



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ο ρόλος του *c-myc* στον καρκίνο του παγκρέατος»

ΚΑΛΟΓΕΡΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος (επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τζέζου Ασπασία (μέλος)

Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τραχανά Βαρβάρα (μέλος)

Επίκουρη καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF MEDICINE



LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS

MASTER COURSE
«HUMAN GENETICS»

MASTER THESIS
«*The role of c-myc in pancreatic cancer*»

KALOGERA STEGANIA
BIOLOGIST

THREE-MEMBER COMMITTEE

Dimas Konstantinos (supervisor)

Associate Professor of Pharmacology, Department of Medicine, University of Thessaly

Tsezou Aspasia (member)

Professor of Genetics, Department of Medicine, University of Thessaly

Traxana Barbara (member)

Assistant Professor of Cellular Biology, Department of Medicine University of Thessaly

LARISSA, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	7
Abstract	9
Ευρετήριο συντμήσεων.....	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	16
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	16
1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου	17
1.3 Τύποι καρκίνου	18
1.4 Ορόσημα του καρκίνου.....	20
1.5 Μοριακά γεγονότα που συμβάλλουν στην καρκινογένεση	25
1.6 Μετάσταση -Στάδια	27
2. ΠΑΓΚΡΕΑΣ.....	30
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	30
2.2 Ιστολογία.....	31
3. ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	33
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά – Επιδημιολογία	33
3.2 Παράγοντες κινδύνου	34
3.3 Παθοφυσιολογία	35
3.4 Διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου.....	36
3.5 Θεραπεία	37
3.6 Μοριακοί μηχανισμοί εμπλεκόμενοι στην καρκινογένεση του παγκρέατος.....	38
4. c-MYC και παγκρεατικός καρκίνος.....	43
4.1 Δομή και λειτουργία του c-MYC	43
4.2 Κύκλος ζωής του c-MYC	46
4.3 Φωσφορυλίωση του c-MYC και πρωτεϊνική σταθερότητα.....	48
4.4 Ρόλος του c-MYC στον καρκίνο	50
5. c-MYC ως θεραπεία για τον παγκρεατικό καρκίνο	55
5.1 Άμεση στόχευση του c-MYC	55

5.2 Έμμεση στόχευση του c-MYC	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
6. Κυτταροκαλλιέργειες.....	60
6.1 Ανανέωση θρεπτικού υλικού	61
6.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	61
6.3 Μέτρηση κυττάρων.....	62
6.4 Πάγωμα κυττάρων	64
6.5 Ξεπάγωμα κυττάρων.....	65
7. Απομόνωση πρωτεϊνών.....	66
7.1 Λύση κυτταρικών σειρών	66
7.2 Λύση όγκων προερχόμενων από ασθενείς.....	68
8. Μέθοδος Bradford και φωτομέτρηση.....	69
9. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και Western Blotting.....	71
9.1 Προετοιμασία πηκτής	72
9.2 Προετοιμασία δειγμάτων	74
9.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων	75
9.4 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών (ανοσοαποτύπωση).....	76
9.5 Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.....	77
9.6 Δέσμευση πρωτογενούς αντισώματος	77
9.7 Δέσμευση δευτερογενούς αντισώματος.....	79
9.8 Εμφάνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισώματος με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.....	79
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δήμα Κωνσταντίνου. Η ολοκλήρωσή της δε θα ήταν δυνατή χωρίς τη συνεισφορά κάποιων ανθρώπων τους οποίους και οφείλω να ευχαριστήσω.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, που με έκανε δεκτή στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Γενετική του ανθρώπου».

