



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**«Ο ρόλος του SMAD4 στο μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο»**

**ΠΑΡΑΛΥΚΙΔΟΥ ΙΣΙΔΩΡΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας  
(Επιβλέπων)

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**, Καθηγήτρια Γενετικής Παν/μιου Θεσσαλίας  
(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ** Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας  
(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

**ΛΑΡΙΣΑ, 2018**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«SMAD4 in metastatic pancreatic cancer»**

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Δήμα.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος, κ. Ασπασία Τσέζου, για τη δημιουργία και το συντονισμό ενός τόσο ενδιαφέροντος προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών, αλλά και για τον εμπλουτισμό του προγράμματος αυτού με διαλέξεις επιστημόνων με υψηλό ακαδημαϊκό και ερευνητικό υπόβαθρο στο ενεργητικό τους.

Επίσης, οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, κ. Κωνσταντίνο Δήμα για την προσπάθεια, την υπομονή, την επιμονή, την πολύτιμη καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Σερέτη, για την καθοδήγηση, τις συμβουλές, και τις γνώσεις που μου προσέφερε και οι οποίες συνεισέφεραν θετικά στην επιτυχή διεκπεραίωση και εμπέδωση των πειραματικών τεχνικών που διδάχθηκα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους χειρουργούς Δημήτριο Ζαχαρούλη και Δημήτριο Μαγουλιώτη για την χορήγηση των παγκρεατικών καρκινικών και των γειτνιαζόντων υγείων ιστών.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω το διευθυντή του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, κ. Σακελλαρίδη Νικόλαο, όπως επίσης και τους λοιπούς συνεργάτες: Ασπροδίνη Ευτυχία, Μπέγα Ηλία, Πίτσικα Νικόλαο, για την καθοριστική τους βοήθεια στην εκπόνηση της εργασίας.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω και να ευχαριστήσω από καρδιάς τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Στεφανία Καλογερά, καθώς και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Καλαϊτζίδου Ελισάβετ Κοτζιακοζίδου Βιβή, για το χαρούμενο, αισιόδοξο και φιλικό πνεύμα τους, που αποτέλεσε σημαντικό στήριγμα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Φαρμακολογίας.

## Περίληψη

Η πρωτεΐνη Smad4 κωδικοποιείται από το ογκοκασταλτικό γονίδιο Smad4 και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Smad, μια οικογένεια, που περιλαμβάνει 8 πρωτεΐνες-μέλη. Το μονοπάτι, στο οποίο εμπλέκεται, είναι το μονοπάτι του TGFβ. Συγκεκριμένα, με την πρόσδεση του TGFβ, ενεργοποιούνται οι υποδοχείς του, οι οποίοι με τη σειρά τους στρατολογούν το σύμπλοκο πρωτεϊνών Smad2/3. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες Smad2/3 δημιουργούν σύμπλοκο με την Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου η Smad4 αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες και επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων.

Καθώς έχει βρεθεί ότι το μονοπάτι του TGFβ εμπλέκεται στον παγκρεατικό καρκίνο, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη και η αξιολόγηση της έκφρασης των πρωτεϊνών TGFβ, Smad2, Smad3 & Smad4 σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γειτνιάζοντες φυσιολογικούς ιστούς, οι οποίοι απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος.

Για το σκοπό αυτό, παραλήφθηκαν καρκινικοί και γειτνιάζοντες φυσιολογικοί ιστοί, στους οποίους, αρχικά, πραγματοποιήθηκε λύση. Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με στατιστική ανάλυση (Δοκιμασία T-test).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες TGFβ, Smad2 Smad3 & Smad4 υπερεκφράζονται στους καρκινικούς ιστούς ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς.

## Abstract

Smad4 protein belongs to Smad family, which consists of 8 proteins and is encoded by the tumor-suppressor gene, Smad4. This protein is involved in TGF-beta signaling pathway. Specifically, when TGF-beta binds to his receptors, they activate Smad2/3 complex, which activates, in turn, Smad4. The complex Smad2/3-Smad4, which is formed, is transported into the nucleus, where Smad4 interacts with transcription factors and induce the expression of specific genes.

It is well known that TGF-beta signaling pathway is involved in pancreatic cancer. So, the purpose of this thesis is to research and to evaluate expression's levels of TGF-beta, Smad2, Smad3 & Smad4 proteins in cancerous and healthy tissues, which were derived from patients with pancreatic cancer.

For this purpose, cancerous and healthy tissues were isolated and were homogenized with the appropriate lysis solution. Afterwards, the measurement of the concentration of total protein of each sample was held by Bradford assay. Western Blot was used to determine the expression's levels of TGF-beta, Smad2, Smad3 & Smad4 proteins. Finally, the results were evaluated by statistical analysis.

The results of this work showed overexpression of TGF-beta, Smad2, Smad3 & Smad4 proteins in cancerous tissues compared to healthy tissues.

## Περιεχόμενα

Σκοπός.....	7
Εισαγωγή.....	8
A. Καρκίνος.....	8
A1. Ορόσημα του καρκίνου .....	8
A2. Στάδια καρκίνου .....	14
A3. Επιδημιολογία.....	14
B. Πάγκρεας.....	16
B1. Θέση.....	16
B2. Μορφολογία και λειτουργίες.....	17
B3. Καρκίνος του παγκρέατος.....	18
Επιδημιολογία και συμπτώματα .....	18
Γενετική Βάση .....	19
Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	20
Διάγνωση και Θεραπεία .....	21
Πρόδρομες αλλοιώσεις .....	21
Σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του παγκρέατος.....	23
Γ. Μονοπάτι TGFβ .....	24
Δ. TGF-beta (Transforming Growth Factor – β).....	26
Δ1. Γενικά.....	26
Δ2. Μέλη οικογένειας.....	26
Δ3. Ισομορφές & Λειτουργία .....	26
Δ4. Βιοσύνθεση & σηματοδοτικό μονοπάτι .....	27
E. Πρωτεΐνες Smad.....	27
E1. Μέλη οικογένειας.....	27
E2. Δομή.....	29
E3. Ρύθμιση των επιπέδων των R-Smad .....	31
ΣΤ. Το μονοπάτι του TGFβ στον παγκρεατικό καρκίνο .....	31
ΣΤ1. Το μονοπάτι του TGFβ ως ογκοκατασταλτικό.....	31
ΣΤ2. Ο TGFβ ως υποκινητής της καρκινογένεσης.....	32
Ζ. Η Smad4 στον παγκρεατικό καρκίνο .....	34
Η. Η χρήση των πρωτεϊνών TGFβ & Smad4 ως προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του παγκρέατος.....	35
Θ. TGFβ/Smad4: Στόχοι Θεραπείας .....	35
Υλικά και Μέθοδοι.....	37
A. Υλικά.....	37

B. Διαλύματα .....	38
Γ. Μέθοδοι.....	40
1. Λύση ιστών.....	40
2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Ανάλυση Bradford).....	41
3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδης – SDS .....	42
4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με την τεχνική Western Blot.....	44
5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης μετά από ανάπτυξη σήματος με χημειοφωταύγεια .....	46
6. Στατιστική ανάλυση.....	46
Αποτελέσματα .....	48
Συζήτηση .....	54
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>60</b>

## Σκοπός

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών TGFβ, Smad2, Smad3 & Smad4 σε υγιείς και καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν συστατικά του μονοπατιού του TGFβ. Σκοπός της, λοιπόν, είναι η σύγκριση και η αξιολόγηση των αλλαγών, που συμβαίνουν στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών, κατά τη διάρκεια μετατροπής ενός φυσιολογικού ιστού σε καρκινικό, καθώς και ο τρόπος, με τον οποίο οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν την επιθετικότητα του όγκου.



# Εισαγωγή

## A. Καρκίνος

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται κάτω από τον έλεγχο συγκεκριμένων μορίων. Όταν υφίστανται βλάβες ή γερνούν, υπόκεινται σε απόπτωση και αντικαθίστανται από νέα κύτταρα. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute, NCI), ο καρκίνος αποτελεί μία πολυπαραγοντική γενετική ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται πέραν του φυσιολογικού και να εξαπλώνονται σε παρακείμενους ή απομακρυσμένους ιστούς και όργανα του σώματος.

### Καλοήθης Vs Κακοήθης

Οι όγκοι που αναπτύσσονται διακρίνονται σε καλοήθεις και κακοήθεις με βάση τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά τους. Ένας καλοήθης όγκος (benign) έχει μικρό μέγεθος και αποτελείται από λειτουργικά κύτταρα. Επίσης, χαρακτηρίζεται από αργό ρυθμό πολλαπλασιασμού είναι μη διηθητικός και μη μεταστατικός.

Αντίθετα, ένας κακοήθης όγκος αποτελείται από κύτταρα με γρήγορο ρυθμό διαίρεσης, τα οποία σύντομα μετατρέπονται σε διηθητικά και μεταστατικά, με αποτέλεσμα να εισέρχονται σε παρακείμενους ιστούς και να σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους.

### A1. Ορόσημα του καρκίνου

Η κύρια διαφορά των καρκινικών κυττάρων από τα φυσιολογικά είναι η ανεξέλεγκτη διαίρεση των κυττάρων και η αυξημένη διεισδυτικότητά τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο διαφοροποιημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά με αποτέλεσμα να αποδιαφοροποιούνται ευκολότερα. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν μία μοναδική ικανότητα να αυξάνονται και να πολλαπλασιάζονται παραβλέποντας σημαντικά σημεία ελέγχου.



Εικόνα 1: Τα δέκα ορόσημα του καρκίνου<sup>1</sup>

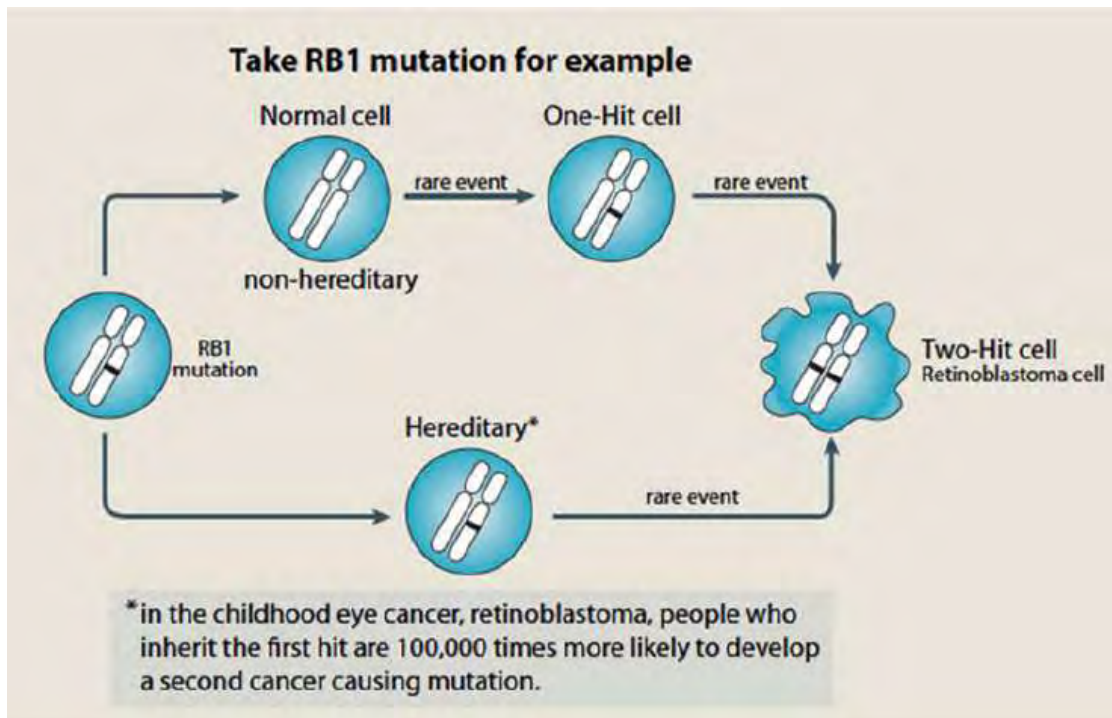
## 1. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός

Φυσιολογικά, η παραγωγή και η απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων ελέγχεται με ποικίλους τρόπους από τα κύτταρα, διασφαλίζοντας την ομοιόστασή τους και τη διατήρηση της δομής των ιστών που σχηματίζουν.<sup>1</sup> Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα, υπερπαράγοντας, από τη μία πλευρά, αυξητικούς παράγοντες. Αυτοί, με τη σειρά τους, μεταφέρουν το σήμα στο εσωτερικό των κυττάρων, με τη βοήθεια των υποδοχέων τους, οδηγώντας, στη μεταγραφή γονιδίων, στην παραγωγή πρωτεϊνών και διεγείροντας, τελικά, την κυτταρική διαίρεση. Από την άλλη πλευρά, μεταλλάσσουν τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι λειτουργούν ως υποδοχείς κινασών τυροσίνης, διατηρώντας την αυτοκρινή διέγερση πολλαπλασιασμού.<sup>1</sup> Πιο συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα δημιουργούν μεταλλάξεις στους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, ώστε να παραμένουν ενεργοποιημένοι, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή ακόμα και απουσία του προσδέτη τους. Η συνεχής ενεργοποίηση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων οδηγεί στη συνεχή μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα φέρουν σωματικές ενεργοποιητικές μεταλλάξεις σε πρωτείνες, που ενεργοποιούν επιπλέον μονοπάτια που βρίσκονται καθοδικά του υποδοχέα αυξητικών παραγόντων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η πρωτεΐνη B-raf, η οποία, με τη σειρά της, ενεργοποιεί το μονοπάτι MAP-kinase<sup>2</sup>, καθώς και η PI3-kinase, που ενεργοποιεί το μονοπάτι Akt/PKB<sup>3</sup>.

Ακόμη, η απορρύθμιση των μηχανισμών αρνητικής ανατροφοδότησης των κυττάρων οδηγεί στο συνεχή πολλαπλασιασμό τους. Τέτοια μόρια είναι τα ογκογονίδια ras, η φωσφατάση PTEN και η κινάση mTOR, τα οποία με την ενεργοποίησή τους ενεργοποιούν έναν καταρράκτη σηματοδοτικών μορίων και μονοπατιών, που οδηγούν στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η απορρύθμιση των παραπάνω μορίων σχετίζεται με την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα αντικαρκινικά φάρμακα.<sup>1</sup>

## 2. Απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Από την άλλη πλευρά, τα καρκινικά κύτταρα απενεργοποιούν παράγοντες καταστολής της διαίρεσης, οι οποίοι φυσιολογικά αναστέλλουν τη διαίρεση των κυττάρων. Τα γονίδια αυτά είναι γνωστά ως ογκοκατασταλτικά γονίδια και εμπλέκονται στην παρεμπόδιση της μη φυσιολογικής κυτταρικής διαίρεσης ή οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο όταν οι μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό δεν μπορούν να διορθωθούν. Με την απενεργοποίηση των παραγόντων καταστολής, τα καρκινικά κύτταρα υπόκεινται σε συνεχείς ανεξέλεγκτες διαιρέσεις, χωρίς το γενετικό υλικό να υπόκειται σε επιδιορθωτικό έλεγχο με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται μεταλλάξεις. Τα πιο γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι το p53, γνωστό και ως «φύλακας του γενώματος» και το RB.<sup>1</sup> Γνωστή είναι η «υπόθεση δύο χτυπημάτων» του Knudson, η οποία διατυπώθηκε από τον Alfred Knudson, το 1971. Σύμφωνα με την υπόθεση, οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια χαρακτηρίζονται από απώλεια λειτουργίας και κληρονομούνται ως υπολειπόμενες, δηλαδή για να εκφράσουν το φαινότυπο θα πρέπει και τα δύο αλληλόμορφα να είναι μεταλλαγμένα. Στις περιπτώσεις αυτές, αρχικά, ανιχνεύεται μία πρώτη, συνήθως σημειακή, μετάλλαξη, η οποία ακολουθείται από ένα δεύτερο «χτύπημα», τις περισσότερες φορές, διαγραφή του δεύτερου αλληλόμορφου, οδηγώντας σε απώλεια ετεροζυγωτίας.<sup>4</sup>



Εικόνα 2: Η υπόθεση των δύο χτυπημάτων του Knudson.<sup>4</sup>

### 3. Αποφυγή του κυτταρικού θανάτου

Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων οφείλεται, επίσης και στην αποφυγή της απόπτωσης, η οποία μπορεί να προκύψει με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αποφεύγουν την απόπτωση είναι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη p53, γνωστή ως «φύλακας του γενώματος». Φυσιολογικά, η πρωτεΐνη p53 δρα κατά τη μετάβαση της φάσης G1 στην φάση S και όταν ανιχνεύσει κάποια βλάβη στο γενετικό υλικό, σταματάει τον κυτταρικό κύκλο, με σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών. Σε περίπτωση, που η βλάβη δε διορθώνεται, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Στην περίπτωση του καρκίνου, η μεταλλαγμένη p53 χάνει την ικανότητα να ενεργοποιεί την απόπτωση των κυττάρων που φέρουν βλάβες, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών και τη συσσώρευση των βλαβών στο γενετικό υλικό. Ένας ακόμη σημαντικός τρόπος αποφυγής της απόπτωσης είναι η αυξημένη παραγωγή αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (όπως η Bcl2) ή σημάτων, που συμμετέχουν στην επιβίωση του κυττάρου, μειώνοντας, με αυτό τον τρόπο την έκφραση προαποπτωτικών παραγόντων.<sup>1</sup>

Επίσης, η αναστολή της απόπτωσης αποτελεί ένα ακόμα τρόπο επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Φυσιολογικά, η επικράτεια BH3 της πρωτεΐνης Beclin-1 ανιχνεύει το οξειδωτικό στρες και επιτρέπει στην πρωτεΐνη Beclin-1 να πυροδοτήσει την αυτοφαγία.<sup>1</sup> Έχει βρεθεί ότι, ποντίκια με απενεργοποιημένα και τα δύο αλληλόμορφα της πρωτεΐνης Beclin-1 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ανάπτυξη καρκίνου.<sup>5</sup>

### 4. Ενεργοποίηση της τελομεράσης

Τα κύτταρα φέρουν στα άκρα των χρωμοσωμάτων τους πολλαπλές επαναλήψεις εξανουκλεοτιδίων, τα λεγόμενα τελομερή, τα οποία προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων.<sup>6,7</sup> Φυσιολογικά, τα τελομερή μικραίνουν σε μήκος, στο τέλος κάθε κύκλου αντιγραφής. Μετά από ένα συγκεκριμένο αριθμό κύκλων αντιγραφής, τα

τελομερή φτάνουν σε ένα κρίσιμο όριο μήκους, τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται και επέρχεται αναδιπλασιαστική γήρανση (Senescence). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, τα φυσιολογικά κύτταρα δεν εκφράζουν την εξειδικευμένη DNA πολυμεράση - τελομεράση, η οποία προσθέτει τελομερή στο τέλος των χρωμοσωμάτων. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση του ενζύμου τελομεράση, η οποία ανιχνεύει τη μείωση του αριθμού των τελομερών και αντικαθιστά τον αριθμό των επαναλήψεων που χάθηκε μετά το τέλος της αντιγραφής. Με την έκφραση της τελομεράσης, τα καρκινικά κύτταρα εξασφαλίζουν τη συνέχιση της διαίρεσης τους και την αποφυγή της γήρανσης.<sup>1</sup>

### 5. Αγγειογένεση

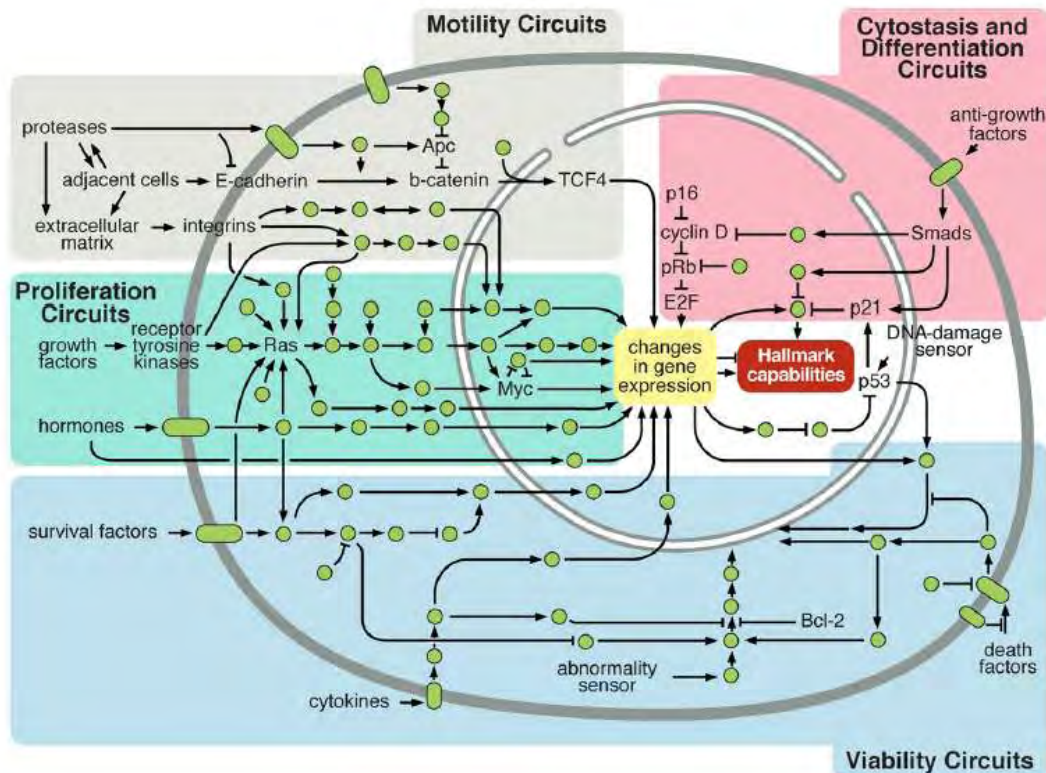
Η συνεχής αγγειογένεση στις περιοχές, που υπάρχει ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων, είναι ένα ακόμα χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης. Λόγω της μεγάλης ανάγκης των καρκινικών κυττάρων σε θρεπτικά υλικά και οξυγόνο, η επέκταση των αγγείων είναι ζωτικής σημασίας.<sup>1</sup> Στην ενεργοποίηση της αγγειογένεσης συμμετέχουν σηματοδοτικές πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται σε διεγερτικούς ή ανασταλτικούς υποδοχείς, επάγοντας ή αναστέλλοντας την αγγειογένεση, αντίστοιχα. Από τη μία πλευρά, υπάρχουν οι προ-αγγειογενετικοί παράγοντες, οι οποίοι αυξάνονται και προάγουν την αγγειογένεση και από την άλλη πλευρά, υπάρχουν οι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες, οι οποίοι μειώνονται κατά την αγγειογένεση<sup>8</sup>. Ένας σημαντικός προαγγειογενετικός παράγοντας είναι ο VEGF, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο VEGF-A και κύρια λειτουργία του είναι η ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων κατά την εμβρυογένεση και αργότερα η διατήρηση της ομοιόστασης των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>1</sup>. Έχει βρεθεί, ότι σε συνθήκες υποξίας ή μετά από ενεργοποίηση ογκογονιδίων επάγεται η έκφραση του VEGF<sup>9,10</sup>. Αντίθετα, η πρωτεΐνη TSP-1, ως αντι-αγγειογενετικός παράγοντας, προσδένεται σε υποδοχείς και οδηγεί στη καταστολή της αγγειογένεσης.<sup>1</sup>

### 6. Ενεργοποίηση διήθησης και μετάστασης

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν από την κύρια μάζα του όγκου σε άλλους ιστούς, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η μετατροπή των καρκινικών κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά, μια διαδικασία γνωστή ως επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση επιτρέπει στα κύτταρα τη διήθηση και την αντοχή στην απόπτωση.<sup>11,12</sup> Κατά την EMT, παρατηρούνται αλλαγές στη μορφολογία καθώς και στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα υπόλοιπα κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μείωση της έκφρασης της E-cadherin, μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στην προσκόλληση των κυττάρων. Φυσιολογικά, η έκφρασή της είναι αυξημένη, αναστέλλοντας την ικανότητα διήθησης των κυττάρων και επιτρέποντας την αλληλεπίδραση των κυττάρων με τη δημιουργία κυτταρικών συνδέσμων.<sup>13</sup> Ακόμα, έχει διαπιστωθεί η αύξηση της έκφρασης της N-cadherin, η οποία, φυσιολογικά, εκφράζεται μόνο σε νευρώνες που μεταναστεύουν καθώς και σε μεσεγχυματικά κύτταρα κατά τη διαδικασία της οργανογένεσης.<sup>14</sup>

