Εικόνα 14 Αναπαράσταση του τρόπου όπου κόβεται η μεμβράνη προς ανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Α) Ως control χρησιμοποιείται η β-ακτίνη και η μεμβράνη κόβεται σε τρία κομμάτια για να διαχωριστούν οι τρεις πρωτεΐνες. Αρχικά κόβεται πάνω από τα 70 kDa για την απομόνωση του NFATc1 και στη συνέχεια μεταξύ των 40 kDa και 50 kDa ώστε να διαχωριστούν η ALDH3A1 και η β-ακτίνη. **Β)** Ως control χρησιμοποιείται η α-τουμπουλίνη και η μεμβράνη κόβεται σε δύο κομμάτια. Αρχικά κόβεται πάνω από τα 70 kDa για να διαχωριστεί ο NFATc1 και στη συνέχεια, πάνω από τα 40 kDa, προκύπτοντας ένα κομμάτι που έχει και την πρωτεΐνη Control και την ALDH3A1. Με μαύρες γραμμές αναπαρίστανται οι μπάντες των πρωτεϊνών, ενώ με μπλε διακεκομμένες γραμμές, το σημείο όπου κόβεται η μεμβράνη.

πάνω από τα 70 kDa για την ανίχνευση του NFATc1 και μεταξύ των 50 kDa και 40 kDa για την ανίχνευση της ALDH3A1 και της β-ακτίνης, έχοντας τελικά τρία κομμάτια (Εικόνα 14α). Στην περίπτωση, που ως πρωτεΐνη ελέγχου (control) χρησιμοποιούταν η α-τουμπουλίνη, τότε η μεμβράνη κοβόταν πάνω από τα 40 kDa και πάνω από τα 70 kDa, έχοντας τελικά δύο κομμάτια (Εικόνα 14β).

Τα κομμάτια της μεμβράνης επώαστηκαν στα αντίστοιχα πρωτογενή αντισώματα ολονυχτίς στους 4 °C πάνω σε tube roller σε 50 rpm. Συγκεκριμένα για την ALDH3A1 και την α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού (1:2000 και για τα δύο), ενώ για τον NFATc1 και β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικίου (1:2000 και 1:1000, αντίστοιχα). Το επόμενο πρωί, τα κομμάτια των μεμβρανών ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS-T x1 για 5 λεπτά, ενώ αναδευόταν σε 50 rpm και στη συνέχεια επώαστηκε στο αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα, συνδεδεμένο με HRP, για μία ώρα με παράλληλη ανάδευση σε 50 rpm. Οι μεμβράνες που έφεραν την ALDH3A1, και την α-tubulin επώαστηκαν σε δευτερογενή αντισώματα κασίκας (1:10000), ενώ η β-ακτίνη και ο NFATC1 επώαστηκαν σε δευτερογενή αντισώματα αλόγου (1:10000). Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα αποτελούνταν από 5% (w/v) milk powder διαλυμένα σε TBS-T x1. Έπειτα οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS-T x1 για πέντε λεπτά. Τέλος, το σήμα μετρήθηκε επωάζοντας τις μεμβράνες με τα Immobilon Western Reagents (3 mL το καθένα σε σωλήνα προστατευμένο από το φως) και χρησιμοποιώντας την INTAS Chemostar. Οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AzureSpot και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Excel.

3.4. Εκχυλίσματα Οργανοειδών ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο

Εννιά δείγματα από εκχυλίσματα οργανοειδών (organoid lysates), παραχωρήθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Χαϊδελβέργης, προς μελέτη των επιπέδων ALDH3A1 και NFATc1 και την μεταξύ τους σχέση. Τα εκχυλίσματα οργανοειδών προήλθαν από πρωτογενής όγκους, και η προετοιμασία και η μέτρηση των συγκεντρώσεών τους πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο τους^[63]. Για το λόγο αυτό, ξεκίνησε κατευθείαν η μέθοδος SDS-Page και Western Blot για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, ακολουθώντας τα βήματα της παραγράφου 5.3. Πιο συγκεκριμένα για την προετοιμασία των δειγμάτων, 10 μg από κάθε δείγμα αναμείχθηκαν με lysis buffer και 6,7 μL 4xLaemmli Buffer, με τελικό όγκο 20 μL. Οι ζώνες των πρωτεϊνών ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AzureSpot και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Excel.

3.5. Πειράματα απόκρισης δόσης της πουρομυκίνης στις κυτταρικές σειρές

Για την μετέπειτα επιλογή (selection) των επιμολυσμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό πουρομυκίνη. Η συγκέντρωση πουρομυκίνης στην οποία η κυτταρική σειρά AsPC-1 δεν φέρει αντίσταση ήταν ήδη γνωστή από προηγούμενα πειράματα, με 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πουρομυκίνης. Προκειμένου να βρεθεί η αντίσταση των κυτταρικών σειρών Suit2-020 στην πουρομυκίνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα απόκρισης δόσης. Συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε 6-well plates με συγκέντρωση $0,3 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL σε 2 mL DMEM. Έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα επωάστηκαν με πουρομυκίνη συγκέντρωσης 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM and 10 μM . Μετά το πέρας 72 ωρών η διαδικασία της επιλογής σταμάτησε και τα κύτταρα επωάστηκαν ξανά με καθαρό θρεπτικό μέσο, χωρίς αντιβιοτικό. Ακολούθησε παρατήρηση των κυττάρων κάτω από το μικροσκόπιο και φάνηκε πως τα κύτταρα εμφάνισαν αντίσταση στις συγκεντρώσεις 2 μM και 4 μM πουρομυκίνης, ενώ υπήρχε σταδιακή μείωση του αριθμού των κυττάρων για τις συγκεντρώσεις 6 μM , 8 μM and 10 μM πουρομυκίνης. Επομένως για τα πειράματα επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων Suit2-020 χρησιμοποιήθηκαν 5 μM πουρομυκίνης.

3.6. Επιμόλυνση και επιλογή των AsPC-1 και Suit2-020

Για την δημιουργία ALDH3A1 και NFATc1 knocked out (KO) κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του μετασηματισμού αρχικά των κυττάρων *E. coli* Stb13 με pLentiCRISPR v2 (Πίνακας 5) ως πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων στο εσωτερικό των βακτηρίων. Ακολούθησε η απομόνωση των πλασμιδίων και η επιμόλυνση των AsPC-1 και Suit2-020 κυτταρικών σειρών. Για το κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν δύο gRNA αλληλουχίες, έχοντας τελικά τέσσερις πλασμιδιακούς φορείς, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 5. Ο μετασηματισμός και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε από προηγούμενο φοιτητή. Όσον αφορά την επιμόλυνση, οι παγκρεατικές κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε 6 well plates με συγκέντρωση $0,3 \times 10^6$ κύτταρα ανά πηγάδι και επωάστηκαν (incubated) στους 37 °C και 5-6% CO₂ μέχρι να καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας του πηγαδιού (17 ώρες για τα AsPC-1 κύτταρα και 48 ώρες για τα Suit2-020). Συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν 7 πηγαδάκια για την κάθε κυτταρική σειρά. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με 2 mL PBS και επωάστηκαν με νέο θρεπτικό μέσο (RPMI- 1640 για τα AsPC-1 και DMEM για

Πίνακας 5 Πλασμίδια μετασχηματισμού για σίγηση των *ALDH3A1* και *NFATC1*

Στόχος	gRNA	gRNA αλληλουχία (5'-3')	Πλασμιδιακός φορέας	Κατασκευαστής
<i>ALDH3A1</i>	gRNA1	GTTTCGACCATATCCTGTACA	ρLentiCRISPR v2	GenScript Biotech B.V.
<i>ALDH3A1</i>	gRNA2	AGTTCCAGGTGCCAATGACG	ρLentiCRISPR v2	GenScript Biotech B.V.
<i>NFATC1</i>	gRNA1	CCCGTATGAGCTTCGGA TTG	ρLentiCRISPR v2	GenScript Biotech B.V.
<i>NFATC1</i>	gRNA2	CGGAGGACACCCCATCG TGC	ρLentiCRISPR v2	GenScript Biotech B.V.

τα Suit2-020). Σε έξι PCR tubes αναμείχθηκαν 2500 ng πλασμιδιακού DNA ανά πηγάδι, 2,5 μL PLUS Reagent και Opti-MEM medium με συνολικό όγκο 125 μL ανά tube. Ως πλασμιδιακό DNA αναφέρονται οι gRNA αλληλουχίες που φαίνονται στον Πίνακα 5, το negative control που αποτελεί ένα ανακατεμένο DNA (scrambled DNA) και ο άδειος φορέας (empty vector). Σε άλλα έξι PCR tubes αναμείχθηκαν 12,5 μL Lipofectamine με 112,5 μL Opti-MEM medium. Τα πρώτα PCR tubes με το πλασμιδιακό DNA αναμείχθηκαν με τα αντίστοιχα PCR tubes με το Lipofectamine και το μείγμα επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι διαδικασίες έγιναν κάτω από στείρες συνθήκες. Ο ολικός όγκος των DNA-λιπιδιακών κατασκευών (250 μL ανά πηγάδι) προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα πάνω από κάθε πηγαδάκι με τα κύτταρα. Τα κύτταρα παρέμειναν με τις DNA – λιπιδιακές κατασκευές για 48 ώρες για τα AsPC-1 κύτταρα και 24 ώρες για τα Suit2-020 κύτταρα σε 37°C και 5-6% CO₂. Έπειτα, το επιμολυσμένο θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με 2 mL PBS. Στη συνέχεια προστέθηκε θρεπτικό μέσο με 4 μg/mL πουρομυκίνη για τα AsPC-1 κύτταρα και θρεπτικό μέσο με 5 μg/mL πουρομυκίνη για τα Suit2-020 κύτταρα. Η διαδικασία της επιλογής συνεχίστηκε για 6 μέρες για τα AsPC-1 και για 30 μέρες για τα Suit2-020 μέχρι να επιβεβαιωθεί πως τα wt κύτταρα πέθαναν από το αντιβιοτικό. Οι KO κυτταρικές σειρές επιβεβαιώθηκαν από Western Blot με απομόνωση των protein lysates. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα μη επιμολυσμένα κύτταρα (wild type, wt), τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με empty vector και κύτταρα που επιμολύνθηκαν από scrambled DNA ως negative control.