Μετά τη μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, τα μεσεγχυματικά κύτταρα, εισέρχονται στην περιφερική (αιματική ή λεμφική) κυκλοφορία και στη συνέχεια εισβάλλουν στους ιστούς, μέσω της διαδικασίας της εξαγγείωσης. Στους νέους ιστούς, τα καρκινικά κύτταρα επανέρχονται στη επιθηλιακή τους μορφή και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, δημιουργώντας, αρχικά,

μικρά οξίδια καρκινικών κυττάρων (μικρομετάσταση), τα οποία στη συνέχεια, αυξάνονται περαιτέρω δημιουργώντας μακροσκοπικούς όγκους, μια διαδικασία γνωστή ως αποικισμός (colonization).<sup>1</sup>



Εικόνα 3: Τα ενδογενή σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τις λειτουργίες του καρκινικού κυττάρου.<sup>1</sup>

## 7. Γενωμική αστάθεια

Για την εξέλιξη της ογκογένεσης, απαιτείται η αύξηση των επιπέδων της μεταλλαξιγένεσης.<sup>15</sup> Αρχικά, τα κύτταρα, πριν μετασχηματιστούν σε καρκινικά, εμφανίζουν ευαισθησία σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες, καθώς χάνουν ένα ή περισσότερα ένζυμα που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση και γενικότερα στην προστασία του DNA. Η αυξημένη μεταλλαξιγένεση μπορεί να οφείλεται στην ανεπάρκεια των κυτταρικών συστημάτων επιτήρησης για μεταλλάξεις, τα οποία, με την ανίχνευση κάποιας μετάλλαξης, οδηγούν το κύτταρο σε γήρανση ή απόπτωση. Χαρακτηριστικό σύστημα επιτήρησης αποτελεί η πρωτεΐνη p53. Ακόμη, έχουν παρατηρηθεί απενεργοποιητικές μεταλλάξεις ή επιγενετική αποσιώπηση σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, που εμπλέκονται στην ανίχνευση μεταλλάξεων και στην ενεργοποίηση επιδιορθωτικών ενζύμων ή στην απενεργοποίηση μεταλλαξιγόνων παραγόντων πριν προκαλέσουν καταστροφή του DNA.<sup>16</sup>

## 8. Χρόνια φλεγμονή

Ένας, ακόμη σημαντικός μηχανισμός, που μπορεί να ενεργοποιήσει την καρκινογένεση είναι η χρόνια φλεγμονή.<sup>1</sup> Η εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής σχετίζεται με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), οι οποίες αυξάνουν το ρυθμό μεταλλαξιγένεσης των γειτονικών καρκινικών κυττάρων<sup>17</sup>. Ακόμη, η ενεργοποίηση προφλεγμονωδών παραγόντων οδηγεί σε χρωμοσωμική και γενωμική αστάθεια. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η φλεγμονή παρατηρείται στα αρχικά

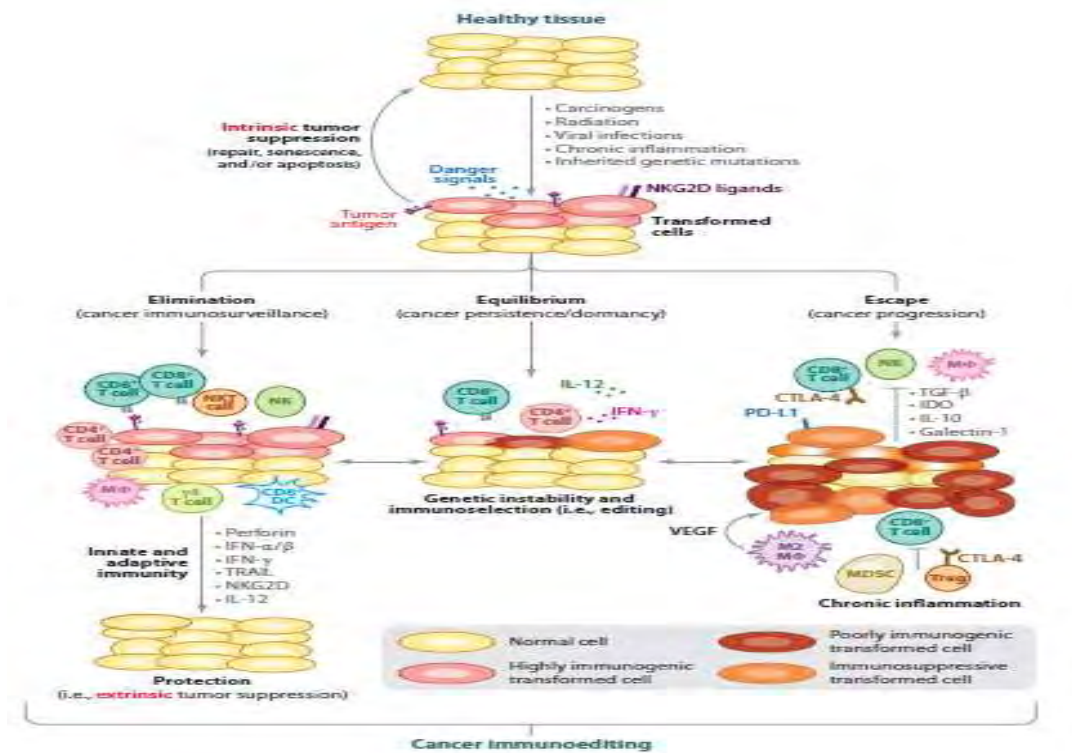
στάδια των κακοηθειών και επιτρέπει την εξέλιξη των αρχικών νεοπλασιών σε πλήρως αναπτυγμένους καρκίνους.<sup>17</sup>

### 9. Απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας και μεταβολισμού

Φυσιολογικά, κάτω από αερόβιες συνθήκες, τα κύτταρα μέσω της γλυκόλυσης μετατρέπουν τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό, το οποίο, στη συνέχεια μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα στα μιτοχόνδρια. Σύμφωνα με τον Otto Warburg, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα αερόβιας γλυκόλυσης, ακόμα και παρουσία οξυγόνου.<sup>1</sup> Η αυξημένη αερόβια γλυκόλυση επιτυγχάνεται, μέσω της αύξησης της έκφρασης των μεταφορέων γλυκόζης, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων.<sup>1,18,19</sup> Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ογκογονιδίων, όπως είναι το Ras, καθώς και οι συνθήκες υποξίας ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες HIF1a και HIF2a, οδηγώντας σε αυξημένη γλυκόλυση.<sup>19</sup> Με τους παραπάνω τρόπους, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν αμινοξέα και νουκλεοσίδια, που παράγονται από την αυξημένη αερόβια γλυκόλυση, σε βιοσυνθετικά μονοπάτια, που ενεργοποιούν την κυτταρική αύξηση και προωθούν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.<sup>1</sup>

### 10. Αποφυγή της ανοσοεπιτήρησης

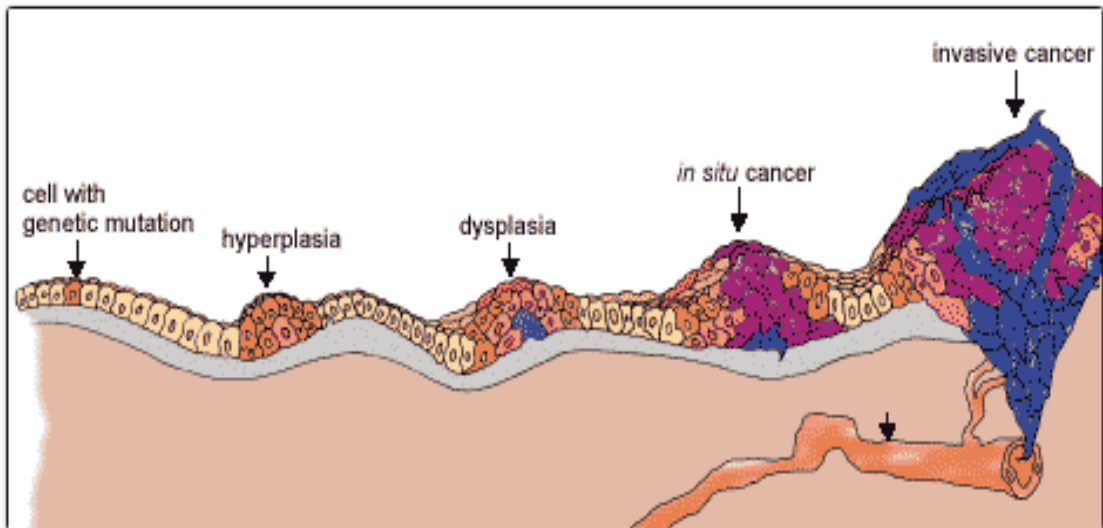
Φυσιολογικά, ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει ένα σύστημα ανοσοεπιτήρησης, το οποίο ανιχνεύει και καταστρέφει προ-καρκινικά κύτταρα (Elimination). Καθώς όμως τα προ-καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά αναπτύσσουν ιδιότητες που τους δίνουν την ικανότητα να διαφεύγουν από το μηχανισμό ανοσοεπιτήρησης (Escape).<sup>1</sup> Για την επίτευξη της ανοσοδιαφυγής, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αλλάζουν κυτταρικό φαινότυπο, να ενισχύουν παράγοντες που ενισχύουν άμεσα ή έμμεσα τους ανοσοκατασταλτικούς μηχανισμούς, αλλά και την έκκριση παραγόντων που ενισχύουν την νεοαγγειογένεση και εμποδίζουν τα ειδικά αντικαρκινικά λεμφοκύτταρα να δράσουν εναντίον του όγκου.<sup>20</sup>



Εικόνα 4: Τα 3 E's της ανοσοδιαφυγής των καρκινικών κυττάρων<sup>20</sup>

## A2. Στάδια καρκίνου

Αρχικά, ένα φυσιολογικό επιθήλιο υφίσταται συγκεκριμένες μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα να αρχίσει να πολλαπλασιάζεται. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί στη δημιουργία ενός υπερπλαστικού ιστού, ο οποίος μετατρέπεται σταδιακά σε δυσπλαστικό. Ένας δυσπλαστικός ιστός αποτελείται από ανώμαλα κύτταρα, που φέρουν μορφολογικά χαρακτηριστικά, που θυμίζουν νεόπλασμα. Καθώς ο δυσπλαστικός ιστός πολλαπλασιάζεται, μπορεί να είναι σποραδικός (*in situ* cancer) ή να διηθείται σε γειτονικούς ιστούς μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας ή της κυκλοφορίας του αίματος (*invasive cancer*).<sup>21</sup>



Εικόνα 5: Τα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου.<sup>21</sup>

## A3. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Πιο συγκεκριμένα, στις αναπτυγμένες χώρες, τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου όλο και αυξάνονται εξαιτίας της αύξησης του αριθμού και του προσδόκιμου ζωής του πληθυσμού της γης καθώς, επίσης, και της εγκαθίδρυσης ενός ανθυγιεινού τρόπου ζωής, στον οποίο η σωματική άσκηση και ο υγιεινή διατροφή έχουν αντικατασταθεί από το κάπνισμα, την παχυσαρκία και άλλες συνήθειες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου.<sup>22</sup> Παρακάτω, απεικονίζονται τα ποσοστά των πιο κοινών τύπων καρκίνου, παγκοσμίως, σε άνδρες και γυναίκες καθώς και τα εκτιμώμενα ποσοστά θανάτων.(Εικόνα 5)



Εικόνα 6: Οι πιο κοινά τύποι καρκίνου και τα ποσοστά θανάτου τους, παγκοσμίως, με βάση το φύλο.<sup>22</sup>

Έχει παρατηρηθεί ότι, οι χώρες με υψηλό βιοτικό επίπεδο και οικονομικό υπόβαθρο έχουν τα υψηλότερα ποσοστά όλων των τύπων καρκίνων σε σχέση με αυτές με χαμηλό ή μεσαίο βιοτικό και οικονομικό υπόβαθρο. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά θνησιμότητας στις πρώτες βρίσκονται σε ένα πλατό ή μειώνονται σταδιακά, λόγω της επαγρύπνησης των πολιτών από τους πιθανούς κινδύνους, της έγκαιρης διάγνωσης, αλλά και την εφαρμογή νέων θεραπειών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί, ότι στις χώρες με χαμηλό οικονομικό υπόβαθρο, οι άνθρωποι εμφανίζουν πολλούς τύπους καρκίνου, που σχετίζονται με μολύνσεις.<sup>23</sup>





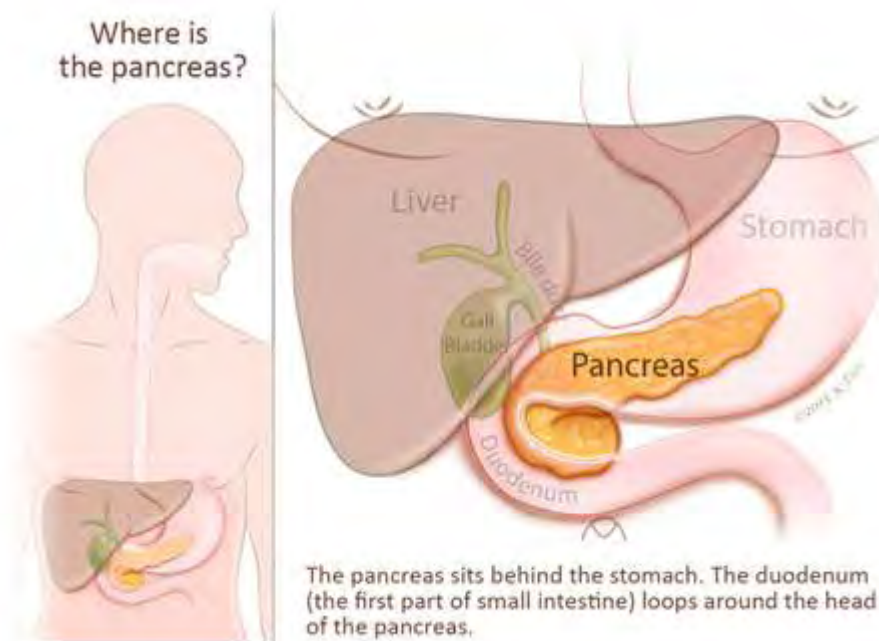


Εικόνα 7: Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου και τα ποσοστά θανάτου του κάθε τύπου καρκίνου, στις αναπτυγμένες και στις αναπτυσσόμενες χώρες, με βάση το φύλο.<sup>22</sup>

## B. Πάγκρεας

### B1. Θέση

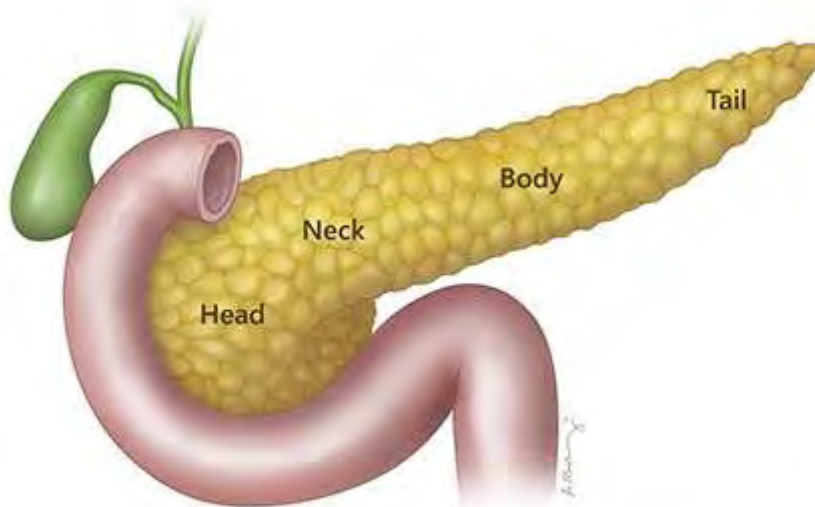
Το πάγκρεας είναι ένα όργανο ζωτικής σημασίας με δύο βασικές λειτουργίες: (1) ρυθμίζει τα ποσοστά της γλυκόζης στο αίμα (ενδοκρινής λειτουργία) και (2) συμμετέχει στην πέψη των τροφών (εξωκρινής λειτουργία). Εντοπίζεται βαθιά στην κοιλιακή χώρα πίσω από το στομάχι και περιβάλλεται από το λεπτό έντερο, το ήπαρ και τη χολή.<sup>24</sup>



Εικόνα 8: Η τοποθεσία του παγκρέατος σε σχέση με τα υπόλοιπα όργανα<sup>24</sup>

Το πάγκρεας χωρίζεται σε τρεις περιοχές. Η περιοχή που βρίσκεται κοντά στο σημείο σύνδεσης του στομάχου με το λεπτό έντερο ονομάζεται κεφαλή (head) και ο

βασικός της ρόλος είναι η έκκριση πεπτικών ενζύμων. Η κεντρική περιοχή του παγκρέατος ονομάζεται αυχένιας (neck) ή σώμα (body) ενώ η περιοχή που βρίσκεται στο αριστερό τμήμα της κοιλιακής χώρας ονομάζεται ουρά (tail).<sup>24</sup>



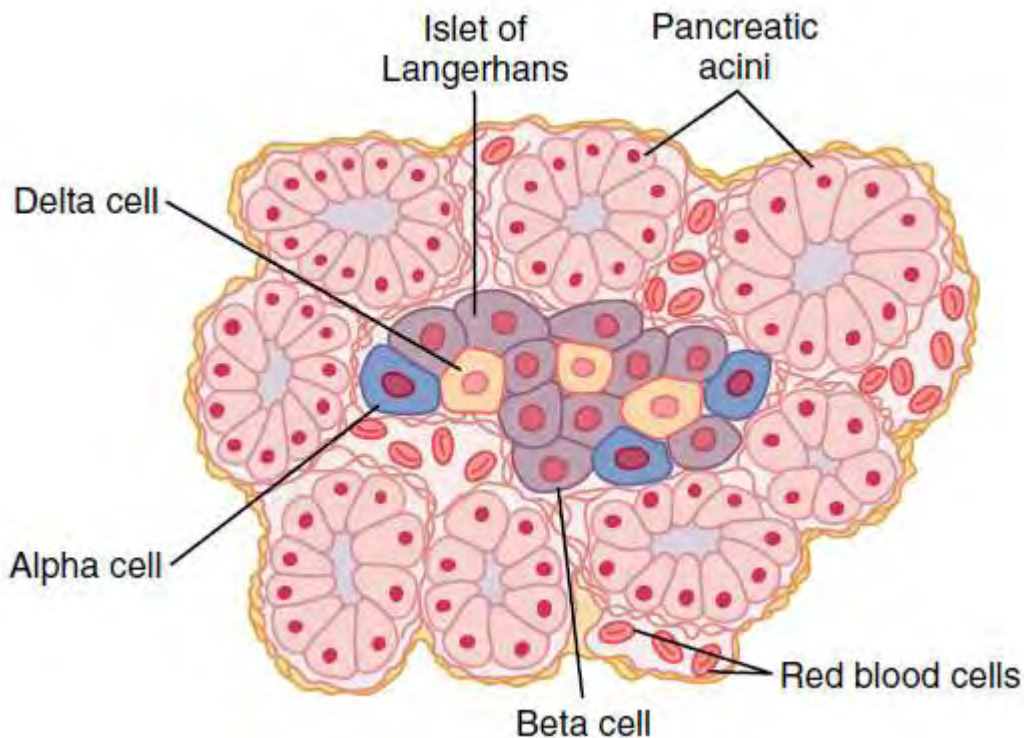
© 2016 Columbia University. All Rights Reserved.

Εικόνα 9: Οι περιοχές του παγκρέατος<sup>24</sup>

## B2. Μορφολογία και λειτουργίες

Το πάγκρεας διαμορφώνεται από δύο διαφορετικούς τύπους ιστών. Από τη μία πλευρά, οι αδενοκυψέλες (acini) συμμετέχουν στην εξωκρινή δράση του παγκρέατος, με την έκκριση πεπτικών ενζύμων προς το δωδεκαδάκτυλο.<sup>25</sup> Εκτός από την έκκριση των πεπτικών ενζύμων, εκκρίνεται, επιπλέον και, διττανθρακικό νάτριο, το οποίο εξουδετερώνει το όξινο περιβάλλον της τροφής, που φτάνει στο δωδεκαδάκτυλο από το στομάχι. Το διττανθρακικό νάτριο, μαζί με τα παγκρεατικά ένζυμα, προωθείται μέσω του παγκρεατικού πόρου προς το δωδεκαδάκτυλο. Η έκκριση των παγκρεατικών ενζύμων ενεργοποιείται από την παρουσία τροφής στο λεπτό έντερο.<sup>26</sup>

Η τροφή, που μεταφέρεται από το στομάχι στο δωδεκαδάκτυλο περιέχει πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λίπη. Οι πρωτεΐνες πέπτονται από τα ένζυμα *θρυψίνη* και *χυμοθρυψίνη*, τα οποία διασπούν σε μικρά πεπτίδια τις πρωτεΐνες, χωρίς, όμως, να απελευθερώνουν μεμονωμένα αμινοξέα. Αντίθετα, η *καρβοξυπολυπεπτιδάση* διασπά τις πρωτεΐνες σε μεμονωμένα αμινοξέα. Όσον αφορά τους υδατάνθρακες, το ένζυμο που εμπλέκεται στη διάσπασή τους είναι η *παγκρεατική αμυλάση*, παράγοντας δισακχαρίτες ή τρισακχαρίτες. Η πέψη των λιπιδίων πραγματοποιείται από τρία διαφορετικά ένζυμα: την *παγκρεατική λιπάση*, που μετατρέπει τα ουδέτερα λίπη, σε λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια μέσω της υδρόλυση, την *εστεράση της χοληστερόλης*, η οποία καταλύει την υδρόλυση του εστέρα της χοληστερόλης και τη *φωσφολιπάση*, η οποία αποκόπτει τα λιπαρά οξέα από τα φωσφολιπίδια. Όλα τα παγκρεατικά ένζυμα παράγονται, αρχικά, ως πρόδρομα μόρια και βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση. Στη συνέχεια, υφίστανται τροποποιήσεις και μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα.<sup>26</sup>



Εικόνα 10: Η φυσιολογική ανατομία του παγκρέατος.<sup>25</sup>

Από την άλλη πλευρά, το πάγκρεας περιλαμβάνει τα νησίδια του Langerhans, τα οποία συμμετέχουν στην ενδοκρινή δράση του οργάνου και έχει βρεθεί ότι στο ανθρώπινο πάγκρεας υπάρχουν ένα με δύο εκατομμύρια νησίδια. Τα νησίδια του Langerhans αποτελούνται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων, που διαφέρουν μεταξύ τους στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Ο κυτταρικός τύπος που αποτελεί την πλειοψηφία των παγκρεατικών κυττάρων είναι τα *βήτα κύτταρα* σε ποσοστό 60%, που εκκρίνουν ινσουλίνη και αμυλίνη. Η αμυλίνη είναι ορμόνη, με άγνωστη λειτουργία, που εκκρίνεται ταυτόχρονα με την ινσουλίνη. Ο δεύτερος πιο πολυπληθής κυτταρικός τύπος του παγκρεατικού ιστού είναι τα *άλφα κύτταρα*, σε ποσοστό 25%, τα οποία εκκρίνουν γλυκαγόνη. Τέλος, τα *δέλτα κύτταρα*, σε ποσοστό 10% του συνόλου εκκρίνουν σωματοστατίνη, ενώ σε μικρό αριθμό υπάρχουν τα *κύτταρα PP*, τα οποία, έχει βρεθεί, ότι εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο.<sup>25</sup>

### B3. Καρκίνος του παγκρέατος

#### Επιδημιολογία και συμπτώματα

Ο παγκρεατικός καρκίνος εμφανίζει υψηλά επίπεδα θνησιμότητα και σύμφωνα με τον Ferlay et al, ο παγκρεατικός καρκίνος κατατάσσεται στην 7<sup>η</sup> θέση των θανατηφόρων καρκίνων, με 265.000 θανάτους παγκοσμίως.<sup>27,28</sup> (Εικόνα 6) Έχει βρεθεί, ακόμα, ότι εμφανίζεται με περισσότερα περιστατικά στις χώρες της Ευρώπης και της Βόρεια Αμερικής.<sup>29</sup>

Δυστυχώς, όμως, τα αρχικά στάδια του καρκίνου του παγκρέατος δεν εμφανίζουν συμπτώματα για την έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας. Γι' αυτό το λόγο, ο παγκρεατικός καρκίνος διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο, με αποτέλεσμα το 26% των περιστατικών να έχουν 1 χρόνο ζωής και μόλις το 6% 5 χρόνια ζωής.<sup>29</sup> Τα κύρια συμπτώματα, που σχετίζονται με τον καρκίνο του παγκρέατος, περιλαμβάνουν στα αρχικά στάδια, ήπια κοιλιακή δυσφορία, απώλεια βάρους και περιστασιακά

ανάπτυξη διαβήτη, ενώ καθώς προχωράει η νόσος, μπορεί να προκαλέσει έντονο κοιλιακό πόνο που συνοδεύεται συχνά από ναυτία και εμετό.

<i>Symptoms</i>	<i>Patients (%)</i>	<i>Symptoms</i>	<i>Patients (%)</i>
<b>Cancer in the head of the pancreas</b>		<b>Cancer in the body and tail of the pancreas</b>	
Weight loss	92	Unexplained weight loss	100
Jaundice	82	Pain	87
Abdominal pain	72	Nausea	43
Anorexia	64	Weakness	42
Dark urine	63	Vomiting	37
Acholic stool	62	Anorexia	33
Nausea	45	Constipation	27
Vomiting	37	Food intolerance	7
Weakness	35	Jaundice	7

*Adapted with permission from DiMagno EP. Cancer of the pancreas and biliary tract. In: Winawer SJ, ed. Management of Gastrointestinal Diseases. New York, NY: Gower Medical Publishing; 1992:28.9. Copyright Elsevier.*

Εικόνα 11: Συμπτώματα του καρκίνου του παγκρέατος με βάση τη θέση εμφάνισης του όγκου στο πάγκρεας.<sup>30</sup>

### Γενετική Βάση

Τα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος είναι στην πλειονοψηφία τους ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα πιο γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια, που εμπλέκονται στο παγκρεατικό καρκίνο είναι το CDKN2A/p16 (cyclindependent kinase inhibitor 2A), το οποίο συμμετέχει κυρίως στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και το SMAD4/DPC4 (SMAD family member 4), το οποίο, μέσω του μονοπατιού του TGF-β, ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρόλα αυτά, το πιο διαδεδομένο ογκογονίδιο, που εμπλέκεται στην εμφάνιση της ασθένειας είναι το γονίδιο K-RAS, μεταλλάξεις του οποίου έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης του κυττάρου.<sup>29</sup>

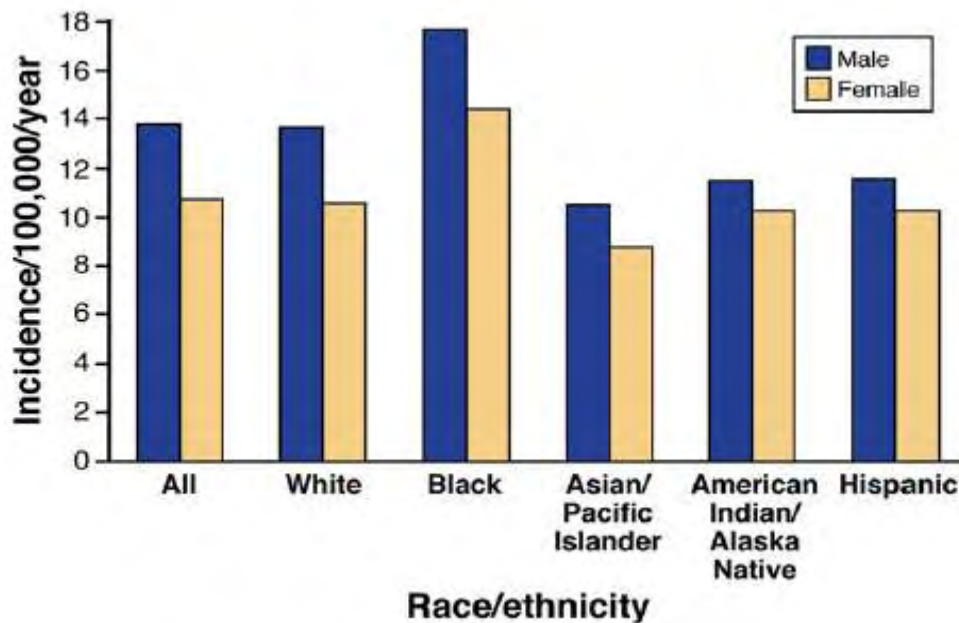
<p><b>Low Increase (less than fivefold increase in risk)</b></p> <p>Alcohol use (<math>\geq</math> four drinks per day)</p> <p>Body mass index (<math>\geq</math> 30 kg per m<sup>2</sup>)</p> <p><i>BRCA1</i> gene carrier</p> <p>Chlorinated hydrocarbon exposure</p> <p>Diabetes mellitus (type 2 for <math>\geq</math> five years)</p> <p>Familial adenomatous polyposis</p> <p>Family history of pancreatic cancer in one first-degree relative</p> <p>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</p> <p>Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure</p> <p>Tobacco use</p>	<p><b>Moderate Increase (five- to 10-fold increase in risk)</b></p> <p><i>BRCA2</i> gene carrier</p> <p>Chronic pancreatitis</p> <p>Cystic fibrosis</p> <p>Family history of pancreatic cancer in two first-degree relatives</p> <p><b>High Increase (more than a 10-fold increase in risk)</b></p> <p>Familial atypical multiple mole melanoma</p> <p>Family history of pancreatic cancer in at least three first-, second-, or third-degree relatives</p> <p>Hereditary pancreatitis</p> <p>Peutz-Jeghers syndrome</p>
<p><i>Adapted with permission from BMJ Publishing Group Limited. Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, et al.; Participants of the Fourth International Symposium of Inherited Diseases of the Pancreas. Advances in counseling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. Gut. 2007;56(10):1461.</i></p>	

Εικόνα 12: Παράγοντες κινδύνου παγκρεατικού καρκίνου<sup>30</sup>

#### Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Εκτός από τη γενετική βάση του καρκίνου του παγκρέατος, υπάρχουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης. Στους βασικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκαταλέγεται το αλκοόλ και το κάπνισμα, χωρίς όμως να σημαίνει ότι άτομα που δεν καταναλώνουν αλκοόλ και δεν καπνίζουν, δε θα εμφανίσουν καρκίνο του παγκρέατος. Ακόμη, η διατροφή και κατ' επέκταση η παχυσαρκία αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος.<sup>31</sup>

Σύμφωνα με τον Yadav et al, η εμφάνιση του καρκίνου του παγκρέατος μπορεί να επηρεάζεται, ακόμη, από το φύλο και την εθνικότητα των ασθενών. Έχει βρεθεί ότι οι άντρες είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση καρκίνου του παγκρέατος σε σχέση με τις γυναίκες, ανεξαρτήτως εθνικότητας. Παράλληλα, οι έγχρωμοι (Black) εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό καρκίνων του παγκρέατος, ακολουθούν οι λευκοί και στη συνέχεια, οι Αμερικάνοι και οι Ισπανοί.<sup>31</sup> (Εικόνα 13)



Εικόνα 13: Περιστατικά καρκίνου του παγκρέατος από το 2005 έως 2009 στις Η.Π.Α. σε σχέση με το φύλο και την εθνικότητα.<sup>31</sup>

#### Διάγνωση και Θεραπεία

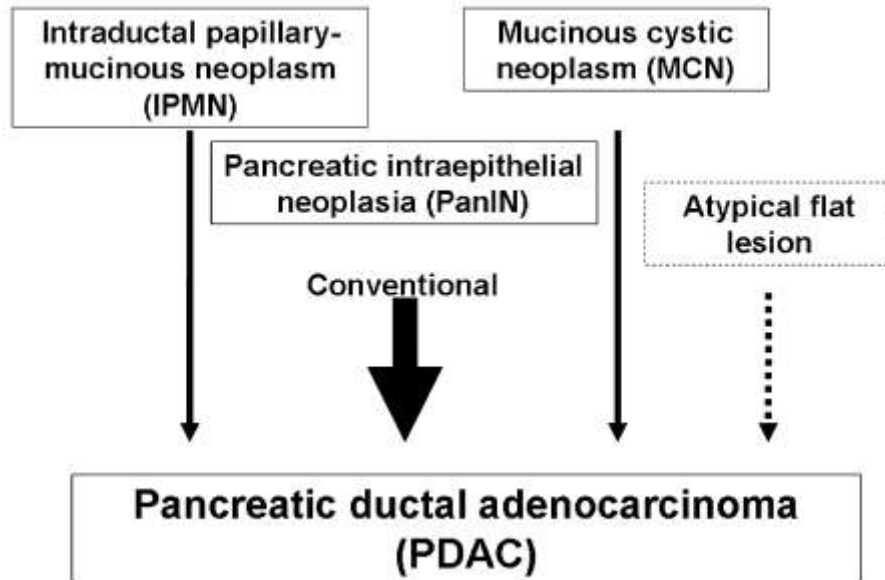
Ο παγκρεατικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από απουσία συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια, ενώ είναι διηθητικός σε γειτονικούς ιστούς και άρα μεταστατικός από τα αρχικά κιάλας στάδια εμφάνισης του. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά δεν επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας.<sup>32</sup> Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία, αναφέρονται αρκετοί βιοδείκτες, ικανοί να ανιχνευθούν μέσω του αίματος, οι οποίοι είτε χρησιμοποιούνται ήδη για την ανίχνευση και άλλων μορφών καρκίνου, είτε έχουν εξειδικευμένη εφαρμογή στον καρκίνο του παγκρέατος. Ένας από τους πιο γνωστούς βιοδείκτες είναι ο CA 19-9, ένα γλυκολιπίδιο υψηλού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανίχνευση καρκίνου του εντέρου. Άλλοι βιοδείκτες που έχουν μελετηθεί είναι οι CEA, CA242, CA50, CAM και TPS.<sup>33</sup> Ακόμη, εναλλακτικές τεχνικές, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του καρκίνου του παγκρέατος, εκτός από τις αιματολογικές εξετάσεις, είναι η αξονική και η μαγνητική τομογραφία, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα καθώς και η βιοψία ιστού.<sup>32</sup>

Ως κύρια θεραπεία για τον καρκίνο του παγκρέατος είναι η πλήρης χειρουργική εκτομή. Παρόλα αυτά, λιγότερο από το 20% των ασθενών που υφίστανται ολική χειρουργική εκτομή επιβιώνουν περισσότερο από 5 χρόνια. Επιπλέον μέθοδοι που ενδείκνυνται για τη θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου είναι η χημειοθεραπεία με gemcitabine ή fluorouracil/leucovorin, η οποία μπορεί να συνδυαστεί με ακτινοβολίες.<sup>30</sup>

#### Πρόδρομες αλλοιώσεις

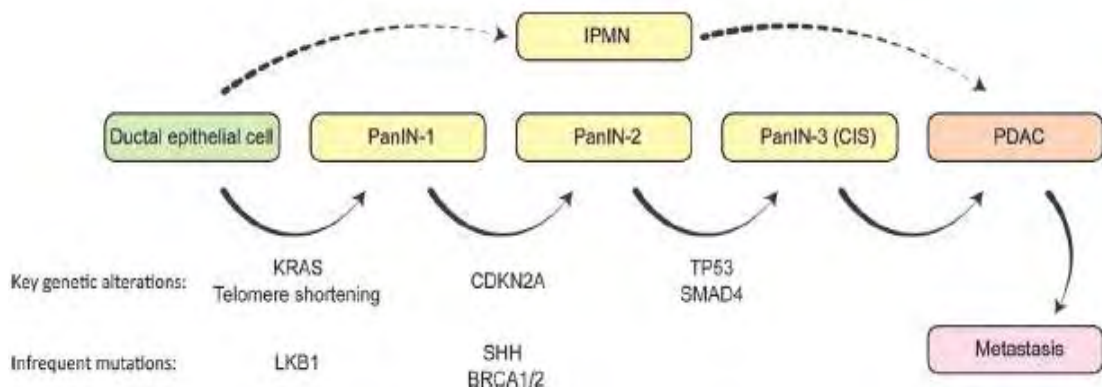
Έχουν βρεθεί τρεις τύποι πρόδρομων αλλοιώσεων, ανάλογα τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, που οδηγούν σε αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (PDAC): η παγκρεατική ενδο-επιθηλιακή νεοπλασία (PanIN), το νεόπλασμα του κυστικού βλενογόννου (MCN) και το νεόπλασμα του ενδοδερμικού θηλοειδούς βλενογόννου (IPMN).<sup>34</sup> Η παγκρεατική ενδο-επιθηλιακή νεοπλασία (PanIN), ως προ κακοήθους κατάσταση χωρίζεται σε (1) PanIN1, που χαρακτηρίζεται από απουσία κυτταρικής

ατυπίας, (2) PanIN2, η οποία εμφανίζει υψηλά επίπεδα κυτταρικής ατυπίας και (3) PanIN3, που αποτελεί ένα καρκίνωμα in situ.<sup>35</sup> Τελευταία, ένα ακόμα είδος πρόδρομης αλλοίωσης έχει περιγραφεί: η άτυπη επίπεδη αλλοίωση (atypical flat lesion), η οποία φαίνεται να προέρχεται από τις αδενοκυψέλες. Αυτός ο τύπος πρόδρομης αλλοίωσης συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό.<sup>36</sup>



Εικόνα 14: Οι τέσσερις τύποι πρόδρομων αλλοιώσεων που οδηγού σε παγκρεατικό καρκίνο.<sup>36</sup>

Σύμφωνα με τον Grant et al, οι πρόδρομες αυτές αλλοιώσεις εμφανίζονται σταδιακά και χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων. Ειδικότερα, όπως εμφανίζεται και στην Εικόνα 15, μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS καθώς και ελάττωση του μεγέθους των τελομερών στα επιθηλιακά κύτταρα του παγκρέατος μετατρέπουν τα φυσιολογικά κύτταρα σε νεοπλασματικά τύπου PanIN. Περαιτέρω μεταλλάξεις σε γονίδια όπως είναι τα CDKN2A, TP53 και SMAD4 έχουν ως αποτέλεσμα, την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος στον παγκρεατικό πόρο, ο οποίος είναι μεταστατικός.<sup>34</sup>



Εικόνα 15: Η γενετική βάση της εξέλιξης των πρόδρομων αλλοιώσεων μέχρι την εμφάνιση του αδενοκαρκινώματος του παγκρεατικού πόρου.<sup>34</sup>

Σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του παγκρέατος

Stage	Classifications	Clinical classification	Stage distribution at diagnosis* (%)	Five-year relative survival (%)
0	Tis, N0, M0	Localized within pancreas, resectable	8	21.5
IA	T1, N0, M0	Localized within pancreas, resectable		14
IB	T2, N0, M0	Localized within pancreas, resectable		12
IIA	T3, N0, M0	Locally invasive, resectable	27	7
IIB	T1, N1, M0 T2, N1, M0 T3, N1, M0	Locally invasive, resectable		5
III	T4, any N, M0	Locally advanced, unresectable		3
IV	Any T, any N, M1	Metastatic	53	1.9

*Tumor: TX = primary tumor cannot be assessed; T0 = no evidence of primary tumor; Tis = carcinoma in situ; T1 = tumor limited to the pancreas, 2 cm or less in greatest dimension; T2 = tumor limited to the pancreas, more than 2 cm in greatest dimension; T3 = tumor extends beyond the pancreas but without involvement of the celiac axis or the superior mesenteric artery; T4 = tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable primary tumor).*

*Regional lymph nodes: NX = regional lymph nodes cannot be assessed; N0 = no regional lymph node metastasis; N1 = regional lymph node metastasis.*

*Distant metastasis: M0 = no distant metastasis; M1 = distant metastasis.*

*\*—12% are unstaged at time of diagnosis.*

*Adapted with permission from Edge SB, American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010:293-294, with additional information from reference 19.*

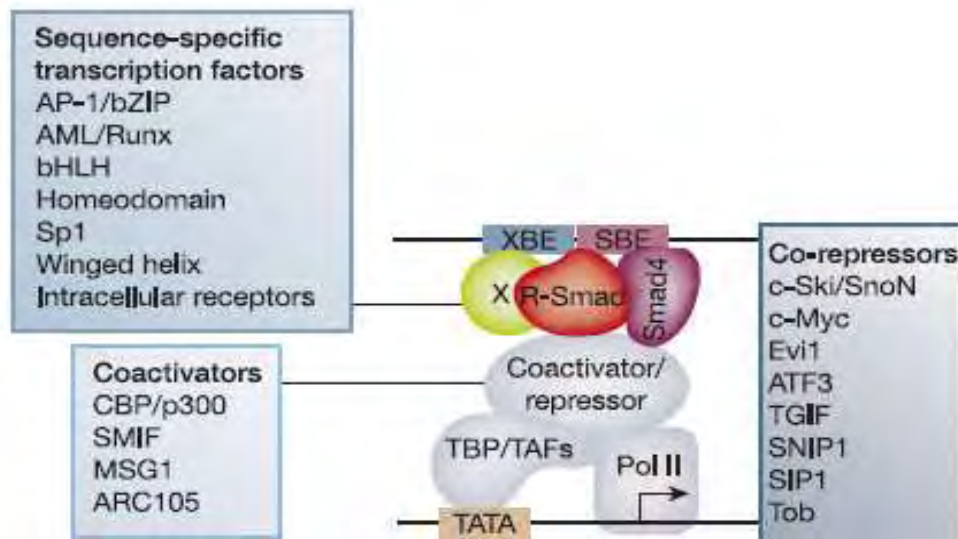
Εικόνα 16: Ιεράρχηση των σταδίων του παγκρεατικού καρκίνου<sup>30</sup>



## Γ. Μονοπάτι TGFβ

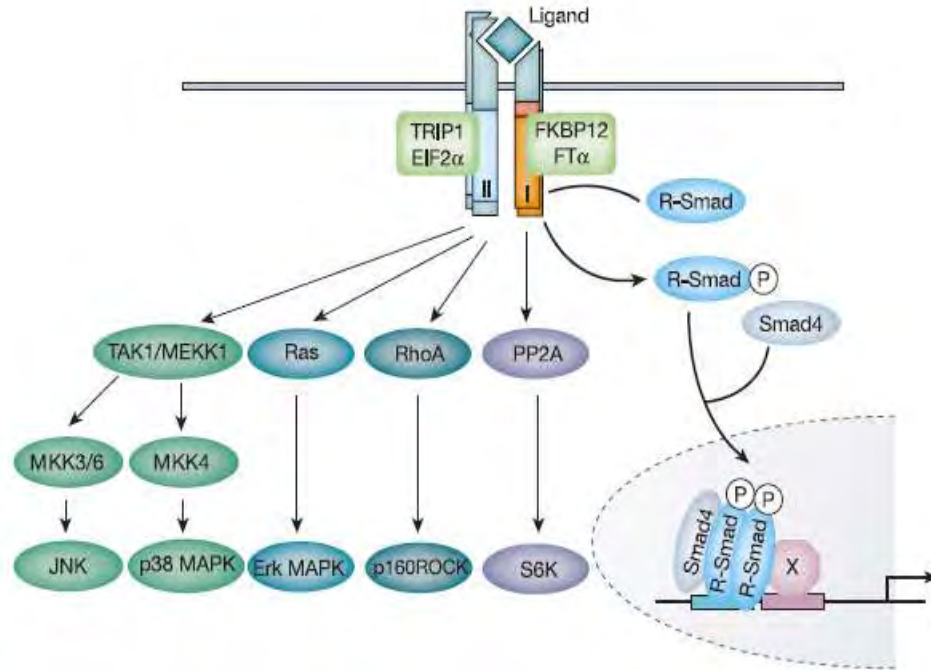
Το μονοπάτι του TGFβ είναι ένα συντηρημένο μονοπάτι, που παρατηρείται, κυρίως, στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Η κύρια λειτουργία του είναι η μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς TGFβR, μέσω των πρωτεϊνών Smad, στον πυρήνα και η ρύθμιση εκατοντάδων γονιδίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το εξωκυττάριο περιβάλλον.<sup>37</sup>

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού του TGF-β περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό ομοδιμερών του TGFβ και την πρόσδεσή τους στα διμερή του υποδοχέα TGFβR2. Ο TGFβR2 προσελκύει, στη συνέχεια, τα αντίστοιχα διμερή του υποδοχέα TGFβR1.<sup>37-40</sup> Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται ένας ετεροτετραμερής υποδοχέας που αποτελείται από ένα ομοδιμερές TGFβR1 και ένα ομοδιμερές TGFβR2. Ο υποδοχέας TGFβR2 έχει δραστηριότητα κινάσης Ser/Thr, με αποτέλεσμα να φωσφορυλιώνει τα ομοδιμερή TGFβR1 στο μοτίβο GS, μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (Gly) και σερίνη (Ser), που εντοπίζεται ανοδικά της περιοχής κινάσης στο αμινοτελικό άκρο.<sup>37,38,40</sup> Η φωσφορυλίωση του TGFβR1 στην περιοχή GS παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του αναστολέα FKBP12 με την περιοχή της κινάσης του TGFβR1, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του FKBP12, την πρόσδεση των πρωτεϊνών R-Smads και τη φωσφορυλίωσή τους στο μοτίβο SSXS.<sup>38,41</sup> Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του υποδοχέα TGFβR1 σταθεροποιεί τις R-Smads και εξασφαλίζει την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Smad.<sup>42</sup> Η αλληλεπίδραση των R-Smads στον υποδοχέα TGFβR1 γίνεται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). Μετά τη φωσφορυλίωση των R-Smad, αυτές αποσυνδέονται από τον υποδοχέα TGFβR1 και την πρωτεΐνη SARA και αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Smad4.<sup>37</sup> Το σύμπλοκο, που δημιουργείται, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλεγμα R-Smads/Smad4 αλληλεπιδρά στον πυρήνα με πολλούς διαφορετικούς συμπαράγοντες (μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές/καταστολείς, παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης) και ο κάθε συνδυασμός, που δημιουργείται, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την αποσιώπηση της έκφρασης διαφορετικού συνδυασμού γονιδίων ανάλογα με τις απαιτήσεις του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού.<sup>43</sup> Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί, ότι απουσία του προσδέτη, οι πρωτεΐνες Smad2/3 βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε μορφή μονομερών.<sup>42</sup>



Εικόνα 17: Οι αλληλεπιδράσεις των R-Smad & Smad4 με μεταγραφικά στοιχεία μέσα στον πυρήνα.<sup>42</sup>

Παράλληλα με το -εξαρτώμενο από τις Smads- μονοπάτι (“canonical” pathway), ο TGFβ έχει την ικανότητα να ενεργοποιήσει εναλλακτικά μονοπάτια καθοδικά ή ανοδικά του «κανονικού» μονοπατιού.<sup>43</sup> Ένα από τα μονοπάτια, που ενεργοποιεί ο TGFβ, είναι το ERK/MAPK, είτε μέσω της πρωτεΐνης Ras, είτε μέσω της κινάσης τυροσίνης ALK5. Τα ενεργοποιημένα μονοπάτια JNK/p38/ERK ενεργούν σε συνεργασία με το μονοπάτι των πρωτεϊνών Smad για να ρυθμίσουν την κυτταρική απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό, ενώ συμβάλλουν στην επαγωγή της μετάστασης, της αγγειογένεσης και της κυτταρικής αύξησης, μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως το c-JUN & το ATF. Με αυτό τον τρόπο, η κινάση ERK συμμετέχει κυρίως στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση. Ακόμη, η ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK οδηγεί σε ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας σε συνεργασία με το πυρηνικό σύμπλεγμα των πρωτεϊνών Smad2/3-Smad4.<sup>44</sup> Καθώς οι πρωτεΐνες Rho/ROCK παίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση τους κυτταροσκελετού, μπορούν να ενεργοποιηθούν από τον TGFβ και να επάγουν το σχηματισμό ινιδίων ακτίνης κατά την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση μέσω μη μεταγραφικού μηχανισμού. Τέλος, το μονοπάτι PI3K/Akt ενεργοποιείται από τον TGFβ και συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και στην μορφολογική τους αλλαγή.<sup>39,44,45</sup>