3.7. Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Προκειμένου να ελεγχθεί ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκε η μέθοδος MTT Proliferation Assay, χρησιμοποιώντας το Cell Proliferation Kit I (MTT). Η κυτταρική σειρά καλλιιεργήθηκε σε πέντε 96-well plates τρεις φορές (triplicates) για την κάθε περίπτωση και επώαστηκαν σε 37 °C και 5-6% CO₂. Μετά από 17 ώρες καλλιέργειας τα κύτταρα του πρώτου πιάτου επώαστηκαν με 10 μL MTT σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (timepoint 0). Έπειτα από 4 ώρες στο ίδιο πιάτο προστέθηκαν 100 μL του Solubilization Solution όπου παρέμεινε ολονυχτίς. Η απορρόφηση μετρήθηκε την επόμενη μέρα σε 590 nm χρησιμοποιώντας την FLUOstar microplate reader. Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρούνταν κάθε 24 ώρες για 96 συνολικές ώρες, κάθε φορά σε καινούργιο πιάτο. Το θρεπτικό μέσο των κυττάρων άλλαζε έπειτα από 48 ώρες.

3.8. Εύρεση κατάλληλης κυτταρικής συγκέντρωσης των κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια 96 – well plates

Προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση καλλιέργειας των Suit2-020 και AsPC-1 σε 96 well plates για μία πειραματική διαδικασία 96 ωρών, πραγματοποιήθηκε MTT Proliferation Assay με διαφορετικές πυκνότητες κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι πυκνότητες 0,2 × 10⁶ κύτταρα ανά mL, 0,1 × 10⁶ κύτταρα ανά mL, 0,05 × 10⁶ κύτταρα ανά mL, 0,025 × 10⁶ κύτταρα ανά mL σε 100 μL θρεπτικό μέσο. Έπειτα από 17 ώρες ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία της MTT proliferation assay όπως στην παράγραφο 5.7. και επαναλαμβάνονταν κάθε 24 ώρες για κάθε πιάτο. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος μετριόταν στα 595 nm από τον FLUOstar microplate reader.

3.9. Αναστολή της ALDH3A1 σε AsPC-1 κύτταρα με τον αναστολέα CB29

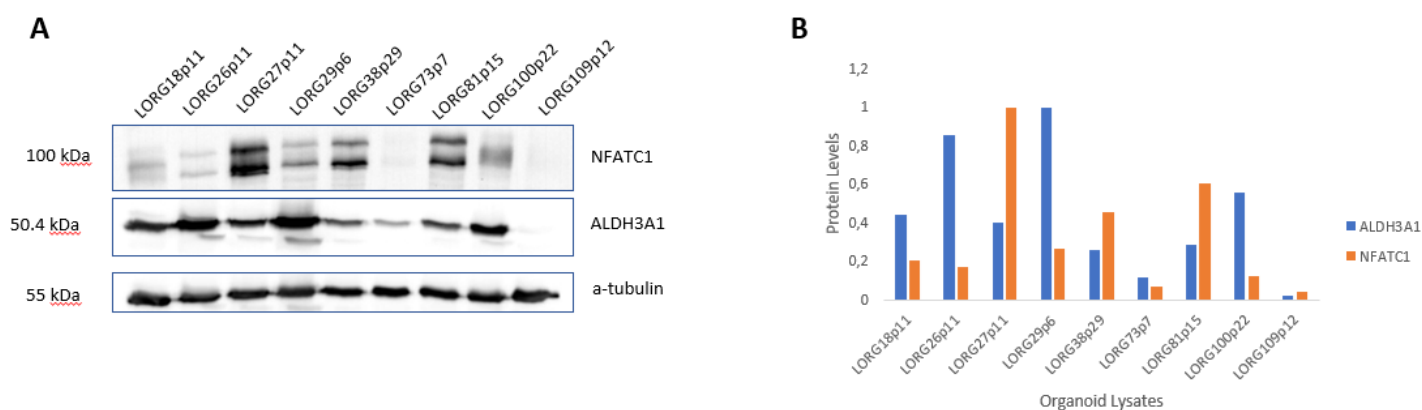
Ο αναστολέας CB29 βρισκόταν αρχικά σε στερεή μορφή και πραγματοποιήθηκε αρχικά η διάλυση του σε 100% DMSO. Για την χρήση του CB29 αναστολέα (IC₅₀=0,16 μM) στα κύτταρα, έπρεπε να γίνει διάλυση του σε τελική συγκέντρωση 0,25% DMSO. Πιο συγκεκριμένα για το πείραμα αναστολής της ALDH3A1 μελετήθηκαν 5 συγκεντρώσεις του αναστολέα, 10 μM, 20 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM. Τα AsPC-1 καλλιιεργήθηκαν σε πέντε 96 well plates με πυκνότητα 0,1 × 10⁶ κύτταρα ανά mL σε 90 μL θρεπτικού μέσου, τρεις φορές (triplicates) για την κάθε περίπτωση. Τα κύτταρα επώαστηκαν για περίπου 6 ώρες, ώστε να προσκολληθούν στην επιφάνεια και στη

συνέχεια ξεκίνησε η MTT Proliferation Assay στο πρώτο plate (ώρα 0), όπως στην παράγραφο 3.7. Παράλληλα έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου των υπόλοιπων 4 plate και προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου που περιείχε τις τελικές συγκεντρώσεις του αναστολέα που αναφέρθηκαν, διαλυμένες σε τελική συγκέντρωση 0,25% DMSO, τρεις φορές (triplicates) για την κάθε περίπτωση. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με τελική συγκέντρωση 0,25% DMSO και wt κυτταρικές σειρές, το καθένα τρεις φορές. Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρούνταν κάθε 24 ώρες για 96 συνολικές ώρες, κάθε φορά σε καινούργιο πιάτο. Το θρεπτικό μέσο των κυττάρων άλλαζε έπειτα από 48 ώρες, με καινούργιο θρεπτικό που περιείχε τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του αναστολέα.

4. Αποτελέσματα

4.1. Διαφορική έκφραση των ALDH3A1 και NFATc1 σε εκχυλίσματα οργανοειδών ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο

Για την μελέτη των επιπέδων των ALDH3A1 και NFATC1 σε ασθενείς με PDAC αλλά και την σχέση που εμφανίζουν μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκαν εννιά εκχυλίσματα οργανοειδών που δόθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Χαϊδελεβέργης. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ήταν ήδη μετρημένες, επομένως ακολούθησε η ποσοτικοποίηση των δύο πρωτεϊνών με Western Blotting (Εικόνα 15). Όλα τα δείγματα που φορτώθηκαν στο gel ήταν συγκέντρωσης 10 μg. Η χρήση μικρής συγκέντρωσης δειγμάτων έγινε λόγω της μικρής συγκέντρωσης και ποσότητας των αρχικών δειγμάτων που δόθηκαν. Για τα πειράματα αυτά ως πρωτεϊνικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η α-τουμπουλίνη, ενώ δεν υπήρχε δείγμα υγιών οργανοειδών προς σύγκριση. Για το λόγο αυτό η κανονικοποίηση της κάθε πρωτεΐνης του κάθε ασθενούς έγινε ως προς την τιμή της αντίστοιχης πρωτεΐνης του ασθενούς με την μεγαλύτερη τιμή.



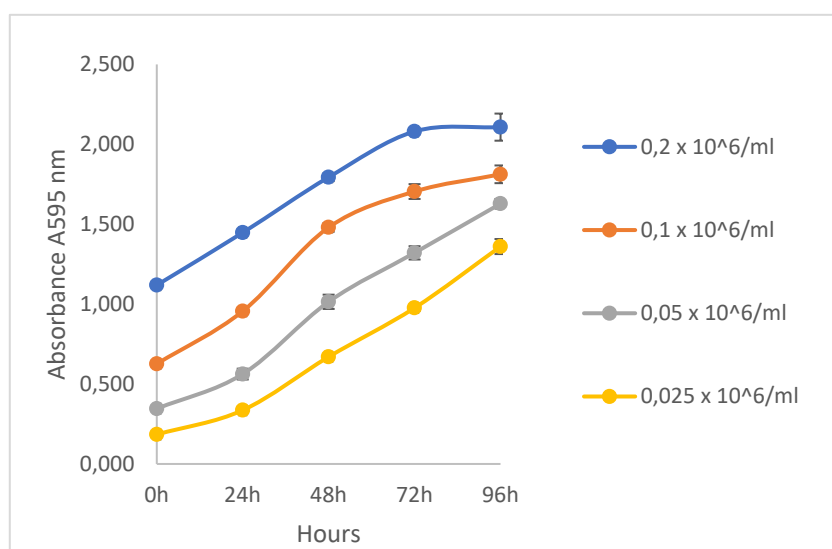
Εικόνα 15 Ανάλυση Western Blot και ποσοτικοποίηση των ζωνών των ALDH3A1 και NFATC1 για εκχυλίσματα οργανοειδών. Α) Εννιά εκχυλίσματα οργανοειδών από ασθενείς με PDAC μελετήθηκαν για να φανούν οι συγκεντρώσεις των ALDH3A1 και NFATC1 στον κάθε ασθενή και η μεταξύ τους σχέση. **Β)** Για την ποσοτικοποίηση των ζωνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AzureSpot και στη συνέχεια το πρόγραμμα Excel για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων. Λόγω της έλλειψης υγιούς δείγματος, το διάγραμμα διαμορφώθηκε από την πυκνότητα της ζώνης του κάθε δείγματος ως προς την αντίστοιχη πρωτεΐνη με την μεγαλύτερη πυκνότητα.

Με τον τρόπο αυτό από το διάγραμμα φαίνονται οι διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών ατόμων που πάσχουν από PDAC. Σε μερικούς ασθενείς μπορεί να φανεί μία σχέση όσον αφορά την υπερέκφραση του NFATC1 και της λειτουργίας του ως μεταγραφικό παράγοντα για το γονίδιο *aldh3a1*.

4.2. Μέθοδος MTT για την εύρεση της κατάλληλης συγκέντρωσης των κυττάρων προς καλλιέργεια σε 96-well plates

4.2.1. Κυτταρική σειρά AsPC-1

Με σκοπό να βελτιστοποιήσουμε την κυτταρική πυκνότητα των AsPC-1 κυττάρων όταν αυτά καλλιεργούνται σε 96 well plates με σκοπό την παρατήρησή τους έως και 96 ώρες, ακολούθησε μία σειρά πειραμάτων. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πέντε πιάτα σε συγκεντρώσεις $0,2 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL, $0,1 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL, $0,05 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL και $0,025 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL σε 100 μ L θρεπτικό μέσο RPMI-1640, τρεις φορές για την κάθε περίπτωση. Έπειτα από 17 ώρες ακολούθησε η διαδικασία της μεθόδου MTT, και την επόμενη μέρα η απορρόφηση μετρήθηκε σε 595 nm. Η MTT assay επαναλαμβανόταν κάθε 24 ώρες σε ένα πιάτο για συνολικό χρόνο παρατήρησης 96 ώρες. Ώρα 0 θεωρήθηκε η ώρα που



Εικόνα 16 Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού για διαφορετικές συγκεντρώσεις των κυττάρων AsPC-1. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο αυξανόμενος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών AsPC-1, όπως παρατηρήθηκε κάθε 24 ώρες για 96 ώρες συνολικά, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT proliferation Assay. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε ως προς την ώρα 0 και το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε από τα triplicates της κάθε περίπτωσης.