Εικόνα 18: Το μονοπάτι TGFβ/SMAD4 και τα εναλλακτικά - εμπλεκόμενα με τον TGFβ – μονοπάτια.<sup>42</sup>

## Δ. TGF-beta (Transforming Growth Factor – β)

### Δ1. Γενικά

Ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (Transforming Growth Factor – β, TGF-beta) ανήκει σε μία υπερ-οικογένεια, της οποίας τα μέλη ρυθμίζουν μια σειρά κυτταρικών διεργασιών, τόσο κατά την εμβρυογένεση, όσο και κατά την ενήλικη ζωή, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα, κατά την εμβρυογένεση, τα μέλη της υπερ-οικογένειας συμμετέχουν στο σχηματισμό προτύπων και επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων. Αντίθετα, κατά την ενήλικη ζωή, διαμορφώνουν την εξωκυττάρια ύλη (κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες προσκόλλησης) και αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.<sup>37</sup>

### Δ2. Μέλη οικογένειας

Στα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-beta ανήκουν περισσότεροι από 30 παράγοντες, στους οποίους ανήκουν τα μόρια activins, inhibins, nodal, μυστατίνη καθώς και οι μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών (Bone Morphogenetic Proteins, BMP), η αντιμυλλέριος ορμόνη (Anti-Mullerian Hormone, AMH) και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης.<sup>41,43</sup> Έχει βρεθεί ότι τα μόρια activins/inhibins λειτουργούν ως ρυθμιστικοί παράγοντες έκκρισης της ορμόνης FSH και συμμετέχουν σε βασικές αναπτυξιακές διεργασίες, όπως είναι η ανάπτυξη του μεσοδέρματος. Οι BMPs συμμετέχουν, επίσης σε ζωτικές διαδικασίες ανάπτυξης, σχηματίζοντας χόνδρους και κατ' επέκταση, τα οστά κατά την εμβρυογένεση.<sup>41</sup>

### Δ3. Ισομορφές & Λειτουργία

Ο TGF-beta είναι μία κυτοκίνη, η οποία εμφανίστηκε με την εξέλιξη των σπονδυλωτών.<sup>43</sup> Το μονοπάτι του είναι ιδιαίτερα συντηρημένο και έχει, κυρίως ρυθμιστικό ρόλο.<sup>37,41</sup> Ειδικότερα, ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του επιθηλιακού και νευρικού ιστού, ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και συμμετέχει στην επούλωση των πληγών.<sup>43</sup> Στα θηλαστικά, έχουν βρεθεί τρεις ισομορφές του

TGF-beta: TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, καθένας από τους οποίους εμφανίζει διαφορετική έκφραση στους διαφορετικούς ιστούς και στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Στον άνθρωπο, ο TGF-β1 εκφράζεται σε υψηλότερα ποσοστά, σε σχέση με τις άλλες δύο isoμορφές και ενεργοποιείται από αυξητικά σήματα. Αντίθετα, οι isoμορφές TGF-β2 και TGF-β3 εκφράζονται όταν δέχονται σήματα, που επάγουν τη διαφοροποίηση και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου.<sup>39</sup> Στα ζώα, οι isoμορφές του TGFβ αποτελούν διαχεόμενους παράγοντες, που καθορίζουν την τύχη του κυττάρου ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους.<sup>37</sup>

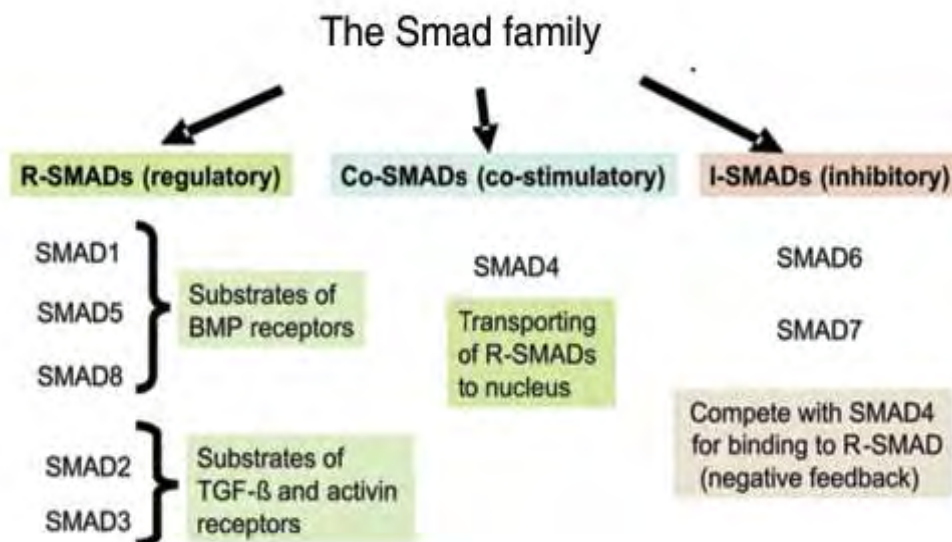
#### Δ4. Βιοσύνθεση & σηματοδοτικό μονοπάτι

Οι τρεις isoμορφές του TGF-beta, αρχικά, παράγονται σε ένα πρόδρομο μόριο 75kDa, που ονομάζεται pro-TGFβ.<sup>38,40</sup> Στη συνέχεια, στο σύμπλεγμα Golgi, το πρόδρομο μόριο, κόβεται από φουρίνες (furins) και κονβερτάσες (convertases) για να σχηματίσει ομοδιμερή 25kDa, τα οποία, με τη σειρά τους, δημιουργούν μικρά συμπλέγματα με πρωτεΐνες.<sup>43</sup> Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ομοδιμερή TGFβ σχηματίζουν μεγαλύτερα συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Τα συμπλέγματα αυτά επιτρέπουν την στοχευμένη έξοδο των ομοδιμερών στην εξωκυττάρια μεμβράνη. Εκεί, τα ομοδιμερή αποθηκεύονται, αλληλεπιδρώντας με γλυκοπρωτεΐνες και ινίδια φιμπρονεκτίνης μέχρι να ενεργοποιηθούν. Οι παράγοντες, που ενεργοποιούν τα ομοδιμερή TGFβ, είναι πρωτεάσες, ιντεγκρίνες, καθώς και ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS).<sup>40</sup> Μετά την ενεργοποίησή τους, τα ομοδιμερή προσδένονται σε διμερή του υποδοχέα TGFβR2, ενεργοποιώντας έτσι το μονοπάτι TGFβ, όπως αναλύθηκε παραπάνω.<sup>37-40</sup>

### E. Πρωτεΐνες Smad

#### E1. Μέλη οικογένειας

Στα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες Smad είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν 8 διαφορετικά μέλη: Smad 1-8. Οι 8 αυτές πρωτεΐνες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (α) τις R-Smads, (β) τις Co-Smads και τις (γ) τις I-Smads.<sup>46</sup>



Εικόνα 19: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Smad<sup>46</sup>

(α) Οι **R-Smads ή Receptor - Regulated Smads** περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες 1,2,3,5 & 8. Κύρια λειτουργία τους είναι η αλληλεπίδραση με το ενεργό ομοδιμερές του υποδοχέα TGFβR1, ο οποίος φωσφορυλιώνει τα 2 από τα 3 κατάλοιπα Ser στο μοτίβο SSXS, που βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο των R-Smads. Ανάλογα με τον προσδέτη του υποδοχέα, κάθε φορά ενεργοποιείται διαφορετική R-Smad. Συγκεκριμένα, με την πρόσδεση των BMP στον υποδοχέα ενεργοποιούνται οι Smad1, Smad5 και Smad8, ενώ με την πρόσδεση της ακτιβίνης και του TGFβ ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3. Οι R-Smads, στη συνέχεια, σχηματίζουν ολιγομερή μεταξύ τους, αλληλεπιδρούν με την Smad4 και εισέρχονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων.<sup>46</sup> Όταν οι R-Smads αποφωσφορυλιωθούν, διασπάται το σύμπλοκο, που δημιουργούν με τη Smad4 και εξέρχονται από τον πυρήνα.<sup>47</sup> Η Smad2, συγκεκριμένα, εξέρχεται από τον πυρήνα, αλληλεπιδρώντας με τις νουκλεοπορίνες CAN/Nup214 και Nup153.<sup>42</sup>

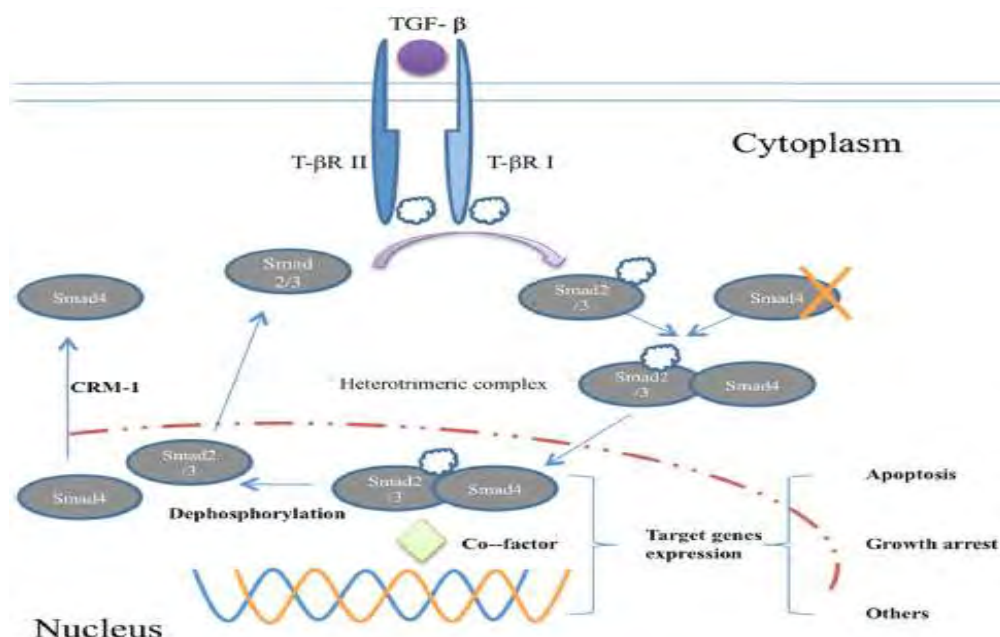
Έχει βρεθεί, ότι οι Smad2/3 έχουν την ικανότητα να εισέρχονται μόνες τους (χωρίς τη Smad4) στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα, χωρίς όμως να έχουν μεταγραφική ενεργότητα.<sup>46</sup> Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή NLS (Nuclear Localization Sequence) της Smad3, η οποία εμφανίζεται μετά τη φωσφορυλίωση του καρβόξυ-τελικού άκρου της πρωτεΐνης, λόγω της αλλαγής της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης, αλληλεπιδρά με την importin-β, με αποτέλεσμα την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα του κυττάρου. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Smad2, επειδή διαθέτει ένα επιπλέον εξόνιο 3 στην περιοχή MH-1, εισέρχεται στον πυρήνα αλληλεπιδρώντας με έναν κυτοσολικό παράγοντα, ανεξάρτητα της importin-β.<sup>46</sup> Παρόλα αυτά, απουσία προσδέτη, οι πρωτεΐνες Smad2/3 βρίσκονται, κυρίως, στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή κατάσταση, συνδεδεμένες με μικροϊνίδια φιλαμίνης. <sup>42,46</sup>

(β) Στην **Co-Smad ή Common Smad** ανήκει μόνο μία πρωτεΐνη: η Smad4. Η Smad4 πρωτοανακαλύφθηκε στην φρουτόμυγα *Drosophila Melanogaster* στα μέσα του 1990, μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη σηματοδότηση του μορίου decapentaplegic (dpp).<sup>35</sup> Ακολούθησε η ανακάλυψη της αντίστοιχης ορθόλογης πρωτεΐνης στον *Caenorhabditis elegans* και αργότερα στον άνθρωπο. Η πρωτεΐνη Smad4 είναι γνωστή και με το όνομα DPC4 από τα αρχικά της φράσης “Deleted in Pancreatic Cancer”.<sup>46</sup>

Το γονίδιο για τον άγριο τύπο της Smad4 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο καταστέλλει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και παρεμποδίζει την καρκινογένεση. Εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 18 στην περιοχή 21.1 (18q21.1) και μέχρι πρόσφατα, ήταν γνωστό, ότι αποτελείται από 11 εξόνια.<sup>47</sup> Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένα ακόμη εξόνιο ανοδικά του εξονίου 1, το οποίο ονομάστηκε εξόνιο 0.<sup>46</sup> Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελείται περίπου από 522 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος είναι περίπου 60 kDa (60.439 Da).<sup>47</sup> Η Smad4 δεν εκφράζεται σε όλους τους ιστούς αλλά κυρίως στο δέρμα, στο πάγκρεας, στο έντερο, στη μήτρα και στα επιθηλιακά κύτταρα.

Η πρωτεΐνη Smad4 εντοπίζεται κυρίως μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα. Η είσοδός της στον πυρήνα είναι ανεξάρτητη από τη σηματοδότηση του TGFβ. Όμως, η έξοδός της είναι συνυφασμένη με την καταστολή του CRM-1 (chromosome region maintenance 1). Εδώ αξίζει να σημειωθεί, ότι, σύμφωνα με τον Inman et al, η συσσώρευση της Smad4 οφείλεται σε στερεοχημικές αλλαγές του CRM1 στην θέση πρόσδεση με την Smad4, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην αναγνωρίζει τον CRM1 και να παρεμποδίζεται η έξοδός της από τον πυρήνα. Η

αποδιάταξη του ετεροτριμερούς Smad2/3-Smad4 επάγεται από την αποφωσφορυλίωση του συμπλόκου Smad2/3.<sup>48</sup>

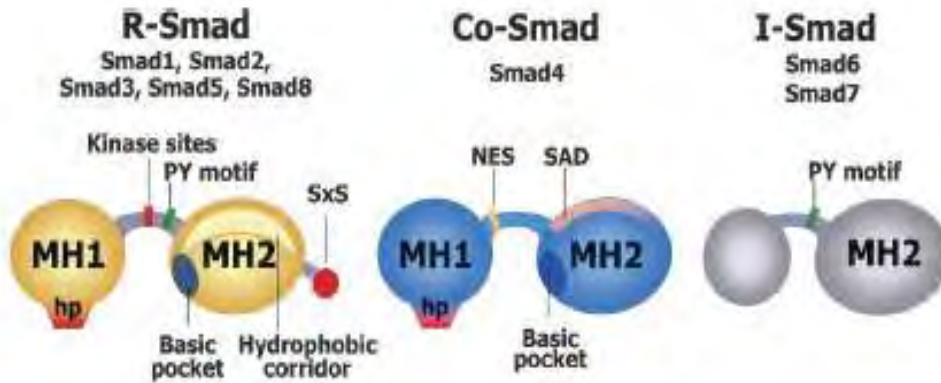


Εικόνα 20: Ρύθμιση της εισόδου και της εξόδου των Smad2/3 και Smad4 από τον πυρήνα.<sup>47</sup>

(γ) Οι πρωτεΐνες Smad6 και Smad7 ανήκουν στις **I-Smads ή Inhibitory Smads ή Anti-Smads**. Παρόλο που και οι δύο έχουν ως στόχο να αναστέλλουν το μονοπάτι του TGFβ δρουν με διαφορετικό μηχανισμό. Από τη μία πλευρά, η Smad7 παρεμποδίζει την πρόσδεση των BMP, TGFβ και της ακτιβίνης στο υποδοχέα, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των R-Smad και την μετάδοση του σήματος. Η έκφραση τη Smad7 μπορεί να αυξηθεί, μέσω μονοπατιών που ρυθμίζουν αρνητικά τον TGFβ, όπως το μονοπάτι JAK/STAT, αλλά και από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως είναι ο TNFα και η ILγ. Από την άλλη πλευρά, η Smad6, όταν βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, επηρεάζει κυρίως το μονοπάτι του BMP. Πιο συγκεκριμένα, ανταγωνίζεται την Smad4 ως προς την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη Smad1, αναστέλλοντας τη δημιουργία συμπλόκου R-Smad/Smad4 και άρα τη μετάδοση του σήματος στον πυρήνα. Σε υψηλά επίπεδα έκφρασης, η Smad6 μπορεί να αναστείλει και τη σηματοδότηση από το TGFβ.<sup>46</sup>

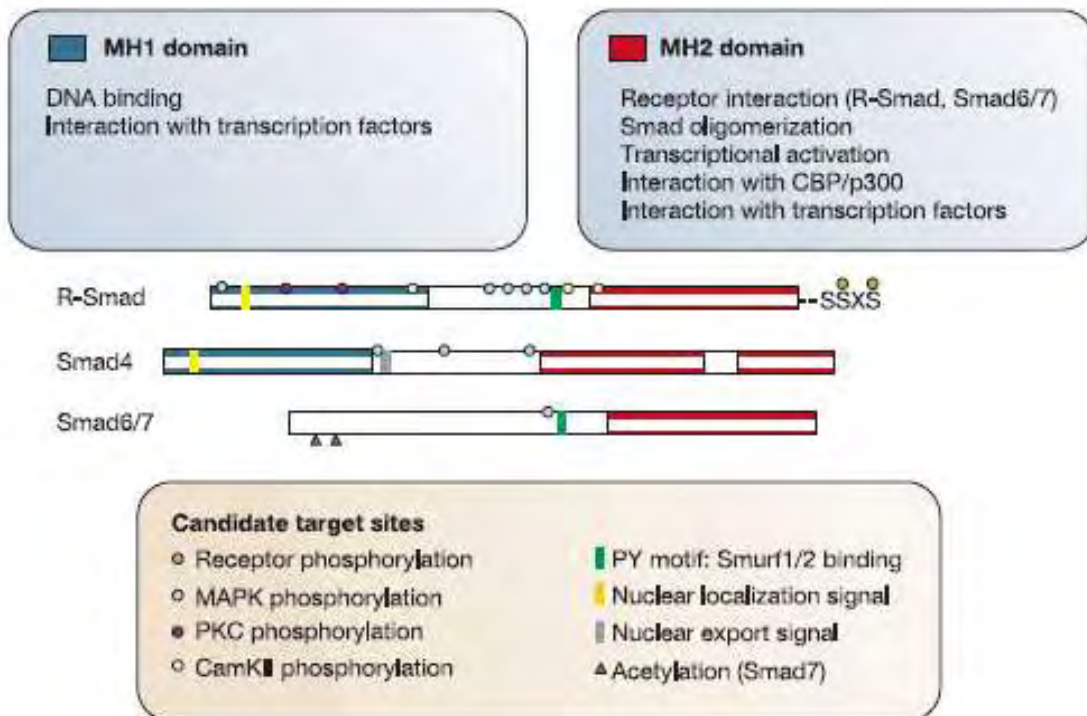
## E2. Δομή

Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας Smad μοιράζονται μία παρόμοια δομή: αποτελούνται από μία αμινο-τελική MH-1 περιοχή με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, και μία καρβοξυ-τελική MH-2 περιοχή, η οποία έχει μεταγραφική δραστηριότητα, δηλαδή, επιτρέπει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών για τη μεταγραφική ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων. Οι δύο περιοχές συνδέονται με μία ενδιάμεση περιοχή – συνδέτη (linker region), η οποία έχει κυρίως ρυθμιστικό ρόλο.<sup>46</sup>



Εικόνα 21: Οι διαφορές των δομών μεταξύ των κατηγοριών των πρωτεϊνών Smad.<sup>49</sup>

Μία βασική διαφορά των I-Smads με τις R-Smads και τη Smad4 είναι ότι οι πρώτες δε διαθέτουν περιοχή MH-1.<sup>46</sup> Ωστόσο, οι R- & I-Smads διαθέτουν στην ενδιάμεση περιοχή – συνδέτη ένα μοτίβο PY, που λειτουργεί, ως θέση αναγνώρισης για ουβικουιτινυλίωση ή σουμουλίωση, ενώ η Smad4 διαθέτει μία περιοχή NES (Nuclear Export Signal), μέσω της οποίας συνδέεται με τον παράγοντα CRM-1 (chromosome region maintenance 1).<sup>46,49</sup> Επίσης, οι R-Smads διαθέτουν, στην ενδιάμεση περιοχή σύνδεσης, θέσεις φωσφορυλίωσης, που αναγνωρίζονται από κινάσες όπως η Erk, η MAPK & η CDK, ενώ στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο διαθέτουν το μοτίβο SSXS, απαραίτητο για τη φωσφορυλίωσή τους από τον TGFβR1. Αντίθετα, οι περιοχές, αυτές, απουσιάζουν τόσο από τις I-Smads, όσο και από τη Smad4.<sup>46</sup>



Εικόνα 22: Περιοχές MH1 & MH2: οι ιδιότητες και οι υποπεριοχές τους.<sup>42</sup>

### E3. Ρύθμιση των επιπέδων των R-Smad

Μία διαδικασίας ρύθμισης των συγκεντρώσεων, μετα-μεταφραστικά, των πρωτεϊνών Smad είναι το μονοπάτι ουβικουιτινυλίωσης. Οι E3-λιγάσες Smurf1 και Smurf2 (Smad-ubiquitination-regulatory factor 1 & 2) ανταγωνίζονται το μονοπάτι του TGFβ, στοχεύουν τις R-Smads και τις οδηγούν για αποικοδόμηση, ρυθμίζοντας, μ' αυτό τον τρόπο, τα επίπεδά τους και την ευαισθησία των κυττάρων στα εισερχόμενα σήματα. Όμως, η κάθε E3-λιγάση στοχεύει σε διαφορετικές R-Smads: η Smurf1 έχει ως στόχο τις Smad1 & Smad5, ενώ η Smurf2 επιδρά σε μεγαλύτερο φάσμα R-Smad.<sup>46</sup>

Η ρύθμιση των επιπέδων των R-Smad, επιτυγχάνεται, ακόμη, και μετά την είσοδό τους στον πυρήνα. Ειδικότερα, η Smad2 ουβικουιτινυλιώνεται στο φωσφορυλιωμένο καρβοξυ-τελικό της άκρο, ενώ η Smad3 αλληλεπιδρά, αρχικά, με την πρωτεΐνη ROC1 στο φωσφορυλιωμένο της καρβοξυ-τελικό άκρο και στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την E3-λιγάση SCF. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 εξέρχονται από τον πυρήνα και υφίστανται πρωτεασωμική αποικοδόμηση στο κυτταρόπλασμα.<sup>46</sup>

Τέλος, έχει βρεθεί, ότι η Smad4 υφίσταται μόνο σουμοϋλίωση (όχι αποικοδόμηση μέσω ουβικουιτινυλίωση), η οποία συμβάλλει στην βελτίωση της σταθερότητας της πρωτεΐνης.<sup>46</sup>

### ΣΤ. Το μονοπάτι του TGFβ στον παγκρεατικό καρκίνο

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο TGFβ είναι υπεύθυνος για την διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και εκκρίνεται τοπικά από τους ιστούς. Όταν, όμως, παρατηρείται φλεγμονή ή τραυματισμός στον ιστό, τότε τα αιμοπετάλια και τα συστατικά του στρώματος εκκρίνουν TGFβ, ο οποίος, με τη σειρά του, παρεμποδίζει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επέκταση της φλεγμονής. Οι συνθήκες αυτές επικρατούν και στον καρκινικό όγκο, με τα καρκινικά κύτταρα να χρησιμοποιούν τον TGFβ, ώστε να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητές τους.<sup>43,44</sup> Έχει βρεθεί, λοιπόν, ότι το μονοπάτι του TGFβ είναι ένα από τα 12 μονοπάτια, που ευθύνονται, κυρίως, για την ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος. Σύμφωνα με τον Shen et al, σχεδόν στο σύνολο των παγκρεατικών καρκίνων έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε τουλάχιστον ένα γονίδιο, που εμπλέκεται στο μονοπάτι του TGFβ.<sup>39</sup>

Παρόλα αυτά, ο TGFβ έχει διττό ρόλο στην καρκινογένεση και αποτελεί «τις δύο όψεις του ίδιου νομίσματος». Με άλλα λόγια, ο TGFβ λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στα αρχικά στάδια του καρκίνου, αλλά καθώς προχωράει η καρκινογένεση, επιτρέπει την πρόοδο της καρκινογένεσης.<sup>39</sup> Παρόλα που ο διττός αυτός ρόλος του TGFβ στον καρκίνο δεν είναι ιδιαίτερα κατανοητός, το στάδιο της κακοήθειας καθώς και το κυτταρικό περιεχόμενο είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες.<sup>44</sup>

#### ΣΤ1. Το μονοπάτι του TGFβ ως ογκοκατασταλτικό

Από τη μία πλευρά, ο TGFβ είναι μία αντι-πολλαπλασιαστική κυτοκίνη και στα αρχικά στάδια του καρκίνου οδηγεί στην αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (G1 arrest).<sup>39</sup> Συγκεκριμένα, ο TGFβ ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης των εξής γονιδίων: p15INK4b, p21CIP1, c-MYC, and ID, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Όταν οι πρωτεΐνες Smad



αλληλεπιδρούν με τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxO και FoxO-C/EBPb επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών p21CIP1 και p15INK4b, αντίστοιχα, και οδηγούν σε ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, όταν οι πρωτεΐνες Smad αλληλεπιδρούν με τους E2F4/5-C/EBPb και ATF3 αναστέλλουν την έκφραση των c-MYC and ID, αντίστοιχα καταστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση.<sup>38,45</sup>

Ακόμη, το μονοπάτι του TGFβ έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί προ-αποπτωτικούς παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης. Τα μονοπάτια αυτά μπορεί να ενεργοποιηθούν, είτε μέσω του μονοπατιού TGFβ/Smad, είτε μέσω του μονοπατιού TGFβ, αλλά ανεξάρτητα των πρωτεϊνών Smad. Πιο αναλυτικά, η αύξηση της έκφρασης της κινάσης DAPK (Death Associated Protein Kinase) οδηγεί σε απόπτωση και επάγεται από το μονοπάτι TGFβ/Smad. Αντίθετα, η πρωτεΐνη DAXX είναι απαραίτητη για την επαγωγή της απόπτωσης από τον TGFβ, αλλά επάγεται από τον TGFβR2. Και τα δύο παραδείγματα πρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης καθώς και την ενεργοποίηση τόσο προ- όσο και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl2.<sup>38,40</sup>

Ένας ακόμη ογκοκατασταλτικός μηχανισμός του TGFβ στα αρχικά στάδια του καρκίνου, είναι η μείωση της έκφρασης του παράγοντα VEGF και η αύξηση της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης 1, τα οποία στοχεύουν στην καταστολή της αγγειογένεσης.<sup>39</sup>

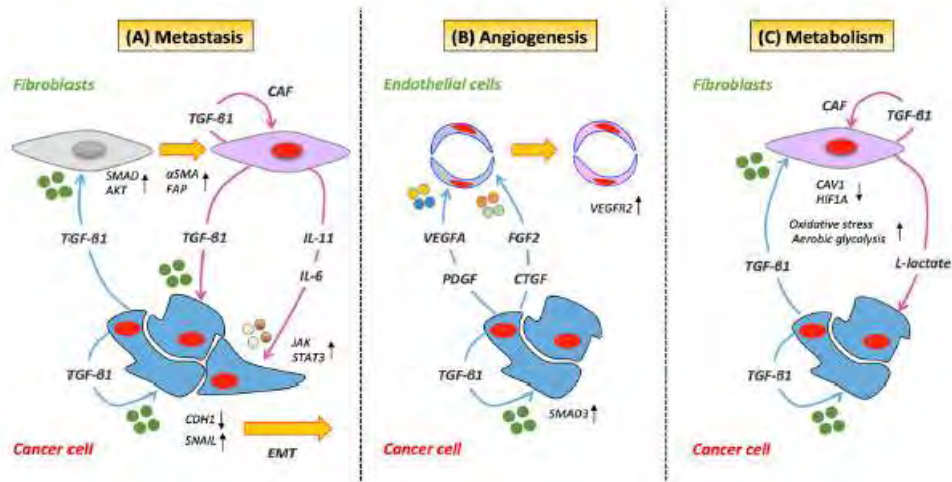
#### ΣΤ2. Ο TGFβ ως υποκινητής της καρκινογένεσης

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, ο TGFβ προωθεί την ανάπτυξη του όγκου στα προχωρημένα στάδια της καρκινογένεσης με διαφορετικούς μηχανισμούς. Αυτό οφείλεται σε αλλαγές στην μετάδοση του σήματος και τελικά στην απώλεια της Smad4 σηματοδότησης. Με αυτό τον τρόπο ενεργοποιούνται, μέσω του TGFβ, ο οποίος υπερεκφράζεται, εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που οδηγούν σε αναστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, αγγειογένεση, κινητικότητα και διήθηση των καρκινικών κυττάρων και τελικά μετάσταση.<sup>39,45</sup> Επιπλέον, ο TGFβ χάνει την αποπτωτική του δράση, καθώς η πρωτεϊνική κινάση Akt η οποία φυσιολογικά αλληλεπιδρά με την Smad3, υπερεκφράζεται στον καρκίνο και τα επίπεδα της Smad3 δεν επαρκούν για τη δημιουργία συμπλόκων με την κινάση Akt. Ακόμη, το μόριο vimentin αποτελεί στόχο του μονοπατιού του TGFβ και έχει την ικανότητα να δεσμεύει την πρωτεΐνη p53, αναστέλλοντας τη δράση του και επιτρέποντας την μεταλλαξιγένεση.<sup>40</sup>

Είναι ευρέως γνωστό, ότι ο όγκος αναπτύσσεται σε συνθήκες υποξίας με αποτέλεσμα να επάγεται η έκφραση του παράγοντα HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) και σε ένα περιβάλλον όπου ο TGFβ υπερεκφράζεται. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>45</sup> και του CTGF (Connesctive-Tissue Growth Factor)<sup>38</sup> και κατ' επέκταση της αγγειογένεσης. Ακόμη, ο TGFβ επάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεασών (MMP2 & MMP9), οι οποίες, με τη σειρά τους, εμποδίζουν την έκφραση του TIMP στο εσωτερικό του όγκου.<sup>38,40</sup>

Επιπλέον, έχει βρεθεί, ότι ο TGFβ εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετάπτωσης (EMT) μέσω της αλληλεπίδρασης του μονοπατιού του TGFβ με διάφορα μονοπάτια, όπως είναι το μονοπάτι Wnt/β-catenin, το μονοπάτι Notch και το μονοπάτι Sonic hedgehog ή μέσω της ενεργοποίησης εναλλακτικών μονοπατιών (Non-Smad pathway).<sup>50,51</sup> Ο TGFβ, στα προχωρημένα στάδια του καρκίνου, έχει την ικανότητα να καταστέλλει τη έκφραση της E-cadherin, η οποία

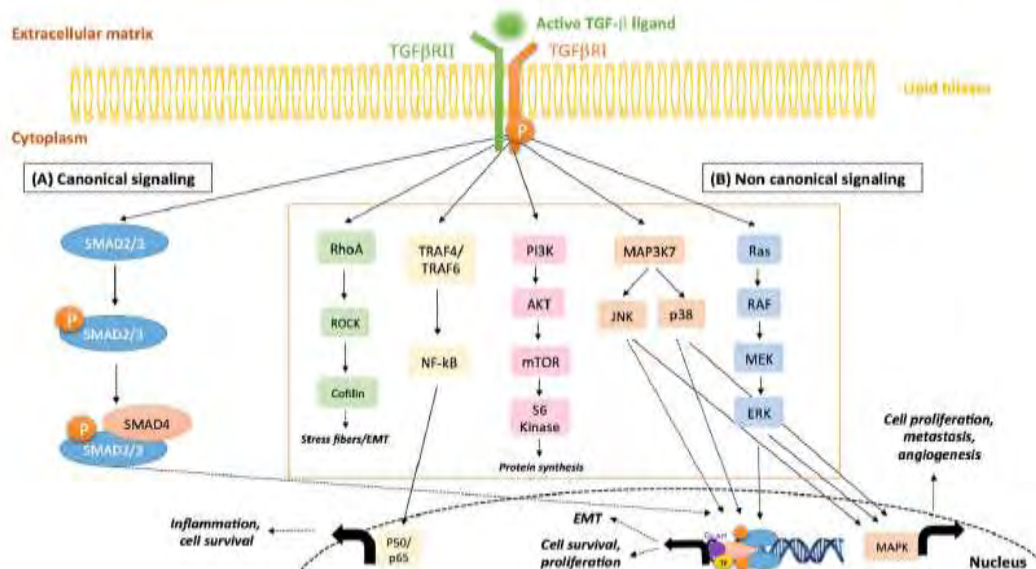
φυσιολογικά λειτουργεί ως υποδοχέας αλληλεπίδρασης των κυττάρων και εκφράζεται στα φυσιολογικά κύτταρα με στόχο την προσκόλληση των κυττάρων.<sup>38</sup> Η καταστολή της έκφρασης της επιτυγχάνεται, μέσω της επαγωγής του HMGA2 (High Mobility Group A2), ο οποίος, με τη σειρά του, επάγει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Snail & Slug που οδηγούν στην καταστολή την έκφρασης της E-cadherin. Έχει βρεθεί, ακόμη, ότι ο TGFβ προάγει τον αποικισμό των καρκινικών κυττάρων σε άλλους ιστούς και ενεργοποιεί τη MET (mesenchymal – epithelial transition).<sup>50</sup> Μία ακόμη εμπλοκή του TGFβ στη διαδικασία της EMT είναι η απελευθέρωση συστατικών εξωκυττάριας μεμβράνης, όπως είναι τα ινίδια κολλαγόνου και φιβρονεκτίνης (fibronectin). Γι' αυτό το λόγο, η υπερέκφραση του TGFβ έχει συνδεθεί με την εμφάνιση ίνωσης σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου.<sup>45</sup>



Εικόνα 23: Η επίδραση του TGFβ στην ενεργοποίηση της μετάστασης, της αγγειογένεσης και του μεταβολισμού.<sup>44</sup>

Όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα καρκινικά κύτταρα αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα και τα NK-κύτταρα και καταστρέφονται.<sup>38</sup> Όμως, στα προχωρημένα στάδια του καρκίνου, ο TGFβ καταστέλλει διαδικασίες του ανοσοποιητικού αλλά και της φλεγμονώδους απόκρισης.<sup>45</sup> Συγκεκριμένα, παράγοντες που οδηγούν σε λύση των κυττάρων όπως είναι η περφορίνη (perforin), η ιντερφερόνη γ (INFγ), τα granzyme A & B καθώς και προ-αποπτωτικές κυτοκίνες, καταστέλλονται από τον TGFβ. Ακόμη, παρεμποδίζεται η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και κατ' επέκταση η ανοσιακή απάντηση μέσω της αναστολή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων από τον TGFβ. Τέλος, ο TGFβ επηρεάζει τη λειτουργία των ουδετερόφιλων και των NK-κυττάρων.<sup>38</sup>

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί, ότι στα προχωρημένα στάδια της καρκινογένεσης, παράγοντες όπως η διηθητικότητα, το μέγεθος του όγκου και η αποδιαφοροποίηση είναι καθοριστικοί για τα επίπεδα του TGFβ στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Γι' αυτό το λόγο, ο TGFβ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης και κατ' επέκταση ως θεραπευτικός στόχος.<sup>40</sup>



Εικόνα 24: Το μονοπάτι Smad4/TGFβ και τα εναλλακτικά μονοπάτια, που ενεργοποιεί, στον καρκίνο.<sup>44</sup>

### Z. Η Smad4 στον παγκρεατικό καρκίνο

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο παγκρεατικός καρκίνος χωρίζεται σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά: PanIN, IPMN και MCN. Στην κατηγορία PanIN, η μετατροπή ενός φυσιολογικού επιθηλιακού κυττάρου σε PanIN τύπου 1 οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις στον γονίδιο KRAS, ενώ όσο προχωρούν τα στάδια του παγκρεατικού καρκίνου (PanIN2 και PanIN3) παρατηρούνται αλλαγές στα γονίδια CDKN και TP53. Αλλαγές στη Smad4 εμφανίζονται κυρίως στο τελευταίο στάδιο της PanIN (PanIN3). Αντίθετα, το IPMN σπάνια σχετίζεται με αλλαγές στην πρωτεΐνη Smad4.<sup>35</sup> Στα MCN, ακολουθείται το ίδιο πρότυπο αλλαγών με την PanIN, παρόλα αυτά δεν παρατηρείται απώλεια έκφρασης ή μεταλλάξεις στο γονίδιο Smad4 σε μη διηθητικούς MCN.<sup>36</sup>

Η κύρια αλλαγή που εμφανίζεται στον παγκρεατικό καρκίνο είναι η απενεργοποίηση του γονιδίου της Smad είτε λόγω απώλειας ετεροζυγωτίας, είτε λόγω ομόζυγης διαγραφής. Έχει βρεθεί ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 18, όπου εδράζεται το γονίδιο Smad4, φτάνει σε ποσοστό έως και 90% των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο. Ακόμη, σε ποσοστό περίπου 50% των περιπτώσεων παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) παρατηρείται απώλεια παραγωγής της πρωτεΐνης.<sup>52</sup> Σύμφωνα με τον Makohon-Moore et al, η απώλεια της πρωτεΐνης Smad4 συνοδεύεται πολλές φορές από μεταλλάξεις, που οδηγούν σε ενίσχυση της λειτουργίας του γονιδίου TP53, ενώ η παρουσία της Smad4 συνοδεύεται από μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στο γονίδιο TP53.<sup>53</sup>

Η απώλεια της έκφρασης της Smad4 έχει συνδεθεί άρρηκτα με φτωχότερη πρόγνωση στους ασθενείς. Παρουσία της πρωτεΐνης, ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών είναι περίπου 20 μήνες. Αντίθετα, απουσία της πρωτεΐνης, ασθενείς δεν επιβιώνουν περισσότερο από 14 μήνες.<sup>54</sup> Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι η απώλεια της Smad4 ενεργοποιεί έμμεσα την αγγειογένεση και την επιθηλιο-μεσεγχεματική μετάπτωση, μέσω της ενεργοποίησης εναλλακτικών μονοπατιών από τον TGFβ.<sup>55</sup> Επίσης, παρουσία μεταλλαγμένου KRAS, η ομόζυγη διαγραφή της Smad4 επιταχύνει την εξέλιξη της ασθένειας και προωθεί τη δημιουργία ίνωσης, εξαιτίας της απώλειας

των αδενοκυψέλων του παγκρεατος.<sup>56</sup> Σύμφωνα με τον Yang et al, η αναστολή της αγγειογένεσης και της διήθησης των καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνεται με αποκατάσταση της έκφρασης της Smad4 σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη.<sup>52</sup>

Το 90% των μεταλλάξεων, που υφίσταται η Smad4 εντοπίζονται, κυρίως, στην περιοχή MH-2 του καρβοξυ-τελικού άκρου, η οποία περιλαμβάνει τα κωδικόνια 330-370 και ονομάζεται περιοχή MCR (Mutation Cluster Region).<sup>46</sup> Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι παρανοηματικές, μη νοηματικές ή αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και έχουν ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης και την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασής της, αρχικά, με την Smad2 και αργότερα, με τους μεταγραφικούς παράγοντες.<sup>46,47</sup>

#### Οι R-Smads στον καρκίνο του παγκρέατος

Κατά καιρούς, έχουν εντοπιστεί, σε παγκρεατικούς ιστούς, μεταλλάξεις σε κατάλοιπα Arg, τόσο στην περιοχή MH-1, όσο και στην MH-2 της πρωτεΐνης Smad2. Συγκεκριμένα, οι παραπάνω μεταλλάξεις καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στις αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες του TGFβ. Επομένως, σχετίζονται περισσότερο με διαδικασίες αποδόμησης της πρωτεΐνης, παρά με τις ιδιότητες της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα.<sup>46</sup>

#### Η. Η χρήση των πρωτεϊνών TGFβ & Smad4 ως προγνωστικοί δείκτες στον καρκίνο του παγκρέατος

Στον παγκρεατικό καρκίνο, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στα επίπεδα τόσο του TGFβ, όσο και της Smad4, σε σχέση με τα επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι αλλαγές, αυτές, στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες.

Συγκεκριμένα, σε έρευνες, που έχουν διεξαχθεί, η απώλεια της Smad4 συνδέεται άρρηκτα με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης και εκτεταμένη μετάσταση.<sup>35,45</sup> Σε ασθενείς με PDAC, που χαρακτηρίζονται από έκφραση της πρωτεΐνης, παρατηρείται σημαντικά βελτιωμένη μέση διάρκεια ζωής και αύξηση της διάρκειας επιβίωσης μέχρι και 5 χρόνια.<sup>45</sup> Μέτα-ανάλυση, που δημοσιεύτηκε πρόσφατα, προβλέπει ότι η απενεργοποίηση της έκφρασης της Smad4 έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένα επίπεδα επιβίωσης τόσο τους Καυκάσιους, όσο και στους Ασιάτες ασθενείς, ενώ δε σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, τη διαφοροποίηση και τη μετάσταση στους λεμφαδένες.<sup>57</sup>

Από την άλλη πλευρά, ο TGFβ έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στον ορό των ασθενών με PDAC, σε σχέση με ασθενείς με καλοήθειες καταστάσεις στο πάγκρεας. Τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου και μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης. Ακόμη, ο αυξημένος ρυθμός μετάστασης, το μέγεθος του όγκου και το στάδιο του καρκίνου σχετίζονται με τα επίπεδα της πρωτεΐνης.<sup>45</sup>

#### Θ. TGFβ/Smad4: Στόχοι Θεραπείας

Η Smad4, λόγω της λειτουργίας της ως προγνωστικός δείκτης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός στόχος, κατά τη χημειοθεραπεία, στον καρκίνο του παγκρέατος. Μόρια όπως τα UA62001, UA62784, που στοχεύουν στην απενεργοποίηση της πρωτεΐνης, βρίσκονται υπό έρευνα για μελλοντική φαρμακευτική τους χρήση.<sup>35</sup> Παρόλα αυτά, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την ανάπτυξη φαρμακευτικών μορίων που στοχεύουν στη Smad4, καθώς

ενεργοποιούνται, παράλληλα, εναλλακτικά –ανεξάρτητα της Smad4- μονοπάτια που συνδέονται με τον TGFβ.<sup>45</sup>

Σημαντικός θεραπευτικός στόχος, όμως, αποτελεί ο TGFβ και συγκεκριμένα αναστολείς των υποδοχέων του. Τα αντισώματα, που χρησιμοποιούνται ως αναστολείς, ανταγωνίζονται τους αντίστοιχους προσδέτες των υποδοχέων TGFβ, στοχεύουν τις κινάσες των υποδοχέων και αναστέλλουν, τελικά, την μεταγωγή του σήματος του μονοπατιού. Τα παραπάνω μόρια χρησιμοποιούνται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες, όχι μόνο σε περιπτώσεις καρκίνου (γλοίωμα, μελάνωμα, καρκίνος του μαστού), αλλά και για την αντιμετώπιση της ίνωσης και των ουλών που προκαλούνται από την υπερλειτουργία του TGFβ. Ακόμη, η αναστολή της λειτουργίας του μονοπατιού του TGFβ ενισχύει το ανοσοποιητικό, αλλά εμφανίζει και επιπρόσθετα αντικαρκινικά οφέλη.<sup>43</sup> Βέβαια, η αναστολή του μπορεί να οδηγήσει και σε χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες αντιδράσεις.

Κλείνοντας, έχει παρατηρηθεί από μελέτες σε ποντίκια, ότι η καταστολή της λειτουργίας των υποδοχέων TGFβR2 επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, η οποία συνοδεύεται από αύξηση της επιθηλιακής διαφοροποίησης και μείωση της αντίστοιχης μεσεγχυματικής, συμβάλλοντας, έτσι, στη μείωση της μετάστασης. Ακόμη, ελαττώνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ωρίμανση των ινοβλαστών αλλά και η αποσύνθεση του κολλαγόνου.<sup>45</sup>

## Υλικά και Μέθοδοι

### A. Υλικά

Acrylamide-Bis (Bio-Rad, Catalog No. 161-0154)

Ammonium Persulfate (APS) (Sigma, Lot 082K1126)

B-Mercaptoethanol (Sigma, Catalog No. 60242)

Bromophenol Blue (AppliChem, Catalog No. A2331)

Glycerin (ROTH, C.No 3783.1)

Glycin (Chem-Cruz, Catalog No. SC-29096B)

PBS 10x (Lonza, Catalog No. 7MB030)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Catalog No. 23225)

Ponceau (AppliChem CAS-No:6226-79-5)

SDS (Sigma, Catalog No. L4509-5006)

TEMED (AppliChem, Catalog No. A1148)

T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (ThermoFisher Scientific, Catalog No.78510)

Tris Base (Sharlau, Catalog No. TR04241000)

Tween 20 (Fisher Scientific, Catalog No. EC500-018-3)

## B. Διαλύματα

- 1,5 M Tris – Cl, pH = 8,8

Διαλύθηκαν 181,5gr Tris Base σε 1L d H<sub>2</sub>O και ρυθμίστηκε το pH στο 8,8 με HCl 12N.

- 0,5 M Tris – Cl pH = 6,8

Διαλύθηκαν 60,5gr Tris Base σε 1L d H<sub>2</sub>O και ρυθμίστηκε το pH στο 6,8 με HCl 12N.

- 1M Tris-Cl pH = 7,4

Διαλύθηκαν 121gr Tris Base σε 1L d H<sub>2</sub>O και ρυθμίστηκε το pH στο 7,4 με HCl 12N.

- 2M Tris-Cl pH = 8,5

Διαλύθηκαν 242gr Tris Base σε 1L d H<sub>2</sub>O και ρυθμίστηκε το pH στο 8,5 με HCl 12N.

- SDS 10%

Προστίθενται 10gr SDS σε Vτελ=100ml

- SDS 20%

Προστίθενται 20gr SDS σε Vτελ=100ml

- Running buffer 10X , pH = 8.3

Προσθήκη 30,3gr Tris Base, 144gr Glycine, 10gr SDS σε 1L d H<sub>2</sub>O. Ρυθμίστηκε το pH στο 8,3 με HCl συγκέντρωσης 12N.

- Transfer Buffer 10X

Προσθήκη 144gr Glycine, 30,3gr Trizma Base, σε d H<sub>2</sub>O τελικού όγκου 1 λίτρου.

- Ponceau (0,1% ponceau σε 5% Acetic acid):

Σε 100ml acetic acid 5% διαλύονται 0,1 gr ponceau.

- NaCl<sub>2</sub> 0,9%

Σε 2L H<sub>2</sub>O διαλύονται 18gr.

- TBS (Tris Buffer Saline)

950ml NaCl<sub>2</sub> 0,9%

50ml TrisCl 1M

- TTBS (Tween Tris Buffer Saline) 1x

1L TBS

1 ml Tween 20

- TTBS 5% (100mL)

5mL FBS

95mL TTBS 1x

- Ecl Homemade (9mL)

Solution 1: Σε 9mL Ultra-Pure H<sub>2</sub>O προστίθενται 500μL Tris-Cl 45μL Coumaric και 100μL Luminol

Solution 2: Σε 9mL Ultra-Pure H<sub>2</sub>O προστίθενται 500μL Tris-Cl και 3μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## Γ. Μέθοδοι

### 1. Λύση ιστών

Ολόκληρη η πειραματική διαδικασία της λύσης γίνεται στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί η μετασείωση των πρωτεϊνών.

Για την λύση τόσο των κυτταρικών σειρών όσο και των ιστών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent: Διάλυμα που χρησιμοποιείται στη λύση ιστών. Περιέχει 2,5mM Bicine, 150mM sodium chloride σε pH=7,6.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, που χρησιμοποιείται, προστίθονται 100μl για κάθε  $1 \times 10^6$  κύτταρα και 20 mL για κάθε 1g ιστού.