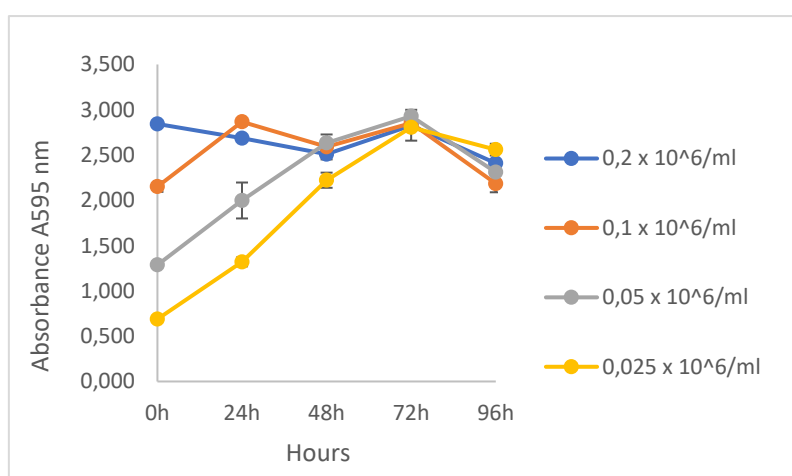
προστέθηκε το αντιδραστήριο στο πρώτο πιάτο.

Οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ($0,2 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL και $0,1 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL) δεν ήταν ιδανικές για ένα πείραμα που θα διαρκούσε 96 ώρες, καθώς έπειτα από τις 72 ώρες τα κύτταρα είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια των πηγαδιών και παρατηρούταν μία πτώση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού από το σημείο εκείνο. Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε πυκνότητα $0,05 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL σε 100 μ L θρεπτικό μέσο, φάνηκε να έχουν αυξανόμενο ρυθμό πολλαπλασιασμού ακόμα και

μετά τις 72 ώρες, με αποτέλεσμα αυτή η πυκνότητα να θεωρηθεί ως πιο ιδανική για τα μετέπειτα πειράματα.

4.2.2. Κυτταρική σειρά Suit2-020

Η ίδια διαδικασία με την κυτταρική σειρά AsPC-1 ακολουθήθηκε και για την κυτταρική σειρά Suit2-020, με τις ίδιες κυτταρικές πυκνότητες και ακολούθησε MTT Proliferation Assay με τον ίδιο τρόπο. Ώρα 0 θεωρήθηκε η ώρα που προστέθηκε το αντιδραστήριο στο πρώτο πιάτο.

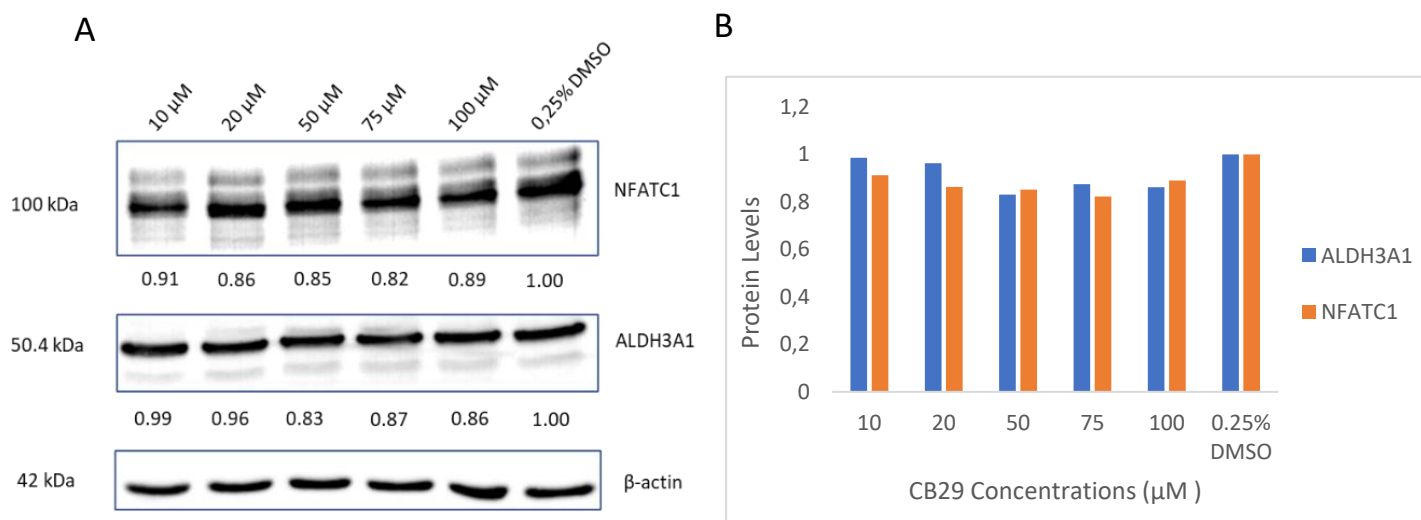


Εικόνα 16 Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού για διαφορετικές συγκεντρώσεις των κυττάρων Suit2-020. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο αυξανόμενος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών Suit2-020, όπως παρατηρήθηκε κάθε 24 ώρες για 96 ώρες συνολικά, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT proliferation Assay. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε ως προς την ώρα 0 και το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε από τα triplicates της κάθε περίπτωσης.

Η κυτταρική σειρά Suit2-020 κάλυψε την ολική επιφάνεια των πηγαδιών ήδη από την ώρα 0 όταν καλλιεργήθηκε σε πυκνότητα $0,2 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL, ενώ κάλυψε την ολική επιφάνεια έπειτα από 72 ώρες όταν καλλιεργήθηκε με πυκνότητα $0,025 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL. Για το λόγο αυτό, για την πραγματοποίηση των υπόλοιπων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μικρότερη πυκνότητα κυττάρων, ίση με $0,015 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL, για να καλλιεργηθούν σε 96 well plates για πειράματα 96 ωρών.

4.3. Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των AsPC-1 με ανεσταλμένη την δράση της ALDH3A1

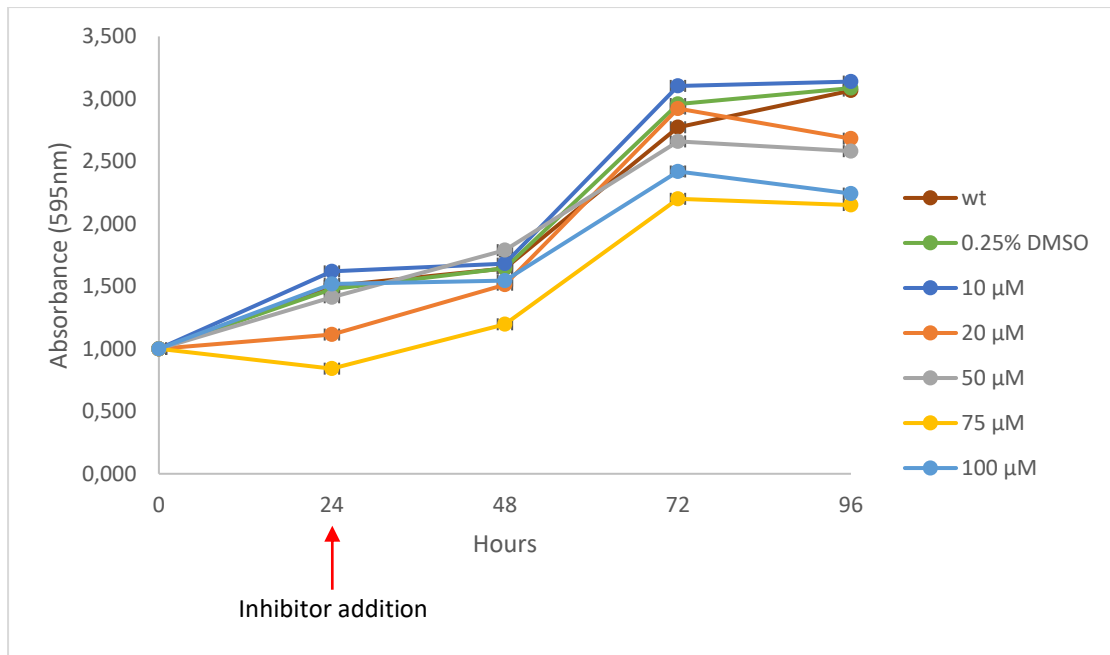
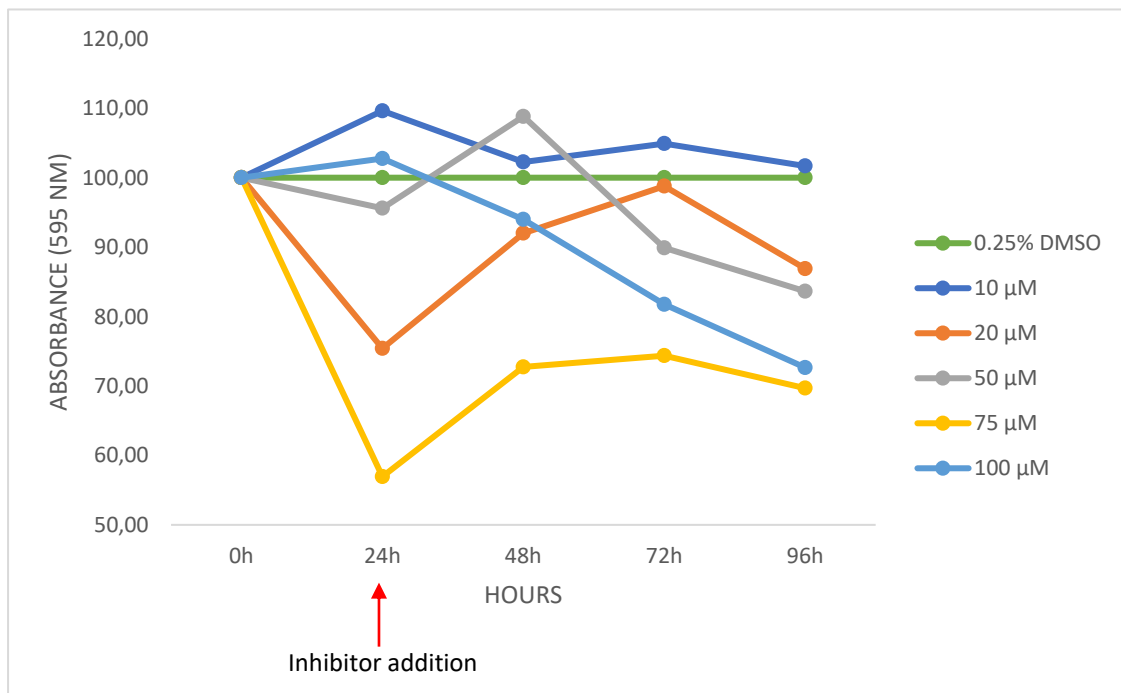
Είναι γνωστό πως τα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος, όπως και άλλων τύπων καρκίνου, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα της ALDH3A1 καθώς και αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα. Από τα πειράματά μας θέλαμε να δείξουμε την πιθανή επίδραση που έχει η ALDH3A1 στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Αρχικά επιλέχθηκε να μην γίνει μία ολική καταστολή της δράσης της ALDH3A1, αλλά να χρησιμοποιηθεί ένα μόριο αναστολέα για την μερική αναστολή της. Ο αναστολέας CB29, αποτελεί ένα μόριο που συνδέεται στο κέντρο σύνδεσης των αλδευδών του ενζύμου ALDH3A1, με αποτέλεσμα να αναστέλλει την λειτουργία της πρωτεΐνης χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασής της. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανικανότητα του αναστολέα να επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε Western Blot στα AsPC-1 κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα, 10 μM , 20 μM , 50 μM , 75 μM και 100 μM , διαλυμένα σε 0,25% DMSO, για όλες τις περιπτώσεις. Ως control χρησιμοποιήθηκαν AsPC-1 κύτταρα χωρίς την δράση του αναστολέα, αλλά με επώαση σε 0,25% DMSO, ενώ ως πρωτεΐνη μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε η β -ακτίνη. Από το Western Blot φάνηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης (λειτουργικής ή μη) στο εσωτερικό των κυττάρου (Εικόνα 16), εμφανίζοντας μια παρόμοια σταθερότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις.