- Cocktail Protease Inhibitors 100x (Sigma, Lot #094M4070V): Χρησιμοποιείται για την αναστολή της δράσης των πρωτεασών, οι οποίες κατά τη διάρκεια της λύσης απελευθερώνονται και αποδομούν τις πρωτεΐνες. Προκειμένου να αποφευχθεί η αποδόμηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται Cocktails Protease Inhibitors.

Χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 1x.

- Phosphatase Inhibitors: Χρησιμοποιούνται όταν μελετώνται φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών για διατήρηση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Η δράση των Phosphatase Inhibitors έχουν ως στόχο την αναστολή της δράσης των φωσφατασών αποτρέποντας, έτσι, την αποδόμηση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Οι αναστολείς φωσφατασών, που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είναι οι εξής:

- Sodium Orthovanadate: χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1mM.
- Sodium Pyrophosphate: Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1mM.
- Sodium Fluoride (NaF): Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 10mM.
- B-glycerolphosphate: Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1mM.

Για τη λύση των ιστών ακολουθήθηκαν τα βήματα που παρατίθενται παρακάτω:

1. Ζυγίστηκαν 0,03g δείγματος.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για κάθε 1g ιστού προσθέτονται 20 mL, οπότε στο κάθε δείγμα αντιστοιχούν 600μl διαλύματος λύσης.

2. Τεμαχισμός του ιστού με τη χρήση λεπίδας.
3. Μεταφορά του τεμαχισμένου ιστού στο erpendorf και προσθήκη μικρής ποσότητας του διαλύματος λύσης.
4. Ομογενοποίηση του ιστού με ειδικό ομογενοποιητή.
5. Προσθήκη της υπόλοιπης ποσότητας του διαλύματος λύσης.

6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και vortex ανά 5 λεπτά για την ανάμειξη του διαλύματος.

Τα υπόλοιπα στάδια της λύσης ιστών είναι ίδια με αυτά της λύσης κυττάρων. Μετά το τέλος της λύσης, τα λήμματα αποθηκεύονται στους -80 °C.

## 2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Ανάλυση Bradford)

Η ανάλυση Bradford έχει ως στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης κάθε δείγματος. Απαραίτητη είναι η κατασκευή μίας πρότυπης καμπύλης, κατά την οποία χρησιμοποιούνται δείγματα με γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit, η ανάλυση Bradford βασίζεται στην αναγωγή του  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Cu}^{1+}$  σε αλκαλικό μέσο και στην επακόλουθη αντίδραση του BCA με τον ανηγμένο  $\text{Cu}^{1+}$  με αποτέλεσμα την παραγωγή μωβ χρώματος.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις, 2mg/mL, 1,5mg/mL, 1mg/mL, 0,75mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το δείγμα με συγκέντρωση αλβουμίνης 2mg/mL, από το οποίο παρασκευάστηκαν διαδοχικά οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις αλβουμίνης σε μία βοηθητική στήλη του 96well plate με προσθήκη διαλύματος λύσης. Τόσο για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα 96well plate.

Standard	Samples (αραίωση 1:1)	Βοηθητική	
10μl από 2mg/mL	5μl δείγμα A + 5μl PBS		
10μl από 1,5mg/mL	5μl δείγμα B + 5μl PBS	1,5mg/mL	75 μl από 2mg/ml + 25μl lysis buffer
10μl από 1mg/mL	5μl δείγμα Γ + 5μl PBS	1mg/mL	60 από 1,5 mg/ml + 30μl lysis buffer
10μl από 0,75mg/mL	5μl δείγμα Δ + 5μl PBS	0,75mg/mL	60μl από 1 mg/ml + 20μl lysis buffer
10μl από 0,5mg/mL	5μl δείγμα E + 5μl PBS	0,5mg/mL	50μl από 0,75mg/ml + 25μl lysis buffer
10μl από 0,25mg/mL	5μl δείγμα ΣΤ + 5μl PBS	0,25mg/mL	30μl από 0,5mg/ml + 30μl lysis buffer
10μl από 0,125mg/mL	5μl δείγμα Ζ + 5μl PBS	0,125mg/mL	20μl από 0,25mg/ml + 20μl lysis buffer

Σε κάθε well της πρότυπης καθώς και στα wells που περιέχουν τα δείγματα προστίθενται 200μl Working Reagent (WR). Επομένως, η ποσότητα WR που απαιτείται κάθε φορά υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

(# standars + # samples ) x (# replication) x (# volume of working reagent per sample)

Για την παρασκευή του WR, αναμειγνύεται το BCA αντιδραστήριο A με το BCA αντιδραστήριο B σε αναλογία 50:1.

Μετά την προσθήκη 200μL WR σε κάθε well, ακολουθεί επώαση στον κλίβανο (στους 37 °C) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540nm. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης καταχωρούνται στο Excel και με βάση της πρότυπη καμπύλη, που προέκυψε, και την εξίσωση Forecast υπολογίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

Για να μειωθεί η πιθανότητα κάποιου από τα δείγματα να έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 2mg/mL, τα δείγματα αυτά αραιώνονται με διάλυμα λύσης σε αναλογία 1:1. Επομένως, για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος η συγκέντρωση που υπολογίστηκε, με βάση την πρότυπη καμπύλη, πολλαπλασιάζεται με το 2 (παράγοντας αραιώσης).

### 3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης – SDS

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στην κινητικότητα των πρωτεϊνών με καθαρό φορτίο μέσα σε ένα πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει με βάση το μοριακό τους βάρους ή το ηλεκτρικό τους φορτίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) του μορίου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο δίνεται από τον τύπο:  $u = \frac{Ez}{f}$ , όπου

E: η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου,

z: το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και

f: ο συντελεστής τριβής, ο οποίος εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου καθώς και την πυκνότητα του μέσου.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα αλλά μικρότερο διαχωριστικό εύρος σε σχέση με τα πηκτώματα αγαρόζης και η πυκνότητά τους μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με το μοριακό βάρος των μορίων που θα ηλεκτροφορηθούν.

Το θεϊκό δωδεκύλιο νάτριο (Sodium dodecyl sulfate, SDS) έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, καταστρέφοντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Πιο συγκεκριμένα, τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα, προσδίδοντας στην πρωτεΐνη αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να κατευθύνονται από το πάνω αρνητικά φορτισμένο πόλο της συσκευής προς τον κάτω θετικά φορτισμένο πόλο. Το αρνητικό αυτό φορτίο είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης. Επομένως, το αρχικό φορτίο θεωρείται αμελητέο.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο πηκτές διαφορετικής περιεκτικότητας. Το πάνω τμήμα της πηκτής ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβαξης

(Stacking gel) και πακετάρει τις πρωτεΐνες, ώστε να ξεκινήσουν όλες από το ίδιο σημείο κατά την ηλεκτροφόρηση. Η πυκνότητα του πηκτώματος επιστοιβάξης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, που χρησιμοποιήθηκε είναι 5%. Το κάτω τμήμα της πηκτής, το πηκτώμα διαχωρισμού, (Resolving gel), είναι μεγαλύτερο σε έκταση και έχει συνήθως ως στόχο το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η πυκνότητα του πηκτώματος διαχωρισμού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών, που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Για πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους, επιλέγονται πηκτώματα χαμηλής περιεκτικότητας πολυακρυλαμίδης, ενώ για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται πηκτώματα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδα.

Κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Μόρια με μικρό μοριακό βάρος είναι πιο ευέλικτα γι' αυτό και «τρέχουν» σε μεγαλύτερη απόσταση κατά μήκος της πηκτής. Αντίθετα, μόρια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος δεν μπορούν να διαπεράσουν αποτελεσματικά από τους πόρους της πηκτής με αποτέλεσμα να παραμένουν στο πάνω τμήμα της πηκτής. Στις δύο άκρες της πηκτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του δείγματος. Επιπλέον, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους χρησιμοποιείται η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, μία αδρανής ουσία, που δεν επηρεάζει το διαχωρισμό.

#### Διαλύματα για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάζονται σε stock και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια, για την παρασκευή άλλων διαλυμάτων χρήσιμων για την εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης.

Για την παρασκευή των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής συστατικά:

#### Resolving Gel (12%)

- 3,4mL d H<sub>2</sub>O Ultra-Pure
- 4mL Acrylamide/Bis 30%
- 2,5mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- 100μL SDS 10%
- 5μL TEMED
- 50μL APS 10%

#### Stacking Gel (5%)

- 5,7mL d H<sub>2</sub>O Ultra-Pure
- 1,7mL Acrylamide/Bis 30%
- 2,5mL 0,5M Tris-HCl pH 6,8
- 100μL SDS 10%

- 10μL TEMED
- 50μL APS 10%

Τόσο το TEMED όσο και το APS αποτελούν παράγοντες πολυμερισμού.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων είναι απαραίτητη η χρήση ενός ειδικού διαλύματος, του loading buffer, το οποίο περιέχει τα εξής υλικά:

- 440μL γλυκερίνη: ιξώδης ουσία, που προσδίδει επιπλέον βάρος στην πρωτεΐνη, ώστε να καθιζήσει στο πηγαδάκι.
- 260μL Tris HCl 0,5M pH=6,8: ρυθμιστικό διάλυμα.
- ~2mg Bromophenol blue 0,2%.
- 200μL SDS 20%: αποδιατακτικό διάλυμα.
- 100μL β – μερκαπτοαιθανόλη: αποδιατακτικός παράγοντας, ο οποίος ανάγει τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης που ηλεκτροφορήθηκε είναι 15μg. Όμως, επειδή τα διαφορετικά δείγματα που περιέχουν 15μg πρωτεΐνης μπορεί να διαφέρουν ως προς τον όγκο τους, προστίθεται PBS 1x ώστε να έχουν όλα τα δείγματα τον ίδιο τελικό όγκο. Στα δείγματα προστίθεται, στη συνέχεια, loading buffer σε ποσότητα ίση με το 1/3 του όγκου του δείγματος. Ακολουθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών με θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Mini-PROTEAN® 3 Cell – BIORAD. Στη συσκευή χρησιμοποιήθηκε ειδικό διάλυμα, running buffer 1x, το οποίο περιείχε τα εξής διαλύματα:

- 900μl dH<sub>2</sub>O Ultra-Pure
- 100μl Running buffer 10x

Η ηλεκτροφόρηση αρχικά πραγματοποιείται στα 100V για τη στοίχιση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 200V για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

#### 4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με την τεχνική Western Blot

Η ανοσοαποτύπωση βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια που χρησιμοποιείται είναι μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επιτρέπει την αντίδραση των πρωτεϊνών με το αντίσωμα. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται με ειδικότητα από το αντίσωμα ως αντιγόνο με αποτέλεσμα να προσδένεται πάνω της. Το σύμπλοκο, που δημιουργείται από την πρόσδεση του αντισώματος στην πρωτεΐνη ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα ειδικό για το πρώτο, το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP). Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence - ECL).

Για τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης είναι απαραίτητη η συναρμολόγηση μίας κατασκευής για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα η κατασκευή αποτελείται από:

1. Fiber pad

2. Χαρτί Whattman
3. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
4. Πηκτή πολυακρυλαμίδης
5. Χαρτί Whattman
6. Fiber pad

Τα υλικά για την δημιουργία της ειδικής κατασκευής μεταφοράς των πρωτεϊνών πρέπει να είναι εμποτισμένα με το transfer buffer και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης θα πρέπει να έχει «ενεργοποιηθεί» σε μεθανόλη πριν τον εμποτισμό της στο transfer buffer.

Η κατασκευή μεταφέρεται σε ειδική συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών, στην οποία προστίθεται ειδικό διάλυμα, transfer buffer 1x. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

- 200ml Methanol
- 100ml Transfer buffer 10x
- 700ml dH<sub>2</sub>O Ultra-Pure

Η τάση που εφαρμόζεται εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που μελετώνται. Είναι σημαντικό να ελεγχθούν τα mA πριν ξεκινήσει η διαδικασία της μεταφοράς, με το βέλτιστο αποτέλεσμα να επέρχεται όταν τα mA έχουν αυξηθεί κατά 100 μονάδες κατά το τέλος της μεταφοράς.

Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών, ακολουθεί η χρώση της πηκτής σε Coomassie Brilliant Blue, για να επιβεβαιωθεί η πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Παράλληλα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώάζεται για μία ώρα σε διάλυμα κορεσμού, TTBS 5%, το οποίο αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- 95% TTBS 1x
- 5% FBS (Fetal Bovine Serum)

για τον κορεσμό των (μη ειδικών) θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του διαλύματος. Μετά το τέλος της επώασης της μεμβράνης με TTBS 5%, προστίθεται το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση, μέσα στο οποίο επώάζεται η μεμβράνη overnight (16 με 18 ώρες) υπό ήπια ανάδευση στους 4°C. Την επόμενη μέρα, απομακρύνεται το πρώτο αντίσωμα και ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις με TTBS για πέντε λεπτά, η κάθε μία, και στη συνέχεια προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα για μία ώρα, υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, απομακρύνεται το δεύτερο αντίσωμα, γίνονται τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με TTBS για πέντε λεπτά, η κάθε μία, και ακολουθεί η ανίχνευση με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Τα αντισώματα που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία είναι τα εξής:

- I. ***Phospho-Smad4 (Thr276)*** (*Thermo Fisher Catalog No.: PA5-64712*): πρώτο αντίσωμα κουνελιού με μοριακό βάρος πρωτεΐνης: 60kDa και προτεινόμενη αραιώση 1:1000.

II. **Smad4 (B-8)** (*Santa Cruz, sc-7966*): πρώτο αντίσωμα ποντικού με μοριακό βάρος πρωτεΐνης: 61kDa και προτεινόμενη αραιώση 1:100 – 1:1000.

III. **Smad2/3 (FL-425)** (*Santa Cruz, sc-8332*): πρώτο αντίσωμα κουνελιού με μοριακό βάρος πρωτεΐνης: 55 (Smad2) 60kDa (Smad3) και προτεινόμενη αραιώση 1:200.

IV. **TGFβ (2C6)** (*Santa Cruz, sc-52829*): πρώτο αντίσωμα ποντικού με μοριακό βάρος πρωτεΐνης: 13kDa και προτεινόμενη αραιώση 1:200.

Τα δευτερογενή αντισώματα anti-mouse (upstate Lot#29574) και anti-rabbit (Sigma Lot #SLBP3451V) χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:6000.

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η μέθοδος ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η οποία βασίζεται στην παρακάτω αρχή: η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα λουμινόλης, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και κουμαρικού οξέος. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ, δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3 αμινο-φθαλικό, μια ουσία που εκπέμπει φως. Το kit που χρησιμοποιήθηκε είναι το Pierce ECL Western Blotting της Thermo Fisher Scientific. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε Homemade ECL, το οποίο παρασκευαζόταν πριν από κάθε χρήση σε ποσότητα, ανάλογη με τον αριθμό των μεμβρανών.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική συσκευή που εκθέτει τη μεμβράνη σε ακτινοβολία UV και η εμφάνιση των πρωτεϊνών γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού UV Alliance.

## 5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης μετά από ανάπτυξη σήματος με χημειοφωταύγεια

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης βασίζεται στον προσδιορισμό της έντασης του σήματος, που προκύπτει από την εμφάνιση των πρωτεϊνών, με τη βοήθεια κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων. Όσο πιο έντονο είναι το χρώμα και όσο πιο μεγάλη είναι η λωρίδα, τόσο μεγαλύτερο είναι το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης.

Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο έλεγχος της ισοφόρτωσης μεταξύ των δειγμάτων, με τη χρήση μίας πρωτεΐνης αναφοράς, ώστε να περιοριστούν σφάλματα στις μετρήσεις που οφείλονται στη διακύμανση του αρχικού ποσού πρωτεΐνης μεταξύ των δειγμάτων. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης είναι πρωτεΐνες που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και στον ίδιο βαθμό (housekeeping proteins). Συνήθως χρησιμοποιείται είτε η ακτίνη, είτε το GAPDH.

Στην παρούσα εργασία, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το DJ-1 καθώς το GAPDH & η β-ακτίνη κρίθηκαν ακατάλληλες στο συγκεκριμένο πείραμα. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης έγινε με το πρόγραμμα ImageJ.

## 6. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά στο πρόγραμμα Excel, όπου υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων του

κάθε ασθενή. Στη συνέχεια, ακολούθησε δοκιμασία T-test για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων. Τέλος, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα σχεδιάστηκαν τα κατάλληλα ραβδογράμματα.



## Αποτελέσματα

Προκειμένου να ελεγχθούν και να συγκριθούν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών TGF-beta, Smad2, Smad3 & Smad4 σε καρκινικούς ιστούς και σε γειτνιάζοντες φυσιολογικούς ιστούς ασθενών πραγματοποιήθηκε η τεχνική των στυπωμάτων (Western Blot).

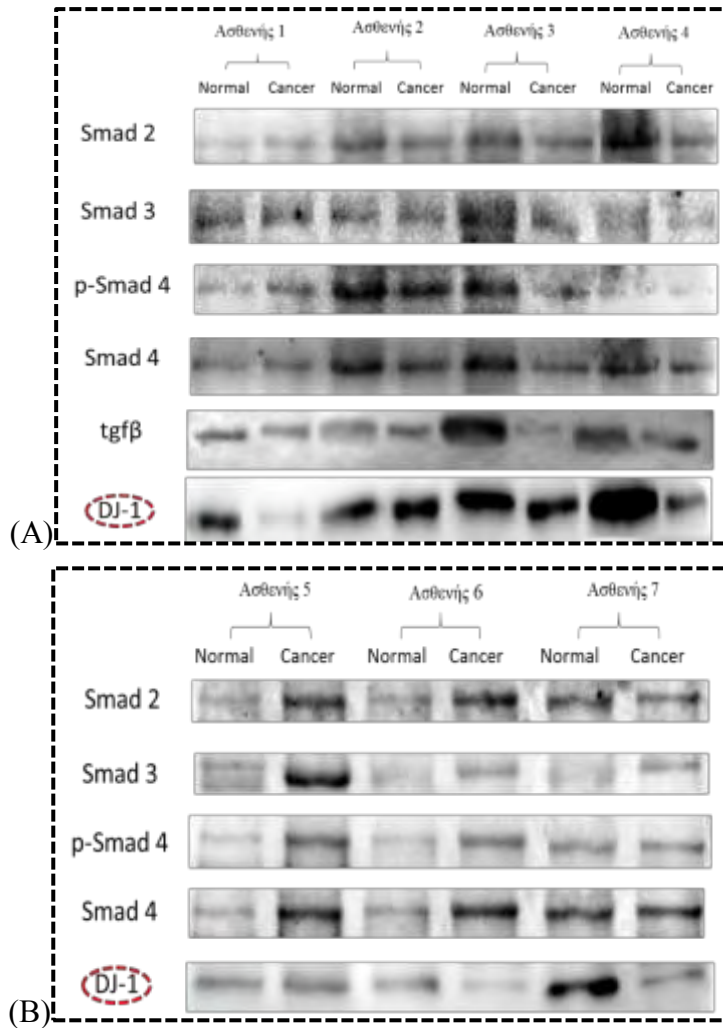
Οι καρκινικοί ιστοί, που χρησιμοποιήθηκαν, αποτελούν αδενοκαρκινώματα και απομονώθηκαν ως επί το πλείστον από την κεφαλή του παγκρέατος και πιο συγκεκριμένα, είτε από την αγκιστροειδή απόφυση, είτε από το φύμα του Vater. Οι 2 από του 7 ασθενείς (Ασθενής 1 και Ασθενής 6) εμφάνισαν μετάσταση στο ήπαρ, ενώ στους ασθενείς 2, 4 και 7 παρατηρήθηκαν ύποπτοι λεμφαδένες. Οι αντίστοιχοι φυσιολογικοί ιστοί απομονώθηκαν από γειτνιάζοντα φυσιολογικό ιστό του κάθε ασθενή.

Τα στοιχεία των ασθενών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

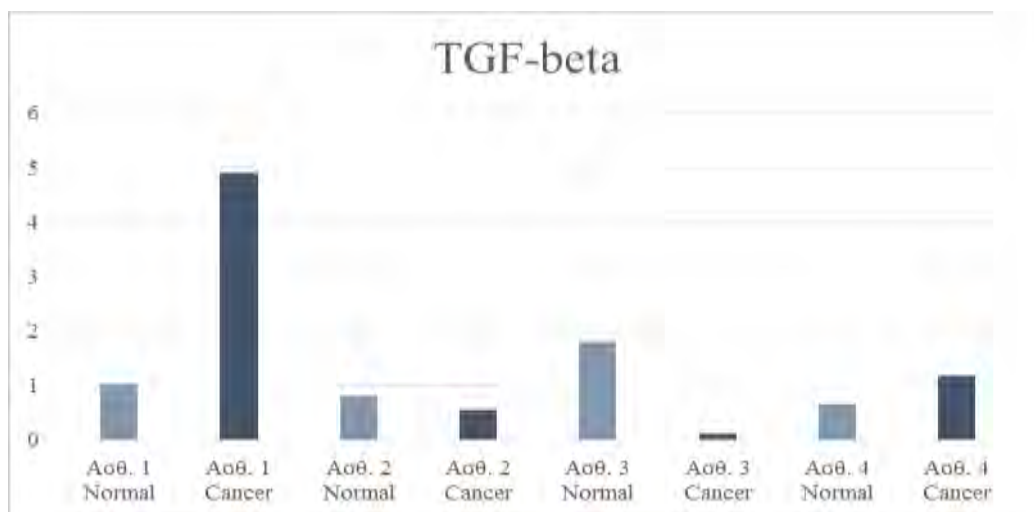
Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	Τύπος	Ύποπτοι Λεμφαδένες	Διήθηση παρακείμενων οργάνων	Ύποπτες Οστικές	Εντόπιση
Ασθενής 1	A	64	Αδενοκαρκίνωμα	Παρουσία	Παρουσία	Παρουσία	Κεφαλή/ Αγκιστροειδής απόφυση
Ασθενής 2	A	65	Αδενοκαρκίνωμα	Παρουσία	--	Παρουσία	Κεφαλή/ Φύμα Vater
Ασθενής 3	A						
Ασθενής 4	A	77	Αδενοκαρκίνωμα	Παρουσία	--	Παρουσία	Κεφαλή/ Αγκιστροειδής απόφυση
Ασθενής 5	A	64	Αδενοκαρκίνωμα	--	--	--	
Ασθενής 6	A	85	Αδενοκαρκίνωμα	--	--	--	Ουρά
Ασθενής 7	A	71	Αδενοκαρκίνωμα	Παρουσία	--	--	Κεφαλή/ Αγκιστροειδής απόφυση

Τα αποτελέσματα της τεχνικής της ανοσοστύπωσης απεικονίζονται στην Εικόνα 23. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το DJ-1, οι πρωτεΐνες Smad2, Smad3 και Smad4 εμφανίζονται υπερεκφρασμένες στον καρκίνο, στην πλειονότητα των ασθενών. Αντίθετα, η πρωτεΐνη TGF-beta δεν ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης. Όσον αφορά την αναλογία μεταξύ της Smad4 και της φωσφορυλιωμένης της μορφής, παρατηρούνται παρόμοια επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δυο ισομορφών της πρωτεΐνης (Total & Phospho), μεταξύ των ασθενών.

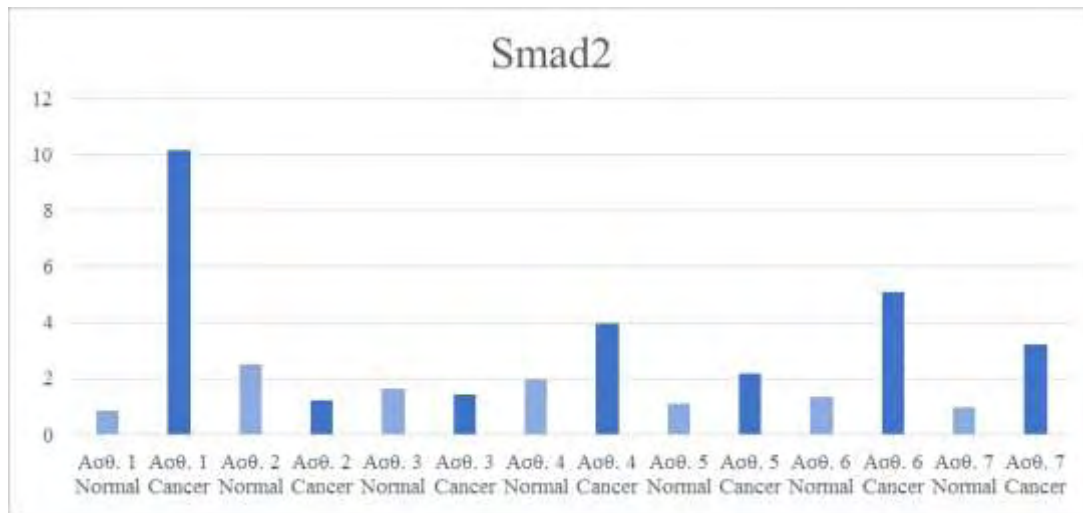
Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στα διαγράμματα των εικόνων 24-28.