Εικόνα 18 Ανάλυση Western Blot και ποσοτικοποίηση των ζωνών για διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα CB29. **A)** Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα CB29 στην ικανότητα έκφρασης του γονιδίου της ALDH3A1 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, AsPC-1. **B)** Ποσοτικοποίηση των ζωνών του Western Blot για τα κύτταρα που επωάστηκαν με τον αναστολέα. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς τα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με 0,25% DMSO.

Από το Western Blot (Εικόνα 18A) φαίνεται η ανεπηρέαστη έκφραση της ALDH3A1 παρά την δράση του αναστολέα, όπως και αναμενόταν. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών (Εικόνα 18B) επιβεβαίωσε την εικόνα που φαινόταν από το Western Blot, με πολύ μικρές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που δεν θεωρήθηκαν σημαντικές.

Στη συνέχεια, αφού τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου δεν επηρεάστηκαν, θελήσαμε να ελέγξουμε την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων που έφεραν αυξανόμενες συγκεντρώσεις του CB29. Τα AsPC-1 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πέντε 96 well plates προκειμένου να ελεγχθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων κάθε 24 ώρες για συνολικά 96 ώρες. Έπειτα από 6 ώρες που τα κύτταρα βρισκότουσαν σε 37 °C και 5-6% CO₂, τα κύτταρα των τεσσάρων 96 well plates επώαστηκαν με 10 μM, 20 μM, 50μM, 75μM και 100μM του αναστολέα CB29 διαλυμένος σε 0,25% DMSO, τρεις φορές για την κάθε περίπτωση. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα αγρίου τύπου και κύτταρα που επώαστηκαν με 0,25% DMSO τρεις φορές για την κάθε περίπτωση. Ο αναστολέας CB29 κρυσταλλοποιούταν στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (75 μM και 100 μM), με αποτέλεσμα να μειώνεται η ακρίβεια του πειράματος. Παράλληλα, για το πέμπτο 96 well plate στο οποίο δεν προστέθηκε ο αναστολέας, ξεκίνησε MTT Proliferation Assay καθορίζοντας την ώρα εκείνη ως ώρα 0. Η απορρόφηση των κυττάρων μετρίοταν την επόμενη μέρα στα 595 nm. Οι απορροφήσεις μετριόντουσαν κάθε 24 ώρες με αποτέλεσμα την δημιουργία διαγράμματος που έδειχνε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού κυττάρων με συνεχή αναστολή της ALDH3A1 για 96 ώρες.

A**B**

Εικόνα 19 Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού των AsPC-1 κυττάρων επωασμένων με τον αναστολέα CB29. Στα διαγράμματα φαίνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των AsPC-1 κυττάρων με συνεχή αναστολή της δράσης της ALDH3A1, μετρημένος κάθε 24 ώρες. Στο διάγραμμα **A)** η κανονικοποίηση των τιμών έγινε ως προς την ώρα 0 και το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε από τα triplicates της κάθε περίπτωσης, ενώ στο διάγραμμα **B)** η κανονικοποίηση των τιμών επί τις 100, έγινε ως προς την ώρα 0 και ως προς τις τιμές του 0,25% DMSO.

Η κρυσταλλοποίηση του αναστολέα στη συγκέντρωση των 100 μM έφερε σαν αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητάς, καθώς ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερος από τα κύτταρα με συγκέντρωση αναστολέα 75

μM και αρκετά κοντά με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων που έχουν επωαστεί με 50 μM αναστολέα.

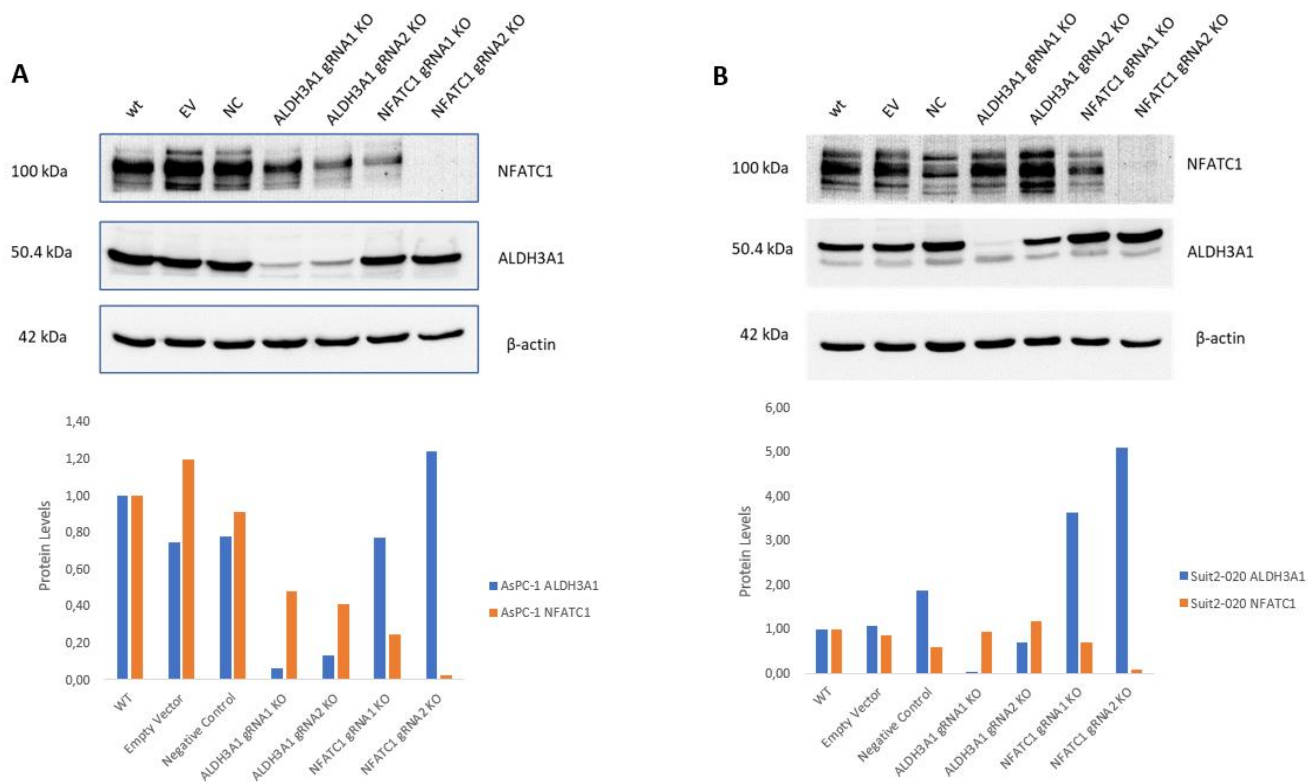
Γενικότερα, παρατηρήθηκε πως σε υψηλότερες συγκέντρωσης του CB29 (που δεν επηρεάζοντουσαν από την κρυσταλλοποίηση) και επομένως σε λιγότερα λειτουργικά ALDH3A1 ένζυμα, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των AsPC-1 μειωνόταν. Αυτό επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση πως η ALDH3A1 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων και η μείωση είτε στην λειτουργία είτε στην έκφραση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του πολλαπλασιασμού.

4.4. Δημιουργία ALDH3A1 KO και NFATC1 KO κυτταρικών σειρών

Καθώς η αναστολή της δράσης τη ALDH3A1 με αναστολέα είχε ορατή αλλαγή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων AsPC-1, επόμενο ήταν να ελεγχθεί η ολική καταστολή του γονιδίου της ALDH3A1. Παράλληλα, έγινε καταστολή και του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1, προκειμένου να ελεγχθεί και η σχέση μεταξύ του NFATC1 και της ALDH3A1. Για το σκοπό αυτό, έγινε η χρήση της τεχνικής CRISPR/Cas9, με την εισαγωγή, σε κύτταρα AsPC-1 και Suit2-020, πλασμιδιακών φορέων pLentiCRISPR v2 που θα οδηγούσαν σε στοχευμένη καταστολή του γονιδίου *aldh3a1* και σε άλλη ομάδα των ίδιων κυττάρων, πλασμιδιακούς φορείς pLentiCRISPR v2 για την στοχευμένη καταστολή του γονιδίου *nfatc1*. Για το κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν δύο gRNAs (gRNA1 και gRNA2), ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη καταστολή, αλλά και να παρατηρηθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε κάθε περίπτωση.