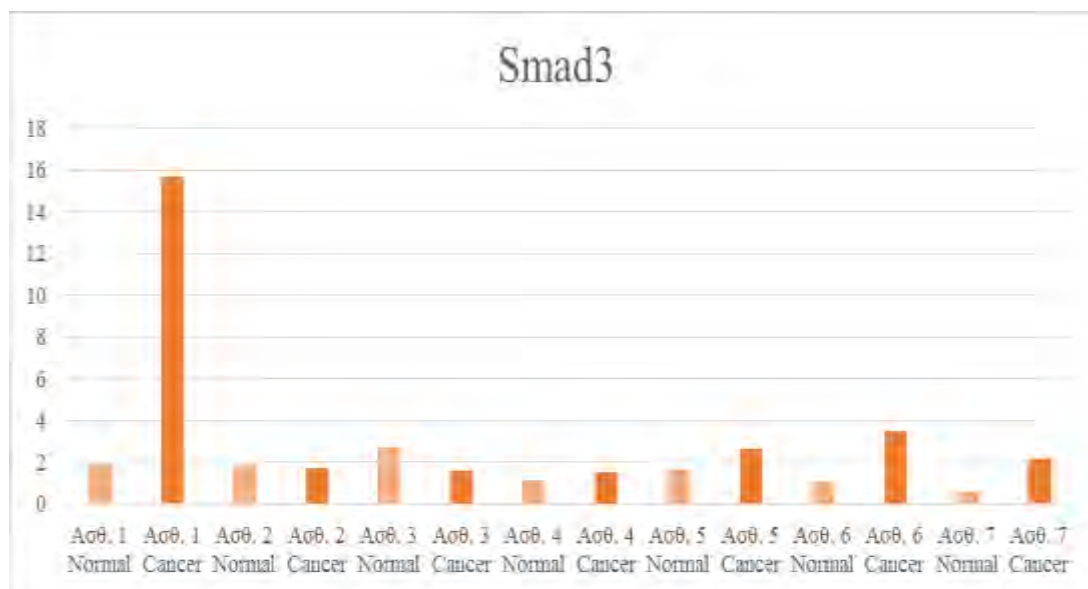
Εικόνα 25: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες Smad2, Smad3, phospho-Smad4, Smad4 και TGFβ σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γεινιάζοντες φυσιολογικούς.



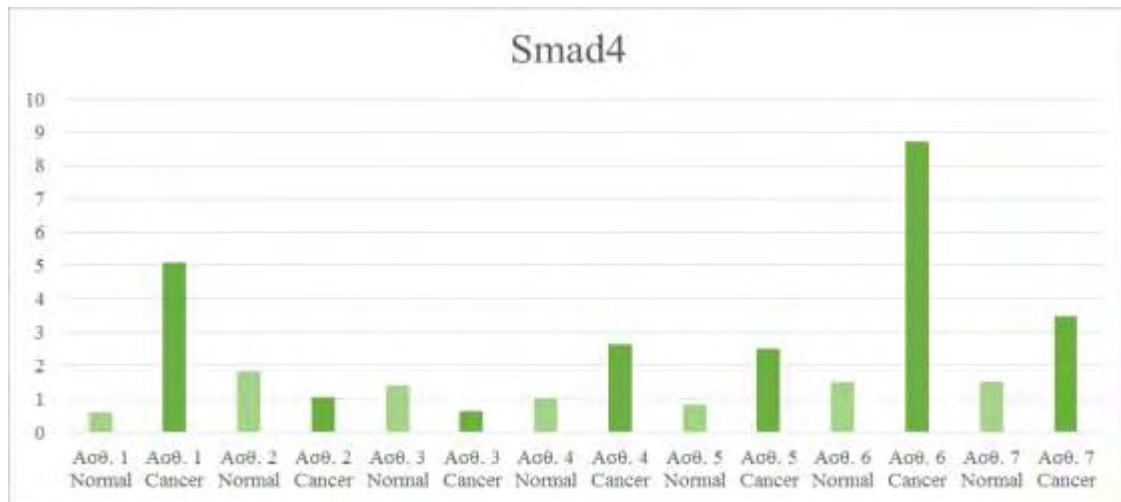
Εικόνα 26: Μοτίβο έκφρασης της πρωτεΐνης TGF-Beta σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γεινιάζοντες φυσιολογικούς



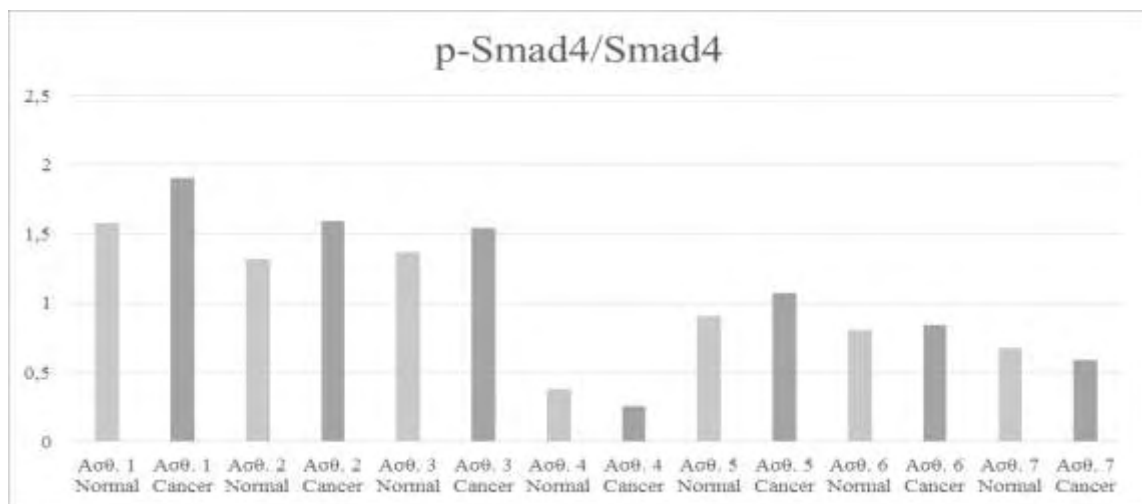
Εικόνα 27: Μοτίβο έκφρασης της πρωτεΐνης Smad2 σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γειτνιάζοντες φυσιολογικούς



Εικόνα 28: Μοτίβο έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3 σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γειτνιάζοντες φυσιολογικούς

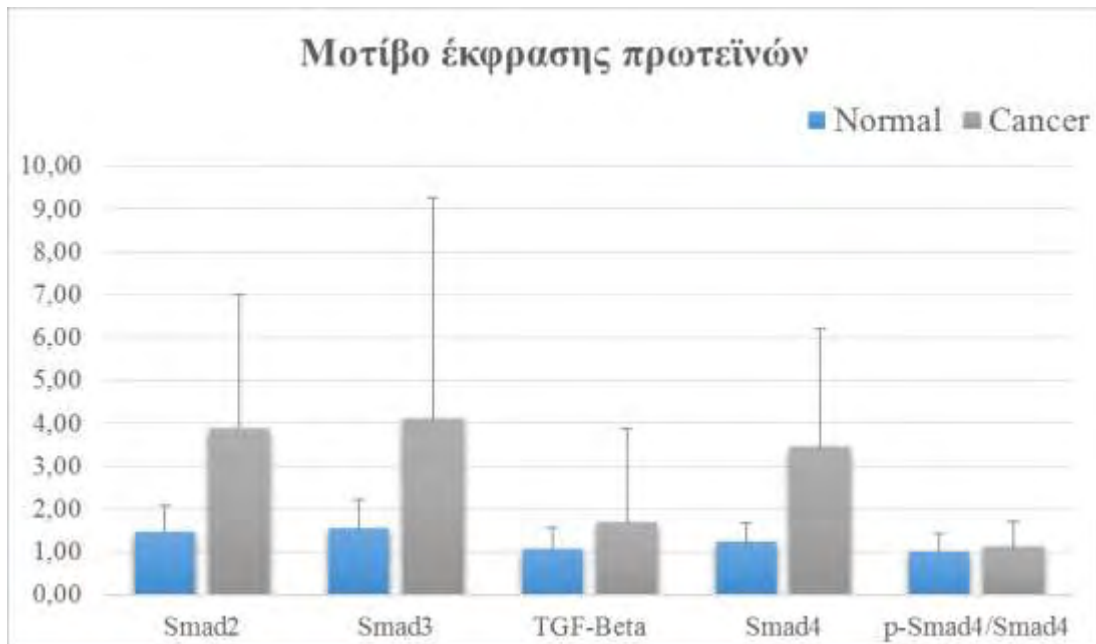


Εικόνα 29:Μοτίβο έκφρασης της πρωτεΐνης Smad4 σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γειτνιάζοντες φυσιολογικούς



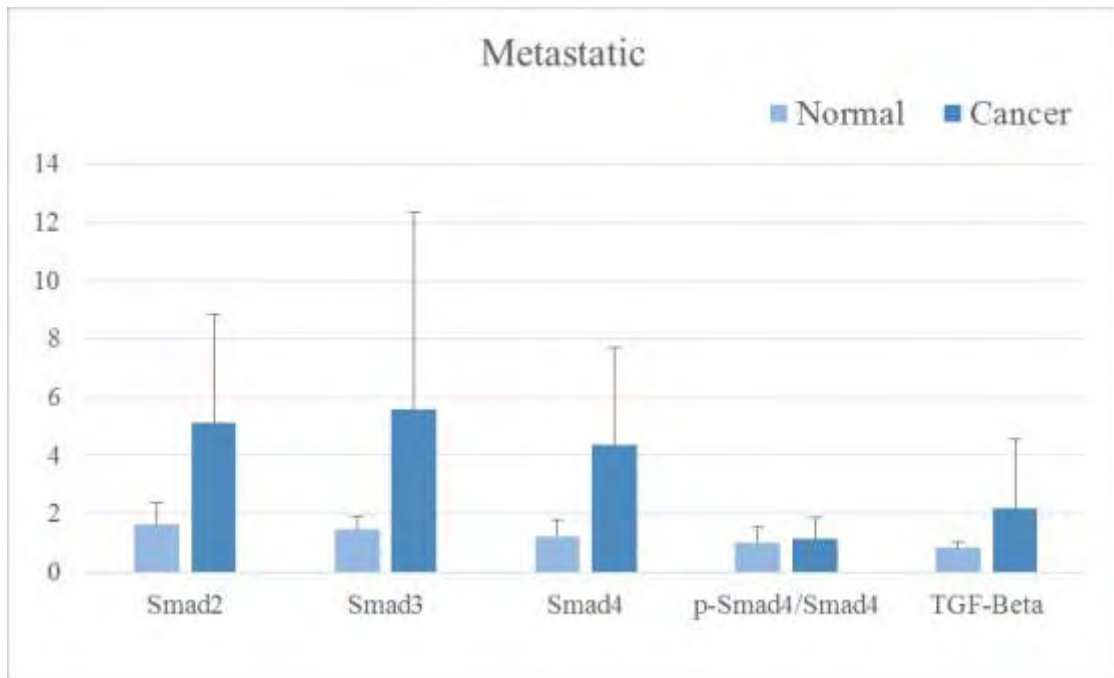
Εικόνα 30:Μοτίβο έκφρασης της αναλογίας των πρωτεϊνών p-Smad4/Smad4 σε καρκινικούς ιστούς και στους αντίστοιχους γειτνιάζοντες φυσιολογικούς

Συγκεντρωτικά, παρατηρούμε στην εικόνα 29 ότι οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad4 τείνουν να είναι στατιστικά σημαντικά υπέρ του καρκίνου ( $T\text{-test}_{Smad2} = 0,066$  και  $T\text{-test}_{Smad4} = 0,058$ ). Αντίθετα, τα αποτελέσματα των πρωτεϊνών Smad3, TGFβ και p-Smad4 /Smad4 δεν είναι στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων.

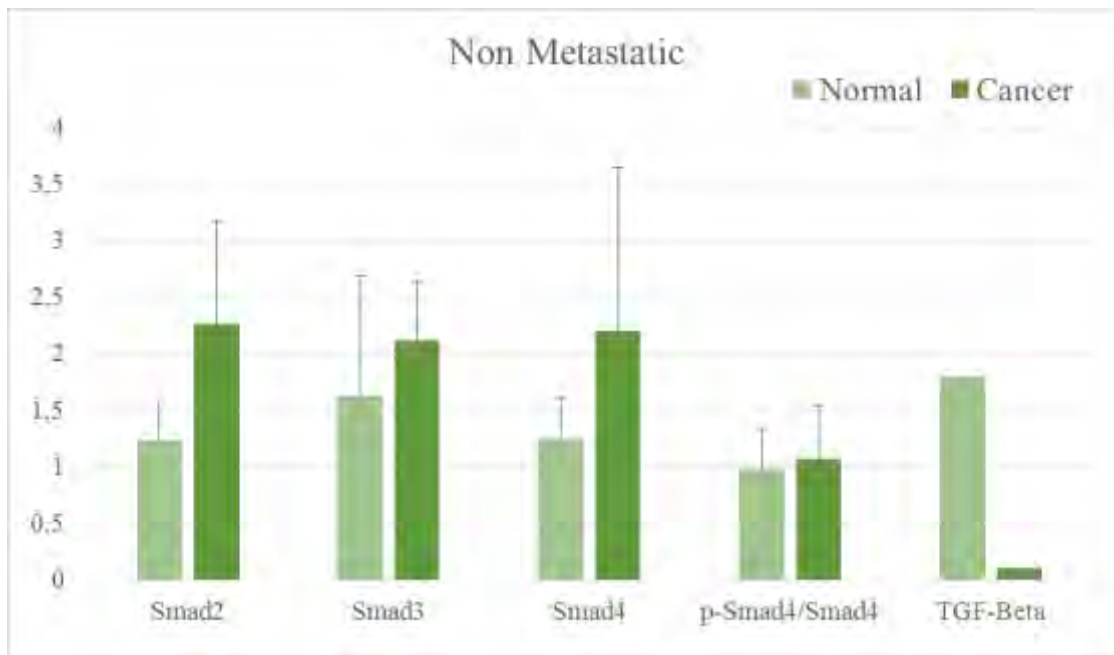


Εικόνα 31: Γενικό μοτίβο έκφρασης πρωτεϊνών στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω σε αυτούς, που εμφάνισαν μετάσταση (Ασθενείς 1 & 6) ή στους οποίους έχουν εντοπιστεί ύποπτοι λεμφαδένες (Ασθενείς 2 & 4) και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν μετάσταση. Στα γραφήματα των εικόνων 30 (Metastatic) και 31 (Non Metastatic) παρατηρούμε ότι οι αναλογίες των πρωτεϊνών Smad2, Smad3, Smad4 μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού έχουν μεγάλη διαφορά στους μεταστατικούς ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν μετάσταση. Επίσης, ο TGFβ στους μεταστατικούς ασθενείς εμφανίζεται υπερεκφρασμένος στον καρκίνο, κάτι που δεν παρατηρείται στους μη μεταστατικούς ασθενείς. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο γράφημα του TGFβ για τους ασθενείς χωρίς μετάσταση υπάρχει μόνο ένα δείγμα, με αποτέλεσμα το γράφημα για τον TGFβ στην συγκεκριμένη περίπτωση να μην είναι αντιπροσωπευτικό. Τέλος, η αναλογία phospho-Smad4/Smad4 δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα μεταξύ των ασθενών με μετάσταση και των ασθενών χωρίς μετάσταση.



Εικόνα 32: Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών σε ασθενείς που εμφάνισαν μετάσταση ή ύποπτους λεμφαδένες.



Εικόνα 33: Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών σε ασθενείς που εμφάνισαν μετάσταση ή ύποπτους λεμφαδένες.

## Συζήτηση

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, αναλύθηκαν 7 καρκινικοί ιστοί μαζί με τους γεινιάζοντες φυσιολογικούς ιστούς, που απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, για τα επίπεδα των πρωτεϊνών TGF-beta, Smad2, Smad3, Smad4 καθώς και την αναλογία p-Smad4/Smad4.

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε, αρχικά, η β-ακτίνη και το GAPDH, τα οποία, στη συνέχεια, κρίθηκαν ακατάλληλα για το σκοπό αυτό σε καρκινικούς ιστούς. Αυτό συμβαίνει πιθανά, επειδή η έκφρασή τους μπορεί να αλλάζει στους καρκινικούς ιστούς των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Ferguson et al, τα housekeeping genes β-ακτίνη, GAPDH, β-tubulin θεωρούνται ακατάλληλα ως γονίδια αναφοράς σε ιστούς ασθενών, καθώς η συγκέντρωσή τους μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ιστών ή να επηρεαστεί από παθολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η φαρμακευτική αγωγή των ασθενών, το άγχος, η ηλικία το φύλο.<sup>58</sup> Επιπλέον, το GAPDH είναι ένα γλυκολυτικό ένζυμο, το οποίο στους παγκρεατικούς καρκινικούς ιστούς φαίνεται να αυξάνεται σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, ένα φαινόμενο ευρέως γνωστό ως «επίδραση Warburg» (Warburg Effect).<sup>58,59</sup> Ειδικότερα, στους υποξικούς καρκινικούς ιστούς, ενεργοποιείται ο παράγοντας HIF-1 (Hypoxia Inducing Factor-1) ενεργοποιώντας, με τη σειρά του, γλυκολυτικά ένζυμα, όπως είναι το GAPDH.<sup>60</sup> Ακόμη, το GAPDH έχει συνδεθεί με επαγόμενη αγγειογένεση και διήθηση των λεμφοκυττάρων καθώς και με πρόωθηση της κακοήθειας στον παγκρεατικό καρκίνο.<sup>58-60</sup>

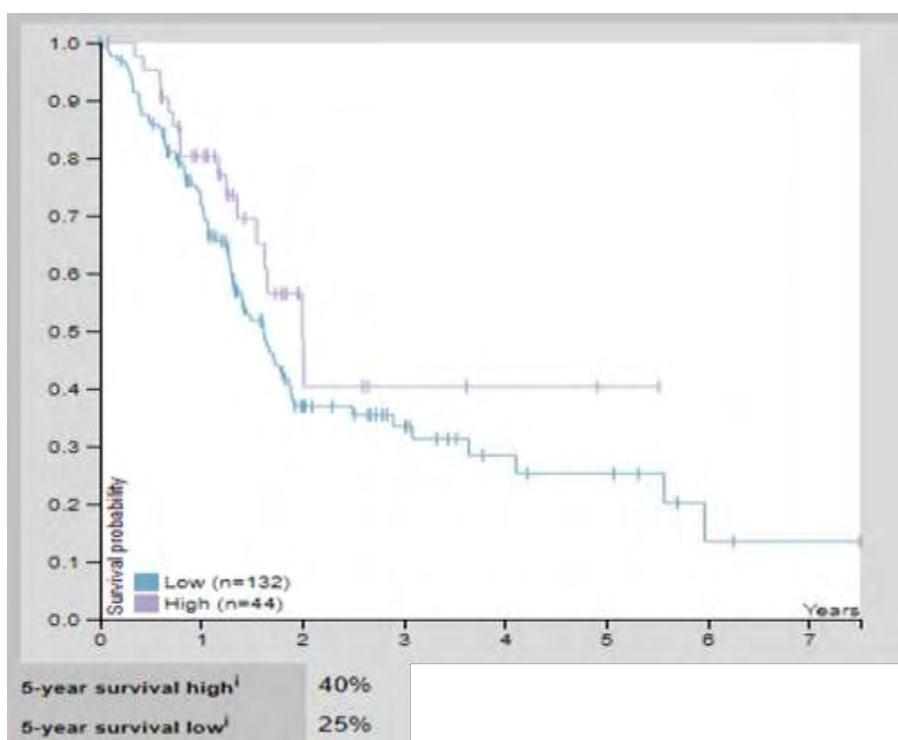
Τελικά, η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με βάση την πρωτεΐνη DJ-1, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο PARK7, που λειτουργεί ως ογκογονίδιο και εντοπίζεται στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1(1p36). Μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού σχετίζονται με τη νόσο Parkinson.<sup>61</sup> Ως γονίδιο αναφοράς ο DJ-1 δεν χρησιμοποιείται ευρέως, όπως το GAPDH και η β-ακτίνη, αλλά φαίνεται να υπερτερεί αυτών γιατί αφενός η έκφραση του δεν φαίνεται να επηρεάζεται τόσο όσο των δύο τελευταίων από τον τύπο του ιστού αλλά και από παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος ενώ επιπλέον εκφράζεται 10-100 φορές λιγότερο, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται ο κορεσμός του σήματος της πρωτεΐνης.<sup>62</sup>

Επειδή στη βιβλιογραφία δεν έχουν μελετηθεί ευρέως οι πρωτεΐνες, που μελετώνται στην συγκεκριμένη εργασία, τα συγκεντρωτικά επίπεδα της κάθε πρωτεΐνης από τους επτά ασθενείς συγκρίθηκαν με τις πληροφορίες της ανοιχτής βάσης δεδομένων Human Atlas Protein.<sup>62</sup> Η συγκεκριμένη βάση εμφανίζει τα επίπεδα των mRNA των γονιδίων, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες, που μελετώνται στην παρούσα εργασία, και παρουσιάζει διαγράμματα Kaplan-Meier, τα οποία παρουσιάζουν τη σχέση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των mRNA και της επιβίωσης των ασθενών. Στα διαγράμματα αυτά οι ασθενείς χωρίζονται σε δύο ομάδες: σε αυτούς με υψηλή έκφραση (High) και σε αυτούς με χαμηλή έκφραση πρωτεΐνης (Low). Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό των ασθενών που φτάνουν σε πενταετή επιβίωση με υψηλή συγκέντρωση mRNA και με χαμηλή συγκέντρωση. Η ταξινόμηση των δειγμάτων σε υψηλή και χαμηλή έκφραση έγινε με βάση την ένταση της χρώσης των ιστών από το αντίστοιχο αντίσωμα.<sup>63</sup>

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Human Atlas Protein, ο TGFβ αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του νεφρού καθώς και για τον καρκίνο του εγκεφάλου και του λαιμού. Στον παγκρεατικό καρκίνο, οι περισσότεροι ασθενείς (132 από τους 176) εμφάνισαν μειωμένη συγκέντρωση του TGFβ. Ακόμη, στην

εικόνα 32 αναφέρεται ότι οι ασθενείς με υψηλή συγκέντρωση TGFβ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα πενταετούς επιβίωσης από ότι οι ασθενείς με χαμηλή συγκέντρωση. Με άλλα λόγια, μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών (40%) με υψηλή συγκέντρωση mRNA TGFβ θα επιβιώσουν για μία πενταετία σε σχέση με το ποσοστό των ασθενών (25%) με χαμηλή συγκέντρωση που επιβιώνουν για 5 έτη. Συνεπώς, ο παγκρεατικός καρκίνος σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης, τα οποία σχετίζονται και με μικρότερη διάρκεια ζωής.<sup>63</sup>

Σε αντίθεση με τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην Human Protein Atlas, στην εργασία των Kleeff et al οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι ο TGFβ1 υπερεκφράζεται σε παγκρεατικούς καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς.<sup>63</sup> Οι πληροφορίες αυτές συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας για τον TGFβ.