Έπειτα από 48 ώρες της επιμόλυνσης των AsPC-1 ακολούθησε η επιλογή των κυττάρων που δέχτηκαν τον πλασμιδιακό φορέα, με την χρήση 4 μg/mL του αντιβιοτικού πουρομυκίνης για 6 μέρες. Όσον αφορά την κυτταρική σειρά Suit2-020, η επιμόλυνση σταμάτησε μετά από 24 ώρες, ξεκινώντας την επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων με 5 μg/mL πουρομυκίνης, που διήρκησε 30 μέρες. Ο έλεγχος της επιτυχούς επιμόλυνσης και άρα καταστολής των δύο γονιδίων έγινε με την μέθοδο του Western Blot.

Ως control για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν wt κύτταρα, κύτταρα που επιμολύνθηκαν με empty vector και κύτταρα που επιμολύνθηκαν με scrambled DNA (negative control).



Εικόνα 20 Στοχευμένη CRISPR/Cas9 καταστολή των *aldh3a1* και *nfatc1* στις κυτταρικές σειρές *AsPC-1* και *Suit2-020*. Ανάλυση Western Blot και ποσοτικοποίηση των ζωνών σε επιμολυσμένα *AsPC-1* (A) και *Suit2-020* (B) για την ανίχνευση της καταστολής των *ALDH3A1* και *NFATC1*. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ως προς τις wt κυτταρικές σειρές

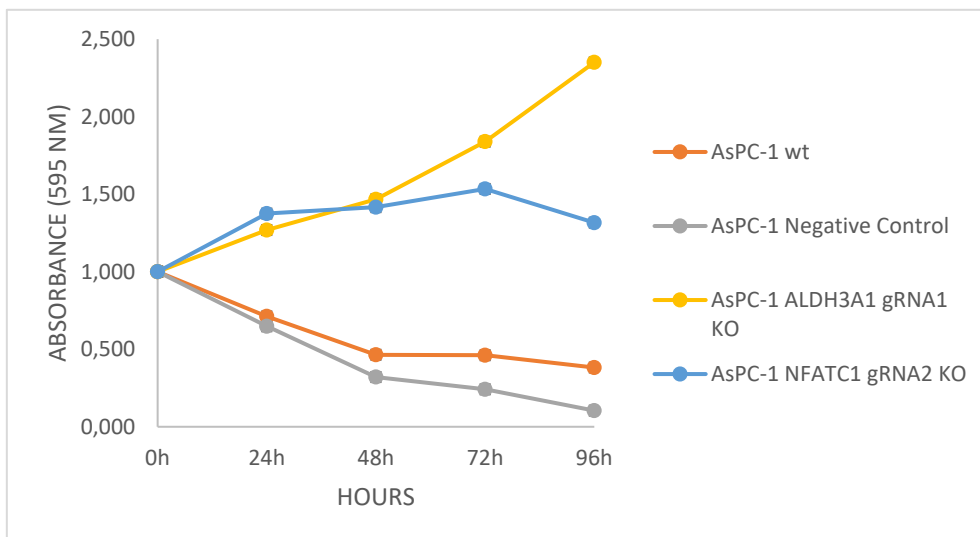
Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως υπήρξαν όντως επιτυχή ΚΟs και τα για τα δύο γονίδια και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα και στις δύο κυτταρικές σειρές το *ALDH3A1* gRNA1 KO είχε μεγαλύτερη καταστολή σε σύγκριση με το *ALDH3A1* gRNA2 KO, το οποίο εμφάνιζε, επίσης, μειωμένη έκφραση, όχι τόσο έντονη όσο το πρώτο. Αντιθέτως, για την καταστολή του *NFATC1*, το *NFATC1* gRNA2 KO ήταν πιο επιτυχή και στα δύο κύτταρα, με μεγαλύτερη καταστολή σε σύγκριση με το gRNA1. Το gRNA1 εμφάνιζε μείωση στην έκφραση του *NFATC1*, αλλά όχι τόσο έντονη όσο το gRNA2 που εμφάνιζε μία πολύ αδύναμη ζώνη.

4.5. Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των *AsPC-1* ΚΟ και *Suit2-020* ΚΟ κυττάρων.

Αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής επιμόλυνση των *AsPC-1* και *Suit2-020* και καταστολή των *ALDH3A1* και *NFATC1*, ακολούθησε μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας την μέθοδο MTT Proliferation Assay, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή αλλαγή στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κατεσταλμένων κυττάρων. Οι κυτταρικές σειρές των *AsPC-1* και *Suit2-020* που είχαν επιμολυνθεί με *ALDH3A1*

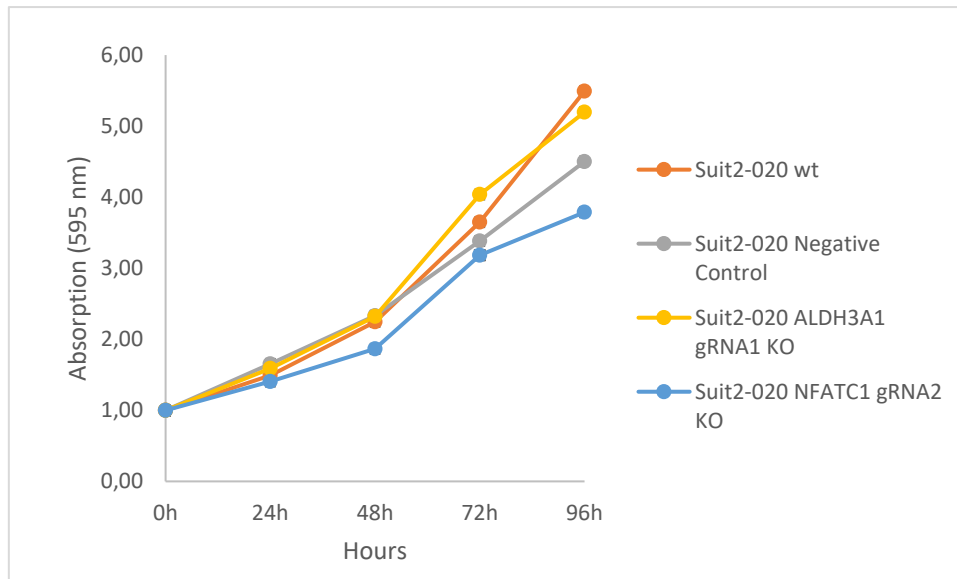
gRNA1, NFATC1 gRNA2, scrambled DNA (negative control) και τα wt κύτταρα, καλλιεργήθηκαν σε 96 well plates σε πυκνότητα $0,05 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL για τα AsCP-1 και $0,015 \times 10^6$ κύτταρα ανά mL για τα Suit2-020 σε 100 μ L θρεπτικό μέσο, τρεις φορές για την κάθε περίπτωση.

Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε σε χρονικό διάστημα 24 ωρών και οι απορροφήσεις από το κάθε δείγμα μετρήθηκαν στα 595 nm.



Εικόνα 17 Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τα ALDH3A1 KO και NFATC1 KO στα AsPC-1 κύτταρα. Πραγματοποιήθηκε MTT Proliferation Assay για τα AsPC-1 κύτταρα που είχαν υποστεί στοχευμένη καταστολή των γονιδίων *aldh3a1* και *nfatc1* με την μέθοδο CRISPR/Cas9. Η μελέτη πραγματοποιούταν κάθε 24 ώρες για 96 ώρες συνολικά. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα wt κύτταρα και τα negative control. Όλες οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν ως προς την ώρα 0 και το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε από τα triplicates της κάθε περίπτωσης.

Όσον αφορά τα AsPC-1 κύτταρα τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι αντίθετα από αυτά που αναμενόταν. Συγκεκριμένα παρατηρείται μία αύξηση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού και των δύο KO κυτταρικών σειρών, ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των wt και negative control κυττάρων, μειωνόταν στο πέρας των 96 ωρών.



Εικόνα 22 Μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τα ALDH3A1 KO και NFATC1 KO στα Suit2-020 κύτταρα. Πραγματοποιήθηκε MTT Proliferation Assay για τα Suit2-020 κύτταρα που είχαν υποστεί στοχευμένη καταστολή των γονιδίων *aldh3a1* και *nfatc1* με την μέθοδο CRISPR/Cas9. Η μελέτη πραγματοποιούταν κάθε 24 ώρες για 96 ώρες συνολικά. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα wt κύτταρα και τα negative control. Όλες οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν ως προς την ώρα 0 και το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε από τα triplicates της κάθε περίπτωσης.

Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Suit2-020 - ALDH3A1 KO δεν μειώθηκε όπως αναμενόταν, αλλά φαίνεται πως ο ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι παρόμοιος με αυτόν των wt κυτταρικών σειρών. Αντίθετα οι Suti2-020 – NFATC1 KO κυτταρικές σειρές, παρουσίασαν μία μικρή μείωση στον πολλαπλασιασμό τους. Προκειμένου να φανεί η αρχική υπόθεση πως η ALDH3A1 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, θα χρειαστεί περισσότερη βελτιστοποίηση των πειραμάτων.

5. Συζήτηση

Ο καρκίνος του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (PDAC) αποτελεί μία πολύ κρίσιμη ασθένεια με αυξανόμενους ρυθμούς εμφάνισης και θνησιμότητας με το πέρασ των ετών. Λόγω της δυσκολίας που εμφανίζει στην ανίχνευσή του, καθώς βρίσκεται σε ένα πολύ καλά προστατευμένο περιβάλλον, το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης φτάνει μόνο 11,5%, ενώ η περίπτωση επανεμφάνισής του ύστερα από εκτομή του όγκου είναι αρκετά υψηλή. Η έκφραση της ALDH3A1 σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο έχει φανεί από τα πειράματα των Zhou et al.^[46] ότι αυξάνεται αρκετά σε σύγκριση με υγιή άτομα και επιδεινώνει την κατάσταση των ασθενών. Η υπερέκφραση αυτή επηρεάζει αρκετές λειτουργίες εντός του καρκίνου, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^[21,44], την ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα^[25,27-29,41-43] και την προστασία των κυττάρων από απόπτωση^[32,35]. Επιπλέον, υψηλή αύξηση παρατηρείται και στον μεταγραφικό παράγοντα NFATC1 μεταξύ των ασθενών με PDAC^[55,60], με ρόλο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και αντίσταση των ασθενών στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα^[59,60]. Όπως έδειξαν οι έρευνας των Wu et al.^[56] φαίνεται να υπάρχει μία σύνδεση μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα και του ενζύμου, λόγω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της ALDH3A1, σε ασθενείς με PDAC, που προσελκύει τον NFATC1.

Από τα πειράματα των εκχυλισμάτων των οργανοειδών που προήλθαν από πρωτογενής όγκους ασθενών με PDAC^[63], φάνηκε πως η έκφραση της ALDH3A1 σχετίζεται με τον ασθενή. Πιο συγκεκριμένα, σε μερικούς ασθενείς η πρωτεΐνη φάνηκε να έχει υψηλή έκφραση εμφανίζοντας πυκνές μπάντες στα πειράματα του Western Blot, ενώ σε μερικούς άλλους η έκφραση ήταν τόσο μικρή που οι μπάντες αχνοφαίνονταν (Εικόνα 15). Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων δεν μπορούν να βγουν πολύ σαφή συμπεράσματα, αλλά μέσω της σύγκρισης που έγινε με τον ασθενή με την υψηλότερη συγκέντρωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, φαίνεται πως αρκετοί ασθενείς φέρουν σημαντική έκφραση της ALDH3A1 στα δείγματα των οργανοειδών. Παρόλα αυτά, αυτή η ποικιλομορφία που εμφανίζουν τα δείγματα παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον και αποδεικνύει πως ο κάθε ασθενής αποτελεί μία μοναδική περίπτωση. Επιπλέον, όσον αφορά την σχέση που παρουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας NFATC1 με την ALDH3A1, σε μερικές περιπτώσεις ασθενών (LORG38p29, LORG81p15) μπορεί να φανεί πως η αύξηση του NFATC1 συνοδεύεται και με μία μικρή αύξηση στην έκφραση της ALDH3A1. Ωστόσο, παραπάνω πειράματα απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν την θεώρηση αυτή.

Έχοντας ως στόχο τον έλεγχο του ρόλου της ALDH3A1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ακολούθησαν πειράματα μερικής αναστολής της δράσης του ενζύμου, χωρίς να επηρεαστεί αρχικά η έκφραση του γονιδίου. Για το σκοπό αυτό,

χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας CB29, που όπως φάνηκε από τα πειράματα των Parajuli et al. [64], προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου δεσμεύονται οι αλδεΐδες με σκοπό την οξειδωσή τους. Ο αναστολέας αυτός, παρουσίασε μεγάλη δυσκολία ως προς την διάλυσή του στο θεραπευτικό μέσο των κυττάρων, καθώς κρυσταλλοποιούταν αρκετά όταν προστιθόταν στα κύτταρα. Προκειμένου να επιλυθεί το ζήτημα αυτό, έγινε περαιτέρω διάλυση του αναστολέα σε τελική συγκέντρωση 0,25% DMSO, οδηγώντας στην μείωση των κρυστάλλων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά το πρόβλημα παρέμενε σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτό έφερε σαν αποτέλεσμα την μείωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων (η αναστολή κυττάρων με 100 μM του αναστολέα είχε μικρότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα 75 μM του αναστολέα, λόγω του αυξημένου αριθμού κρυστάλλων που μείωνε την ακρίβεια της μετρούμενης συγκέντρωσης του CB29) και τον περιορισμό της μελέτης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων του αναστολέα. Ίσως η χρήση ενός διαφορετικού αναστολέα, όπως του CB7 [42] που μελετήθηκε από την ίδια ομάδα επιστημών (Parajuli et al.) να έδινε την δυνατότητα μελέτης και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αναστολέα, χωρίς την δημιουργία κρυστάλλων. Η διάλυση του CB29 σε υψηλότερες συγκεντρώσεις DMSO δεν επιλέχθηκε, λόγω της κυτοτοξικότητας του DMSO, που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, ήδη από τα πειράματα που έγιναν με τον CB29 μπορεί να φανεί πως με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναστολέα, άρα και την μείωση της δράσης της ALDH3A1, μειώνεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων στο πέρας των 96 ωρών, χωρίς η συγκέντρωση του DMSO να επηρεάζει την λειτουργία των κυττάρων (Εικόνα 18). Πιο συγκεκριμένα, μπορούμε να δούμε πως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αναστολέα (50 μM , 75 μM και 100 μM) έχουμε μεγαλύτερη μείωση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με το control (0,25% DMSO), όπως φαίνεται χαρακτηριστικά από την Εικόνα 18B. Επομένως παρουσιάζεται ήδη μία σχέση του ενζύμου με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρείται μία μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις 24 ώρες. Αυτό ίσως δικαιολογείται από το γεγονός ότι ο αναστολέας προστέθηκε μετά την ώρα 0 στα κύτταρα αυτά, προκαλώντας μία στρεσογόνα κατάσταση που επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους.

Παρατηρώντας, λοιπόν, την επιρροή που εμφανίζει η μειωμένη δράση της ALDH3A1 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, θελήσαμε να μελετήσουμε το αποτέλεσμα της ολικής καταστολής του γονιδίου *aldh3a1* στα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό έγινε η καταστολή του γονιδίου στα AsPC-1 και Suit2-020 με τη χρήση της μεθόδου CRISPR/Cas9. Παράλληλα, έγινε καταστολή και στο γονίδιο *nfatc1* και στις δύο κυτταρικές σειρές, με σκοπό την μελέτη της πιθανής επιρροής του μεταγραφικού παράγοντα στην έκφραση της πρωτεΐνης ALDH3A1. Από τα αποτελέσματα του Western Blot φάνηκε πως το gRNA1 της ALDH3A1 και το gRNA2 του NFATC1 είχαν πιο αποτελεσματική καταστολή σε σύγκριση με τα άλλα gRNAs. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί

από την σημαντικότητα της λειτουργίας της αλληλουχίας που αντιστοιχούν τα gRNAs σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με το ALDH3A1 gRNA1 να αντιστοιχεί σε αλληλουχία της πρωτεΐνης που βρίσκεται κοντά στο κέντρο σύνδεσης των αλδεϋδών με το ένζυμο, ενώ τα gRNAs του NFATC1 να αντιστοιχούν και τα δύο σε αλληλουχία της πρωτεΐνης που βρίσκεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA, αλλά με το gRNA2 να είναι πιο κοντά στο DNA, στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Ό,τι αφορά την σχέση του NFATC1 με την ALDH3A1, φάνηκε πως και στις δύο κυτταρικές σειρές, τα NFATC1 KO κύτταρα είχαν αρκετά υψηλά επίπεδα έκφρασης της ALDH3A1 και ήταν αρκετά ενδιαφέρον πως όσο λιγότερη ήταν η έκφραση του NFATC1, τόσο μεγαλύτερη ήταν η έκφραση της ALDH3A1 (Εικόνα 20). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα αυτά δεν αναμενόταν σύμφωνα με τις μελέτες των Wu et al.^[56], οι οποίοι έδειξαν πως σε αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1 υπήρξε μείωση στα επίπεδα RNA της ALDH3A1. Για το λόγο αυτό πρέπει να γίνει περαιτέρω έλεγχος και στα επίπεδα RNA του γονιδίου *aldh3a1* για να επιβεβαιωθεί εάν η αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται ήδη από το στάδιο της μεταγραφής ή υπήρξε κάποια τροποποίηση στο στάδιο της μετάφρασης (μετα-μεταγραφική τροποποίηση) που να εντείνει την διαδικασία παραγωγής της πρωτεΐνης ALDH3A1. Διαφορετικά, μπορεί ήδη από το στάδιο της επιλογής με πουρομυκίνη, να απομονώθηκαν κυρίως τα κύτταρα τα οποία για χημικούς λόγους να οδηγήθηκαν στην έκφραση υψηλών επιπέδων ALDH3A1, ύστερα από την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1. Περαιτέρω πειράματα χρειάζεται να γίνουν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σχέση του μεταγραφικού παράγοντα με την ALDH3A1. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί, πως ακόμα και από τα πειράματα των εκχυλισμάτων των οργανοειδών, υπήρξαν δείγματα ασθενών (LORG18p11, LORG26p11, LORG29p6 και LORG100p22) που εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του NFATC1 και αρκετά υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης ALDH3A1, υποστηρίζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τις KO κυτταρικές σειρές.

Στη συνέχεια ακολούθησαν τα πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας την μέθοδο MTT Proliferation Assay, για τα ALDH3A1 KO και NFATC1 KO κύτταρα. Και για τις δύο κυτταρικές σειρές τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα. Όσον αφορά τα AsPC-1 κύτταρα, φάνηκε πως με το πέρας των 96 ωρών, τα ALDH3A1 KO και NFATC1 KO κύτταρα είχαν αυξανόμενο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε αντίθεση με τα wt και Negative control κύτταρα που ο πολλαπλασιασμός τους μειωνόταν κάθε 24ωρο (Εικόνα 21). Στα Suit2-020 ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ALDH3A1 KO ήταν παρόμοιος με αυτόν των wt κυττάρων, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε κάποια αλλαγή, ενώ τα NFATC1 KO κύτταρα είχαν μία μικρή μείωση στον πολλαπλασιασμό τους (Εικόνα 22).

Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να προέκυψαν λόγω κάποιου τεχνικού σφάλματος στην διαδικασία, καθώς τα πειράματα βρισκόντουσαν ακόμα υπό στάδιο βελτιστοποίησης με μερικές ακόμα τροποποιήσεις που θα μπορούσαν να γίνουν. Πιο

συγκεκριμένα, η καλλιέργεια των τεσσάρων κυτταρικών σειρών στο ίδιο plate απαιτεί κάποιο χρόνο όσον αφορά την μέτρηση των κυττάρων χειροκίνητα, που οδηγεί στην επώαση τους για αρκετή ώρα μέσα σε tubes και εκτός των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης (37°C και 5-6% CO₂). Αυτό φέρει σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να συσσωρεύονται μεταξύ τους και να μειώνεται η ακρίβεια της μέτρησης ως προς τον αριθμό των κυττάρων ανά mL. Αυτό θα μπορούσε να αποφευχθεί ίσως ακολουθώντας διαφορετικά βήματα κατά την διαδικασία της μέτρησης και καλλιέργειας των κυττάρων στα 96 well plates, προκειμένου να μειωθεί ο μεταξύ τους χρόνος. Για παράδειγμα, καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα (multichannel pipette) ή μέτρηση της μίας κυτταρικής σειράς και άμεση δημιουργία του διαλύματος κυττάρων προς καλλιέργεια.