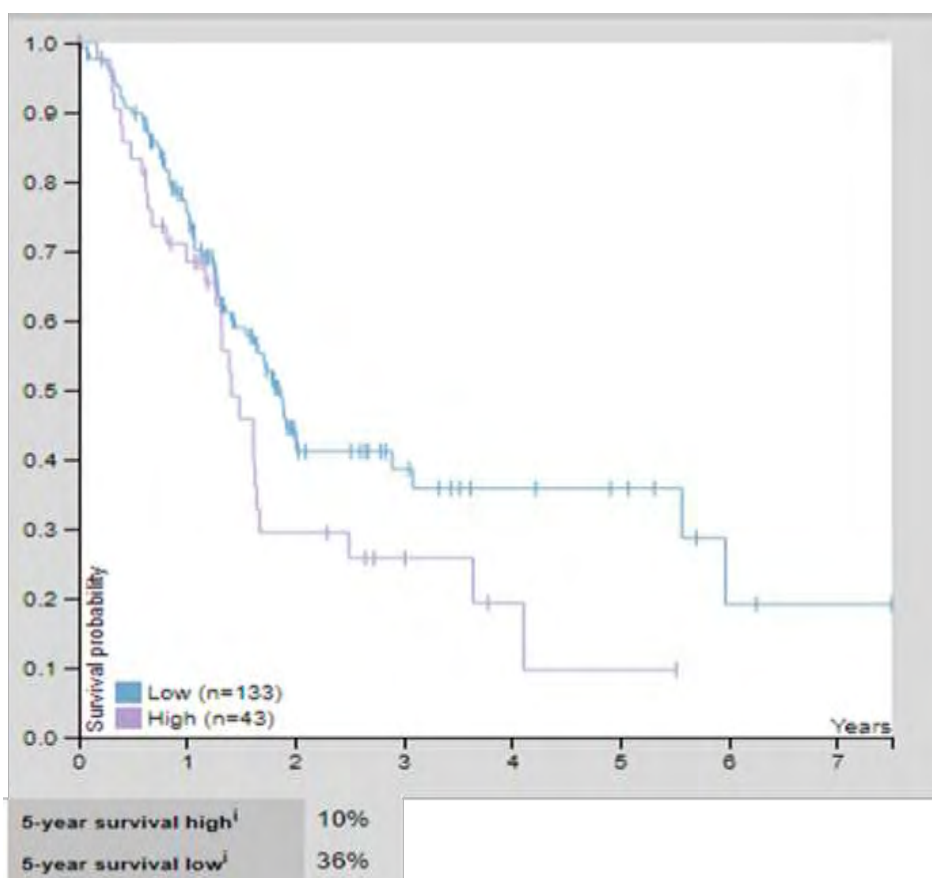
Εικόνα 34: Η πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών με υψηλά και χαμηλά επίπεδα mRNA για τον TGFβ και τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης.<sup>63</sup>

Ωστόσο οφείλουμε να επισημάνουμε εδώ ότι αν και οι καρκινικοί ιστοί της παρούσας εργασίας εμφανίζουν υψηλά επίπεδα TGFβ, αυτά δεν είναι στατιστικά σημαντικά, όπως αυτό αξιολογήθηκε με τη χρήση του student's test (t-test). Το γεγονός αυτό πολύ πιθανόν να οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων, και γι' αυτό θα ήταν καλό να συνεχισθεί η μελέτη με περισσότερα δείγματα ασθενών, ώστε να βγει ένα πιο αντιπροσωπευτικό και στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη Smad2, αποτελεί προγνωστικό μη ευνοϊκό δείκτη για τον καρκίνο του ήπατος.<sup>63</sup> Σύμφωνα με τους Kleeff et al, υπερεκφράζεται στους καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς και μάλιστα συμμετατοπίζεται μαζί με τον TGFβ στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας έδειξε ότι μεσαία έως υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της Smad2 συνδυάζονται με μεσαία έως υψηλά επίπεδα δραστηριότητας του TGFβ, αντίστοιχα.<sup>64</sup> Όπως φαίνεται στην εικόνα 33, μόνο το 10% των ασθενών, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Smad2 επιβιώνει για πέντε χρόνια. Αντίθετα το ποσοστό των ασθενών, που εμφανίζουν



χαμηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης και φτάνουν την πενταετή επιβίωση, είναι 36%.<sup>63</sup> Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη Smad2 φαίνεται να υπερεκφράζεται στον παγκρεατικό καρκίνο, με τα αυξημένα επίπεδά της να σχετίζονται με φτωχότερη πρόγνωση.

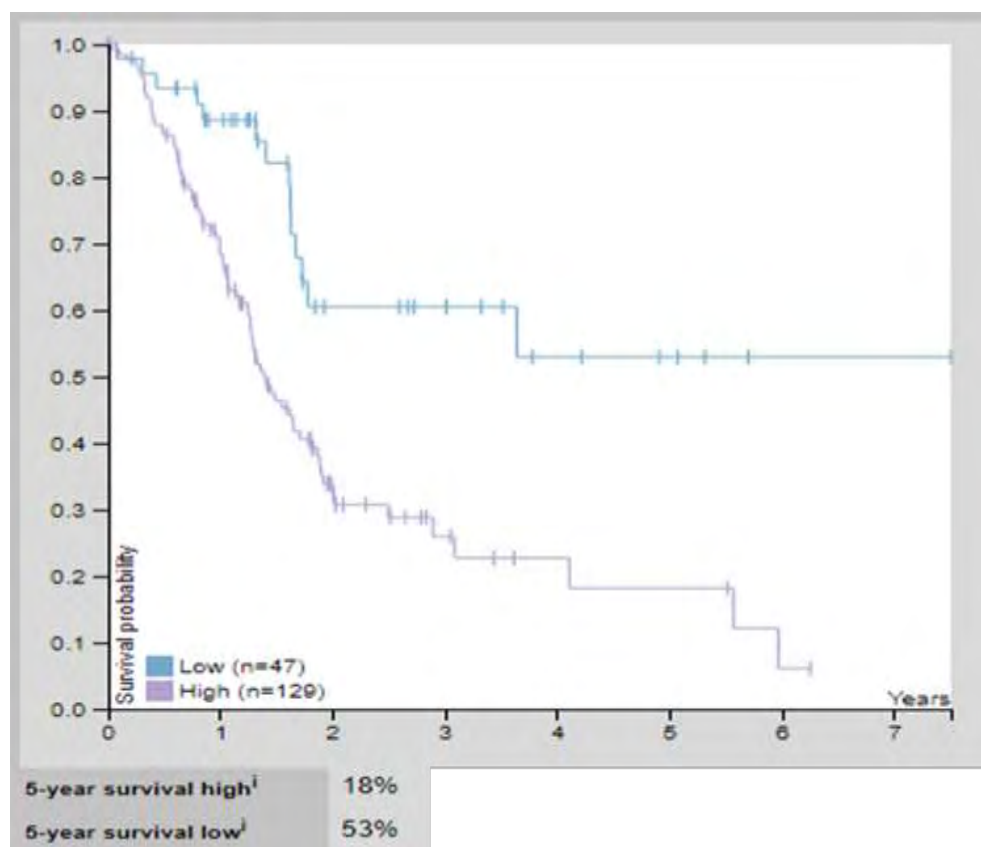


Εικόνα 35: Η πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών με υψηλά και χαμηλά επίπεδα mRNA για τη Smad2 και τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης.<sup>63</sup>

Τα παραπάνω συμπεράσματα της βιβλιογραφίας συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας για την πρωτεΐνη Smad2, τα οποία τείνουν να είναι και στατιστικά σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test.

Σύμφωνα με τον Yamazaki et al, η υψηλές συγκεντρώσεις της Smad3 σχετίζονται με μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, υψηλό βαθμό (grade) όγκου, επαγωγή της επιθηλιομεσεγχυματικής μετάπτωσης και φτωχή πρόγνωση.<sup>65</sup> Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν και με τις πληροφορίες από τη βάση δεδομένων Human Protein Atlas, σύμφωνα με την οποία, η υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης Smad3 σχετίζεται με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης (18% των ασθενών). Αντίθετα, όπως απεικονίζει και το διάγραμμα Kaplan-Meier στην εικόνα 34, λίγο παραπάνω από τους μισούς ασθενείς φτάνουν την πενταετή επιβίωση, όταν έχουν χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης. Εδώ θα πρέπει να τονίσουμε ότι η Smad3 αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του παγκρέατος.<sup>63</sup> Συγκρίνοντας τις παραπάνω πληροφορίες, με το διάγραμμα της εικόνας 29 παρατηρούμε υπερέκφραση της Smad3 στους καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς, η οποία όμως δεν ακολουθεί στατιστική σημαντικότητα, εξαιτίας του μικρού αριθμού των δειγμάτων. Ακόμη, στο διάγραμμα της εικόνας 30 η αναλογία της έκφρασης της πρωτεΐνης μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού στους ασθενείς με μετάσταση είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την αναλογία στους ασθενείς που

δεν εμφάνισαν μετάσταση, δικαιολογώντας την συμμετοχή της πρωτεΐνης στην επιθηλιομεσεγχυματική μετάπτωση και κατ' επέκταση στο σχηματισμό μεταστατικού όγκου.



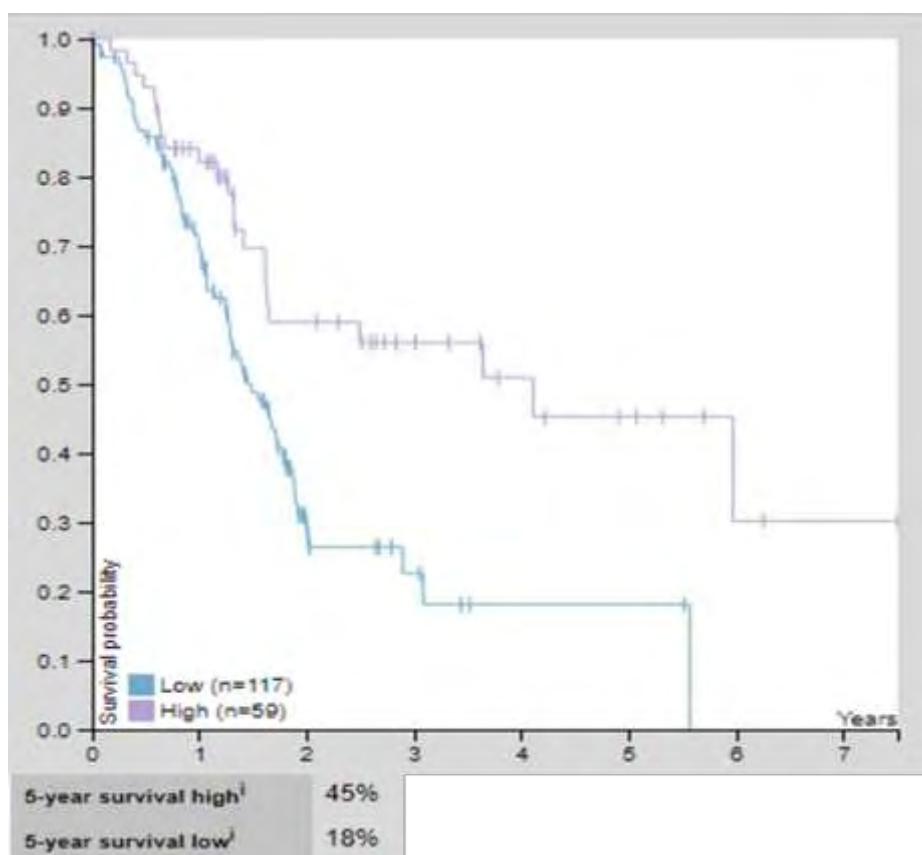
Εικόνα 36: Η πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών με υψηλά και χαμηλά επίπεδα mRNA για τη Smad3 και τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης.<sup>63</sup>

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, χρήσιμη θα ήταν η επανάληψη του της μελέτης της έκφρασης της Smad3, με την χρήση περισσότερων παγκρεατικών καρκινικών ιστών.

Τέλος, περνώντας στην Smad4, η βάση δεδομένων Human Protein Atlas υποστηρίζει ότι στην πλειοψηφία των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο (6/11) παρατηρείται απώλεια της πρωτεΐνης ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς εμφανίζουν μεσαία έως χαμηλή έκφραση της Smad4.<sup>63</sup> Σύμφωνα με τους Sasaki et al, η απώλεια της Smad4 οφείλεται σε απενεργοποίηση του γονιδίου, και εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά σε διηθητικούς καρκινικούς ιστούς από ότι σε μη διηθητικούς. Ακόμη, η απενεργοποίηση του γονιδίου και κατ' επέκταση η απώλεια της πρωτεΐνης συμβαδίζει με την ανάπτυξη του όγκου και συμβάλλει, τελικά, στην ανάπτυξη διηθητικού όγκου.<sup>66</sup> Ακόμη έχει βρεθεί ότι η απώλεια της πρωτεΐνης αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ευρείας μετάστασης και συνδέεται με φτωχή πρόγνωση επιβίωσης των ασθενών. Με άλλα λόγια, ασθενείς με έκφραση της Smad4 έχουν καλύτερη κλινική εικόνα στην συστηματική χημειοθεραπεία, σε σχέση με ασθενείς που χαρακτηρίζονται από απώλεια Smad4.<sup>67</sup>

Τα παραπάνω δεδομένα συμβαδίζουν και με τα στοιχεία από το Human Protein Atlas για την πρωτεΐνη Smad4. Στο διάγραμμα της εικόνας 35 γίνεται αντιληπτό ότι οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση Smad4 έχουν υψηλότερη πιθανότητα επιβίωσης με

το ποσοστό των ασθενών που επιβιώνουν για μία πενταετία να φτάνει περίπου στο μισό (45%).



Εικόνα 37: Η πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών με υψηλά και χαμηλά επίπεδα mRNA για τη Smad4 και τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης.<sup>63</sup>

Τα αποτελέσματα, όμως, της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν μια τάση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης στους καρκινικούς ιστούς, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Ωστόσο θα πρέπει και πάλι να επισημάνουμε τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων ασθενών, που πιθανά δεν επιτρέπουν να επιτευχθεί η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων.

Κλείνοντας, είναι γνωστό ότι η Smad4 φωσφορυλιώνεται σε μία περιοχή SAD (Smad Activation Domain) στο COOH-τελικό άκρο της περιοχής του συνδέτη (linker region) ανάμεσα στα κατάλοιπα των αμινοξέων 275-322. Η φωσφορυλίωση της Smad4 από την ERK 2 στη Thr276 είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη συσσώρευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα σε απάντηση του TGFβ, την σταθεροποίησή της μέσα στον πυρήνα και τελικά, την ενεργοποίησή της μεταγραφικής της δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης στην Thr276 μπορεί να αλλάξει την αναλογία της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Έχει βρεθεί ότι είναι απίθανο η φωσφορυλίωση από μόνη της να σταθεροποιήσει την πρωτεΐνη μέσα στον πυρήνα απουσία του TGFβ.<sup>68</sup> Όπως φαίνονται και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η αναλογία μεταξύ της p-Smad4 και της Smad4 δεν αλλάζει μεταξύ των φυσιολογικών και των καρκινικών ιστών.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι, οι πρωτεΐνες TGFβ, Smad2, Smad3 & Smad4 δείχνουν μία τάση υπερέκφρασης στους παγκρεατικούς καρκινικούς ιστούς. Επιπλέον, η αναλογία μεταξύ της Smad4 και της

φωσφορυλιωμένης της μορφής, δεν φαίνεται να επηρεάζεται στους καρκινικούς ιστούς, καθώς παραμένει σταθερή τόσο στους υγιείς γειτνιάζοντες φυσιολογικούς, όσο και στους καρκινικούς ιστούς, σε γενικές γραμμές. Τα παραπάνω αποτελέσματα, όμως, δεν ακολουθούν τη στατιστική σημαντικότητα της δοκιμασίας T-test. Για την απόκτηση, λοιπόν, αξιόπιστων αποτελεσμάτων, τα οποία θα χαρακτηρίζονται, κυρίως από επαναληψιμότητα, απαιτείται η διεξαγωγή πειράματος, το οποίο θα μελετάει τη έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών σε περισσότερα δείγματα ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος μαζί με τους αντίστοιχους γειτνιάζοντες φυσιολογικούς ιστούς.

## **Βιβλιογραφία**

1. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
2. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010;29(41):5545-5555. doi:10.1038/onc.2010.323.Analysis
3. Jiang B, Liu L. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. In: *Advances in Cancer Research*. Vol 102. Elsevier Inc.; 2009:19-65. doi:10.1016/S0065-230X(09)02002-8
4. Chen M, Yang Y, Liu Y, Chen C. The Role of Chromosome Deletions in Human Cancers. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1044:135-148. doi:10.1007/978-981-13-0593-1
5. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5308-5316. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023
6. JW1 S, WE. W. Hayflick , his limit , and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:72-76.
7. Blasco MA. TELOMERES AND HUMAN DISEASE : AGEING , CANCER AND BEYOND. *Nature*. 2005;6:611-622. doi:10.1038/nrg1656
8. Wicki A, Christofori G. The angiogenic switch in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(5):329-337. doi:10.1007/978-3-540-33177-3\_4
9. Ferrara N. History of Discovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(6):789-791. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179663
10. Gabhann FMAC, Popel AS. Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Microcirculation*. 2008;15(8):715-738. doi:10.1080/10739680802095964
11. Si S, Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states : acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):265-273. doi:10.1038/nrc2620
12. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-Mesenchymal Transition. *Am J Pathol*. 2009;174(5):1588-1593. doi:10.2353/ajpath.2009.080545
13. Berx G, Roy F Van. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):1-28.
14. Cavallaro U, Christofori G. CELL ADHESION AND SIGNALLING BY CADHERINS AND IG-CAMS IN CANCER. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(February):118-132. doi:10.1038/nrc1276
15. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):220-228. doi:10.1038/nrm2858
16. Jackson SP, Bartek J. biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-1078. doi:10.1038/nature08467
17. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Review Immunity , Inflammation , and

- Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
18. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism : a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009;23(5):537-548. doi:10.1101/gad.1756509.GENES
  19. Deberardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer : Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell*. 2008;7(1):11-20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002
  20. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-271. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324
  21. 3 stages of cancer developement. <http://www.webdicine.com/3-stages-of-cancer-development.html>. Accessed July 28, 2018.
  22. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
  23. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(1):16-27. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578
  24. The Pancreas and Its Functions | Columbia University Department of Surgery. <http://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions>. Accessed July 30, 2018.
  25. Hall JE, Guyton AC. Insulin, Glucagon, and Diabetes Mellitus. In: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Elsevier Inc.; 2011:939-954.
  26. Hall JE, Guyton AC. Secretory Functions of the Alimentary Tract. In: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Elsevier Inc.; 2011:773-788.
  27. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*. 1999;49(2):1,33-64. doi:10.3322/caac.20107.Available
  28. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
  29. Neureiter D, Jäger T, Ocker M, Kiesslich T. Epigenetics and pancreatic cancer: Pathophysiology and novel treatment aspects. *World J Gastroenterol*. 2014;20(24):7830-7848. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7830
  30. Syl M, Cruz DDELA, Young AP, Ruffin MT. Diagnosis and Management of Pancreatic Cancer. *Am Fam Physician*. 2014;89(8):626-632.
  31. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1252-1261. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.068
  32. Lee ES, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer : A state-of-the-art review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(24):7864-7877. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7864
  33. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (

- CA 19-9 ) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33(3):266-270. doi:10.1016/j.ejso.2006.10.004
34. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Vol 144. 1st ed. Elsevier Inc.; 2016:241-275. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.09.008
  35. Xia X, Wu W, Huang C, Cen G. SMAD4 and its role in pancreatic cancer. *Tumor Biol.* 2015;36(1):111-119. doi:10.1007/s13277-014-2883-z
  36. Saiki Y, Horii A. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathol Int.* 2014;64(1):10-19. doi:10.1111/pin.12114
  37. Thomopoulos G. Μεταγωγή σήματος και υποδοχείς κινάσης Σερίνης/Θρεονίνης. In: *Ρυθμιστικοί Μηχανισμοί Κυτταρικής Λειτουργίας.* 1st ed. Thessaloniki: University Studio Press; 2006:586-591.
  38. Padua D, Massagué J. Roles of TGFβ in metastasis. *Cell Res.* 2009;19(1):89-102. doi:10.1038/cr.2008.316
  39. Shen W, Tao G, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian Z. TGF-β in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci.* 2017;7(1):39. doi:10.1186/s13578-017-0168-0
  40. Principe DR, Doll JA, Bauer J, et al. TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2):1-16. doi:10.1093/jnci/djt369
  41. Kawabata M, Imamura T, Inoue H. Intracellular Signaling of the TGF- > Superfamily by Smad Proteins. *Ann NEW YORK Acad Sci.* 1999;(73):73-82.
  42. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-. *Nature.* 2003;425:577-584.
  43. Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell.* 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
  44. Costanza B, Umelo I, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal Modulators of TGF-β in Cancer. *J Clin Med.* 2017;6(7):1-25. doi:10.3390/jcm6010007
  45. Ahmed S, Bradshaw A, Gera S, Dewan M, Xu R. The TGF-β/Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. *J Clin Med.* 2017;6(1):1-11. doi:10.3390/jcm6010005
  46. Singh P, Jd W, Srinivasan R. The Smad family and its role in pancreatic cancer. *Indian J Cancer.* 2011;48(3):351-361. doi:10.4103/0019-509X.84939
  47. Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(4):799-804. doi:10.1016/S0006-291X(03)01066-0
  48. Inman GJ, Nicolás FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell.* 2002;10:283-294. doi:S1097276502005853 [pii]
  49. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19:2783-2810. doi:10.1101/gad.1350705.embryo
  50. Melzer C, Hass R, Ohe J Von Der, Lehnert H, Ungefroren H. The role of TGF-

- $\beta$  and its crosstalk with RAC1 / RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma. *Cell Commun Signal*. 2017;15(19):1-11. doi:10.1186/s12964-017-0175-0
51. Ungefroren H, Witte D, Lehnert H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- $\beta$ -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn*. 2018;247(3):451-461. doi:10.1002/dvdy.24505
  52. Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGF-  $\beta$  signaling in tumorigenesis. *Int J Biol Sci*. 2010;6(1):1-8.
  53. Makohon-moore A, Iacobuzio-donahue CA. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer*. 2017;16(9):553-565. doi:10.1038/nrc.2016.66.Pancreatic
  54. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, et al. The SMAD4 Protein and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma The SMAD4 Protein and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7:4115-4121.
  55. Fullerton PT, Creighton CJ, Matzuk MM. Insights Into SMAD4 Loss in Pancreatic Cancer From Inducible Restoration of TGF- $\beta$  Signaling. *Mol Endocrinol*. 2015;29(10):1440-1453. doi:10.1210/me.2015-1102
  56. Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, et al. Inactivation of Smad4 accelerates KrasG12D-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res*. 2007;67(17):8121-8130. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4167
  57. Du Y, Zhou X, Huang Z, et al. Meta-analysis of the prognostic value of Smad4 immunohistochemistry in various cancers. *PLoS One*. 2014;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0110182
  58. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. 2005;5(2):566-571. doi:10.1002/pmic.200400941
  59. Guo C, Liu S, Sun MZ. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(3):167-172. doi:10.1007/s12094-012-0924-x
  60. Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, et al. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol*. 2007;30(4):849-855.
  61. Ariga H, Takahashi-niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-ariga SMM. Neuroprotective Function of DJ-1 in Parkinson ' s Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1-9. doi:10.1155/2013/683920
  62. Mann M. A Proteomics Approach to the Protein Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting. *J Proteome Res*. 2016;15:2321-2326. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00403
  63. The human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org/>. Accessed September 30, 2018.
  64. Kleeff J, Friess H, Simon P, et al. Overexpression of Smad2 and colocalization



- with TGF-beta1 in human pancreatic cancer. *Dig Dis Sci.* 1999;44(9):1793-1802. doi:10.1023/A:1018882320500
65. Yamazaki K, Masugi Y, Effendi K, et al. Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest.* 2014;94(6):683-691. doi:10.1038/labinvest.2014.53
  66. Pathology C, Kosei S, Hospital G. Differential roles of alterations of p53 , p16 , and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Oncol Rep.* 2003;10:21-25.
  67. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, et al. *DPC4* Gene Status of the Primary Carcinoma Correlates With Patterns of Failure in Patients With Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1806-1813. doi:10.1200/JCO.2008.17.7188
  68. Roelen B a J, Cohen OS, Raychowdhury MK, et al. Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(4):C823-30. doi:10.1152/ajpcell.00053.2003