Πέρα από αυτά, κατά την διαδικασία των πειραμάτων αυτών, τα κύτταρα υπέστησαν διάφορες πιέσεις που τα στρέσαραν, όπως βλάβες στην συσκευή επώασης (incubator) ή ανακαλλιέργειες ανά σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτό οδήγησε τα κύτταρα να χάσουν την σωστή μορφολογία και μάλλον τη μεταβολική τους ικανότητα. Περεταίρω πειράματα θα χρειαστούν να επαναληφθούν με κύτταρα stock ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με τις ανάλογες τροποποιήσεις. Τέλος, στην περίπτωση που τα παραπάνω δεν φέρουν πιο ακριβή αποτελέσματα, ίσως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη μέθοδος κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Καθώς, η MTT Proliferation Assay, και άλλες παρόμοιες μέθοδοι ελέγχου της μεταβολικής ικανότητας των κυττάρων με σκοπό τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους, σχετίζονται με τα επίπεδα του NAD(P)^[65] και η πρωτεΐνη που ελέγχεται (ALDH3A1) επηρεάζει τα επίπεδα του NAD(P) στα κύτταρα^[44], ίσως θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί μία μέθοδος που να μην μπορεί να επηρεαστεί από την καταστολή της ALDH3A1. Για παράδειγμα ακολουθώντας μέθοδο κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση BrdU^[66] θα γίνει ο έλεγχος των επιπέδων της σύνθεσης του DNA ανά 24 ώρες και άρα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Διαφορετικά, μπορεί να ακολουθηθεί η μέθοδος Colony Formation Assay^[67] και να μετρηθεί ο αριθμός των αποικιών των ΚΟ κυττάρων έπειτα από 1-2 εβδομάδες συγκριτικά με τα κύτταρα control.

Συνοψίζοντας, από τα πειράματα αναστολής της ALDH3A1 φάνηκε πως η πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων όπως προτάθηκε από τους Muzio G. et al.^[21] και Marchitti S. et al.^[44]. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσίασε η σχέση μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα NFATC1 και της πρωτεΐνης ALDH3A1 που μέχρι στιγμής δεν έχουν υπάρξει ιδιαίτερες αναφορές ως προς την σχέση τους. Παρόλα αυτά, η βελτιστοποίηση και επανάληψη κάποιων πειραμάτων χρειάζεται να πραγματοποιηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ώστε να προκύψουν πιο σαφή αποτελέσματα.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Zeng, S., Pöttler, M., Lan, B., Grützmann, R., Pilarsky, C., & Yang, H. (2019). Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4504. doi:10.3390/ijms20184504
- [2] Grossberg, A. J., Chu, L. C., Deig, C. R., Fishman, E. K., Hwang, W. L., Maitra, A., Marks, D. L., Mehta, A., Nabavizadeh, N., Simeone, D. M., Weekes, C. D., & Thomas, C. R., Jr (2020). Multidisciplinary standards of care and recent progress in pancreatic ductal adenocarcinoma. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(5), 375–403. doi:10.3322/caac.21626
- [3] SEER Cancer Stat Facts: Pancreatic Cancer. Available from URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>
- [4] Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World journal of oncology*, 10(1), 10–27. doi:10.14740/wjon1166
- [5] Hidalgo, M., Cascinu, S., Kleeff, J., Labianca, R., Löhr, J. M., Neoptolemos, J., Real, F. X., Van Laethem, J. L., & Heinemann, V. (2015). Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 15(1), 8–18. doi:10.1016/j.pan.2014.10.001
- [6] Ren, B., Liu X., Suriawinata, A.A. (2019). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. *The American Journal of Pathology*, 189(1), 9-21. doi:10.1016/j.ajpath.2018.10.004
- [7] McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World journal of gastroenterology*, 24(43), 4846–4861. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846
- [8] Sarantis, P., Koustas, E., Papadimitropoulou, A., Papavassiliou, A.G., Karamouzis, M. (2020). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol*, 12(2): 173-181. doi:10.4251/wjgo.v12.i2.173
- [9] Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
- [10] Pereira, S. P., Oldfield, L., Ney, A., Hart, P. A., Keane, M. G., Pandol, S. J., Li, D., Greenhalf, W., Jeon, C. Y., Koay, E. J., Almario, C. V., Halloran, C., Lennon, A. M., & Costello, E. (2020). Early detection of pancreatic cancer. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 5(7), 698–710. doi:10.1016/S2468-1253(19)30416-9
- [11] Li, S. S., Zhou, C. Y., Liao, R., Xiong, L., Weng, N. N., Zhao, Y. Q., Mason, C., Gou, H. F., Yi, C., & Zhu, Q. (2020). ABO blood type, smoking status, other risk factors

- and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Medicine*, 99(14), e19413.
doi:10.1097/MD.00000000000019413
- [12] Williams, H., Jajja, M.R., et al. (2020). Association of ABO blood group with survival following pancreatoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB*. 22(11), 1557-1562.
doi:10.1016/j.hpb.2020.01.004
- [13] Khalaf, N., El-Serag, H. B., Abrams, H. R., Thrift, A.P. (2020). Burden of Pancreatic Cancer: From Epidemiology to Practice. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 19(5), 876-884.
doi:10.1016/j.cgh.2020.02.054
- [14] Kirkegård, J., Mortensen, F. V., & Cronin-Fenton, D. (2017). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 112(9), 1366–1372.
doi:10.1038/ajg.2017.218
- [15] Kandikattu, H. K., Venkateshaiah, S. U., & Mishra, A. (2020). Chronic Pancreatitis and the Development of Pancreatic Cancer. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 20(8), 1182–1210.
doi:10.2174/1871530320666200423095700
- [16] Klein, A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(7), 493–502.
doi:10.1038/s41575-021-00457-x
- [17] Zanini, S., Renzi, S., Limongi, A. R., Bellavite, P., Giovinzano, F., & Bermano, G. (2021). A review of lifestyle and environment risk factors for pancreatic cancer. *European Journal of Cancer*, 145, 53–70.
doi:10.1016/j.ejca.2020.11.040
- [18] Hu, J. X., Zhao, C. F., Chen, W. B., Liu, Q. C., Li, Q. W., Lin, Y. Y., & Gao, F. (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World journal of gastroenterology*, 27(27), 4298–4321.
doi:10.3748/wjg.v27.i27.4298
- [19] Pang, Y., Holmes, M. V., Chen, Z., & Kartsonaki, C. (2019). A review of lifestyle, metabolic risk factors, and blood-based biomarkers for early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 34(2), 330–345.
doi:10.1111/jgh.14576
- [20] Raptis, D. A., Fessas, C., Belasyse-Smith, P., & Kurzwinski, T. R. (2010). Clinical presentation and waiting time targets do not affect prognosis in patients with pancreatic cancer. *The surgeon: journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, 8(5), 239–246.
doi: 10.1016/j.surge.2010.03.001

- [21] Muzio, G., Maggiora, M., Paiuzzi, E., Oraldi, M., & Canuto, R. A. (2012). Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free radical biology & medicine*, 52(4), 735–746.
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.033
- [22] Ma, I., Allan, A.L. (2011). The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* 7, 292–306.
doi:10.1007/s12015-010-9208-4
- [23] Dinavahi, S. S., Bazewicz, C. G., Gowda, R., & Robertson, G. P. (2019). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*, 40(10), 774–789.
doi:10.1016/j.tips.2019.08.002
- [24] Shortall, K., Djeghader, A., Magner, E., & Soulimane, T. (2021). Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 659550.
doi:10.3389/fmolb.2021.659550
- [25] Voulgaridou, G.-P., Kiziridou, M., Mantso, T., Chlichlia, K., Galanis, A., Koukourakis, M. I., Franco, R., Panayiotidis, M. I., & Pappa, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 3A1 promotes multi-modality resistance and alters gene expression profile in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 77, 120–128.
doi:10.1016/j.biocel.2016.06.004
- [26] Terzuoli, E., Bellan, C., Aversa, S., Ciccone, V., Morbidelli, L., Giachetti, A., Donnini, S., & Ziche, M. (2019). ALDH3A1 Overexpression in Melanoma and Lung Tumors Drives Cancer Stem Cell Expansion, Impairing Immune Surveillance through Enhanced PD-L1 Output. *Cancers*, 11(12), 1963.
doi:10.3390/cancers11121963
- [27] Duong, H.-Q., You, K., Oh, S., Kwak, S.-J., & Seong, Y.-S. (2017). Silencing of NRF2 reduces the expression of ALDH1A1 and ALDH3A1 and sensitizes to 5-fu in pancreatic cancer cells. *Antioxidants*, 6(3), 52.
doi:10.3390/antiox6030052
- [28] Matsumoto, R., Hamada, S., Tanaka, Y., Taguchi, K., Yamamoto, M., & Masamune, A. (2021). Nuclear factor erythroid 2–related factor 2 depletion sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine via aldehyde dehydrogenase 3A1 repression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 379(1), 33–40. doi:10.1124/jpet.121.000744
- [29] Yi, Y. W., Park, N. Y., Park, J. I., Seong, Y. S., & Hong, Y. B. (2021). Doxycycline potentiates the anti-proliferation effects of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *American journal of cancer research*, 11(7), 3515–3536.
- [30] Gasparetto, M., Sekulovic, S., Brocker, C., Tang, P., Zakaryan, A., Xiang, P., Kuchenbauer, F., Wen, M., Kasaian, K., Witty, M. F., Rosten, P., Chen, Y., Imren, S., Duester, G., Thompson, D. C., Humphries, R. K., Vasiliou, V., & Smith, C. (2012).

- Aldehyde dehydrogenases are regulators of hematopoietic stem cell numbers and B-cell development. *Experimental Hematology*, 40(4). doi:10.1016/j.exphem.2011.12.006
- [31] Qu, Y., He, Y., Yang, Y., Li, S., An, W., Li, Z., Wang, X., Han, Z., & Qin, L. (2020). ALDH3A1 acts as a prognostic biomarker and inhibits the epithelial mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Journal of Cancer*, 11(9), 2621–2631. doi:10.7150/jca.40171
- [32] Pappa, A., Chen, C., Koutalos, Y., Townsend, A. J., & Vasiliou, V. (2003). ALDH3A1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(9), 1178–1189. doi:10.1016/s0891-5849(03)00070-4
- [33] Yan, J., De Melo, J., Cutz, J. C., Aziz, T., & Tang, D. (2014). Aldehyde dehydrogenase 3A1 associates with prostate tumorigenesis. *British journal of cancer*, 110(10), 2593–2603. doi:10.1038/bjc.2014.201
- [34] Voulgaridou, G. P., Tsochantaridis, I., Mantso, T., Franco, R., Panayiotidis, M. I., & Pappa, A. (2017). Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1) exhibits chaperone-like function. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 89, 16–24. doi:10.1016/j.biocel.2017.05.017
- [35] Black, W., Chen, Y., Matsumoto, A., Thompson, D. C., Lassen, N., Pappa, A., & Vasiliou, V. (2012). Molecular mechanisms of ALDH3A1-mediated cellular protection against 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 1937–1944. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.050
- [36] Jang, J.-H., Bruse, S., Liu, Y., Duffy, V., Zhang, C., Oyamada, N., Randell, S., Matsumoto, A., Thompson, D. C., Lin, Y., Vasiliou, V., Tesfaigzi, Y., & Nyunoya, T. (2014). Aldehyde dehydrogenase 3A1 protects airway epithelial cells from cigarette smoke-induced DNA damage and cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 80–86. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.028
- [37] Lassen, N., Pappa, A., Black, W. J., Jester, J. V., Day, B. J., Min, E., & Vasiliou, V. (2006). Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(9), 1459–1469. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.009
- [38] Chen, Y., Thompson, D. C., Koppaka, V., Jester, J. V., & Vasiliou, V. (2013). Ocular aldehyde dehydrogenases: Protection against ultraviolet damage and maintenance of transparency for vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 33, 28–39.

doi:10.1016/j.preteyeres.2012.10.001

- [39] Khanna, M., Chen, C.-H., Kimble-Hill, A., Parajuli, B., Perez-Miller, S., Baskaran, S., Kim, J., Dria, K., Vasiliou, V., Mochly-Rosen, D., & Hurley, T. D. (2011). Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43486–43494.
doi:10.1074/jbc.m111.293597
- [40] Fan, F., Yin, R., Wang, L., Zhao, S., Lv, D., Yang, K., Geng, S., Yang, N., Zhang, X., & Wang, H. (2021). ALDH3A1 driving tumor metastasis is mediated by p53/BAG1 in lung adenocarcinoma. *Journal of Cancer*, 12(16), 4780–4790.
doi:10.7150/jca.58250
- [41] Kim, J., Shin, J. H., Chen, C. H., Cruz, L., Farnebo, L., Yang, J., Borges, P., Kang, G., Mochly-Rosen, D., & Sunwoo, J. B. (2017). Targeting aldehyde dehydrogenase activity in head and neck squamous cell carcinoma with a novel small molecule inhibitor. *Oncotarget*, 8(32), 52345–52356.
doi:10.18632/oncotarget.17017
- [42] Parajuli, B., Fishel, M. L., & Hurley, T. D. (2014). Selective ALDH3A1 inhibition by benzimidazole analogues increase mafosfamide sensitivity in cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(2), 449–461.
doi:10.1021/jm401508p
- [43] Moreb, J. S., Muhoczy, D., Ostmark, B., & Zucali, J. R. (2006). RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1a1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 59(1), 127–136.
doi:10.1007/s00280-006-0233-6
- [44] Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., & Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(6), 697–720.
doi:10.1517/17425255.4.6.697
- [45] Kim, B., Lee, H. J., Choi, H. Y., Shin, Y., Nam, S., Seo, G., Son, D. S., Jo, J., Kim, J., Lee, J., Kim, J., Kim, K., & Lee, S. (2007). Clinical validity of the lung cancer biomarkers identified by bioinformatics analysis of public expression data. *Cancer research*, 67(15), 7431–7438.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0003
- [46] Zhou, L., Sheng, D., Wang, D., Ma, W., Deng, Q., Deng, L., & Liu, S. (2018). Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. *Cell Biology and Toxicology*, 35(2), 161–177.
doi:10.1007/s10565-018-9444-y
- [47] Liu, Y., Koyutürk, M., Barnholtz-Sloan, J. S., & Chance, M. R. (2012). Gene interaction enrichment and network analysis to identify dysregulated pathways

- and their interactions in complex diseases. *BMC Systems Biology*, 6(1). doi:10.1186/1752-0509-6-65
- [48] Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development*, 17(18), 2205–2232. doi:10.1101/gad.1102703
- [49] Kim, J. H., & Kim, N. (2014). Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *Journal of bone metabolism*, 21(4), 233–241. doi:10.11005/jbm.2014.21.4.233
- [50] Simonett, S. P., Shin, S., Herring, J. A., Bacher, R., Smith, L. A., Dong, C., Rabaglia, M. E., Stapleton, D. S., Schueler, K. L., Choi, J., Bernstein, M. N., Turkewitz, D. R., Perez-Cervantes, C., Spaeth, J., Stein, R., Tessem, J. S., Kendzioriski, C., Keleş, S., Moskowitz, I. P., Keller, M. P., ... Attie, A. D. (2021). Identification of direct transcriptional targets of NFATC2 that promote β cell proliferation. *The Journal of clinical investigation*, 131(21), e144833. doi:10.1172/JCI144833
- [51] Chen, N. M., Singh, G., Koenig, A., Liou, G. Y., Storz, P., Zhang, J. S., Regul, L., Nagarajan, S., Kühnemuth, B., Johnsen, S. A., Hebrok, M., Siveke, J., Billadeau, D. D., Ellenrieder, V., & Hessmann, E. (2015). NFATc1 Links EGFR Signaling to Induction of Sox9 Transcription and Acinar-Ductal Transdifferentiation in the Pancreas. *Gastroenterology*, 148(5), 1024–1034.e9. doi:10.1053/j.gastro.2015.01.033
- [52] Rudolf, R., Busch, R., Patra, A. K., Muhammad, K., Avots, A., Andrau, J. C., Klein-Hessling, S., & Serfling, E. (2014). Architecture and expression of the *nfatc1* gene in lymphocytes. *Frontiers in immunology*, 5, 21. doi:10.3389/fimmu.2014.00021
- [53] Goodyer, W. R., Gu, X., Liu, Y., Bottino, R., Crabtree, G. R., & Kim, S. K. (2012). Neonatal β cell development in mice and humans is regulated by calcineurin/NFAT. *Developmental cell*, 23(1), 21–34. doi:10.1016/j.devcel.2012.05.014
- [54] Hasselluhn, M. C., Schmidt, G. E., Ellenrieder, V., Johnsen, S. A., & Hessmann, E. (2019). Aberrant NFATc1 signaling counteracts TGF β -mediated growth arrest and apoptosis induction in pancreatic cancer progression. *Cell death & disease*, 10(6), 446. doi:10.1038/s41419-019-1682-2
- [55] Patil, S., Forster, T., Reutlinger, K., Kopp, W., Verseemann, L., Spitalieri, J., Gaedcke, J., Ströbel, P., Singh, S. K., Ellenrieder, V., Neesse, A., & Hessmann, E. (2021). Chromatin-Independent Interplay of NFATc1 and EZH2 in Pancreatic Cancer. *Cells*, 10(12), 3463. doi:10.3390/cells10123463
- [56] Wu, Y., Krölller, L., Miao, B., Boekhoff, H., Bauer, A. S., Büchler, M. W., Hackert, T., Giese, N. A., Taipale, J., & Hoheisel, J. D. (2021). Promoter hypermethylation promotes the binding of transcription factor NFATC1, triggering oncogenic gene

- activation in pancreatic cancer. *Cancers*, 13(18), 4569. doi:10.3390/cancers13184569
- [57] Heit, J. J., Apelqvist, Å. A., Gu, X., Winslow, M. M., Neilson, J. R., Crabtree, G. R., & Kim, S. K. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic β -cell growth and function. *Nature*, 443(7109), 345–349. doi:10.1038/nature05097
- [58] Wong, C. H., Li, Y. J., & Chen, Y. C. (2016). Therapeutic potential of targeting acinar cell reprogramming in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(31), 7046–7057. doi:10.3748/wjg.v22.i31.7046
- [59] Murray, O. T., Wong, C. C., Vrankova, K., & Rigas, B. (2014). Phospho-sulindac inhibits pancreatic cancer growth: NFATc1 as a drug resistance candidate. *International journal of oncology*, 44(2), 521–529. doi:10.3892/ijo.2013.2190
- [60] Mancini, M., & Toker, A. (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nature reviews. Cancer*, 9(11), 810–820. doi:10.1038/nrc2735
- [61] Schmid, R. M., & Siveke, J. T. (2013). Approach to cystic lesions of the pancreas. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(3-4), 44–50. doi:10.1007/s10354-013-0244-y
- [62] Pancreatic cancer treatment (adult) (PDQ®)—patient version. National Cancer Institute. (n.d.). Retrieved May 4, 2022, from <https://www.cancer.gov/types/pancreatic/patient/pancreatic-treatment-pdq>
- [63] Krieger, T.G., Le Blanc, S., Jabs, J. et al. (2021) Single-cell analysis of patient-derived PDAC organoids reveals cell state heterogeneity and a conserved developmental hierarchy. *Nature Communications*, 12, 5826. doi:10.1038/s41467-021-26059-4
- [64] Parajuli, B., Georgiadis, T. M., Fishel, M. L., & Hurley, T. D. (2014). Development of selective inhibitors for human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1) for the enhancement of cyclophosphamide cytotoxicity. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 15(5), 701–712. doi:10.1002/cbic.201300625
- [65] Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [66] Crane, A. M., & Bhattacharya, S. K. (2013). The Use of Bromodeoxyuridine Incorporation Assays to Assess Corneal Stem Cell Proliferation. *Corneal Regenerative Medicine*, 65–70. doi:10.1007/978-1-62703-432-6_4

[67] Franken, Nicolaas A P; Rodermond, Hans M; Stap, Jan; Haveman, Jaap; van Bree, Chris (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. , 1(5), 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339

6.1. Βιβλιογραφία Εικόνες

Εικόνα 2: Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*, 20(10), 1218–1249. doi:10.1101/gad.1415606

Εικόνα 5: Winslow, T. (2010). *Pancreas Anatomy*. National Cancer Institute. Retrieved February 20, 2022, from <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=8295>

Εικόνα 6: UniProtKB/Swiss-Prot (Ed.). (2021, September 29). *Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring*. UniProt Consortium European Bioinformatics Institute Protein Information Resource SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved February 27, 2022, from <https://www.uniprot.org/uniprot/P30838>

Εικόνα 8: Khanna, M., Chen, C.-H., Kimble-Hill, A., Parajuli, B., Perez-Miller, S., Baskaran, S., Kim, J., Dria, K., Vasiliou, V., Mochly-Rosen, D., & Hurley, T. D. (2011). Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 43486–43494. doi:10.1074/jbc.m111.293597

Εικόνα 11: NFAC1_HUMAN (2022). *UniProtKB/Swiss-Prot*. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/O95644>