Πολλές εγκάρδιες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Δήμα Κωνσταντίνο, τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, που με δέχτηκε μετά χαράς στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ πραγματικά για τη στήριξη, την καθοδήγηση και την υπομονή του καθόλη την πορεία της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Από την πρώτη στιγμή με ενέπνευσε να ακολουθήσω πιστά αυτό που κάνω και αποτέλεσε πρότυπο για την ενασχόλησή μου με την έρευνα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στις Καθηγήτριες του τμήματος Ιατρικής, κα Τσέζου Ασπασία, καθώς και στην κα Τραχανά Βαρβάρα που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Αυτή που δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω είναι η Σερέτη Ευαγγελία, η υποψήφια διδάκτορας του εργαστηρίου μας. Χωρίς τη συμβολή της πραγματικά θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση των πειραμάτων, αλλά και η συγγραφή της παρούσας εργασίας. Η βοήθεια και η στήριξή της καθόλη τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου στο εργαστήριο ήταν ανεκτίμητη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτρια και φίλη μου Ισιδώρα με την οποία είχαμε άψογο κλίμα συνεργασίας και η οποία ήταν δίπλα μου καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, την Κοτζιακοζίδου Βιβή, Καλαϊτσίδου Ελισάβετ και Νιζάμη Αικατερίνη για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης, σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για το ζεστό και φιλικό κλίμα και για την βοήθεια που μου έδωσαν με χαρά κάθε στιγμή που την χρειάστηκα, τον Καθηγητή κ. Σακελλαρίδη Νικόλαο, διευθυντή του εργαστηρίου, τον κ. Μπέγα Ηλία, την κ. Ασπροδίνη Ευτυχία, την κ. Βασιλάκη Άννα και τον κ. Πιτσικά Νικόλαο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, τους χειρουργούς Ζαχαρούλη Δημήτριο και Μαγουλιώτη Δημήτριο οι οποίοι μας παρείχαν τους παγκρεατικούς ιστούς από τους ασθενείς.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική στήριξή της όλα τα χρόνια της ακαδημαϊκής μου πορείας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη συμφοιτήτρια και

φίλη μου Ελένη για τη συμπαράστασή της τόσο τη φετινή χρονιά όσο και όλα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και το φίλο μου Φώτη ο οποίος ήταν συμπαραστάτης μου καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου και με ενέπνεε κάθε στιγμή με τη θέλησή του, την υπομονή του και το αμείωτο ενδιαφέρον του για τη γνώση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Ο παγκρεατικός καρκίνος αποτελεί έναν από τους πιο επιθετικούς τύπους καρκίνου με τεράστια θνησιμότητα. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να στοχευτεί φαρμακολογικά ο παγκρεατικός καρκίνος, οι οποίες όμως αποτυγχάνουν λόγω της τεράστιας γενετικής ετερογένειας της νόσου. Το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στον παγκρεατικό καρκίνο είναι το *KRAS*. Λόγω των αποτυχημένων προσπαθειών στόχευσης του *KRAS* μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου *c-MYC*, το οποίο ρυθμίζεται από το *KRAS* και αποτελεί το τελικό μόριο-στόχο του. Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής διερευνήθηκε εάν υπάρχει απορρύθμιση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική σταθερότητα του *c-MYC*. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του *c-MYC* στα κατάλοιπα σερίνη 62 και θρεονίνη 58 και εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης θεμελιωδών μορίων που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση του *c-MYC*, όπως για παράδειγμα η GSK3-b μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT.

Υλικά και μέθοδοι: Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε όγκος και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός από επτά ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος (μη μεταστατικούς και μεταστατικούς). Έγινε λύση των ιστών αυτών με σκοπό την απομόνωση των πρωτεϊνών. Αφού ολοκληρώθηκε η απομόνωση ακολούθησε η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford για κάθε δείγμα. Ακολούθησε Western-blot ανάλυση προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *c-MYC* (total), phospho *c-MYC* (Ser62), phospho *c-MYC* (Thr58), GSK3-b (total), phospho GSK3-b (Ser9) στα ζεύγη παγκρεατικών όγκων και φυσιολογικών ιστών καθώς και να συγκριθούν μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού παγκρεατικού ιστού. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η πρωτεΐνη DJ-1. Για την ανεύρεση του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς έγινε Western-blot ανάλυση για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *b-ACTIN*, *GAPDH* και *DJ-1* τόσο σε παγκρεατικούς ιστούς όσο και σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν υπερέκφραση των επιπέδων του total *c-MYC* και στα επτά ζεύγη παγκρεατικών ιστών με τη μεγαλύτερη αύξηση να εμφανίζεται στους μεταστατικούς ασθενείς. Τα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής του *c-MYC* τόσο στη Ser62 όσο και στη Thr58 δε φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Ομοίως, το πρότυπο έκφρασης της GSK3-b παρουσίασε κάποιες διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών, ωστόσο βρέθηκαν μη στατιστικά σημαντικές. Όσον αφορά την καταλληλότητα του γονιδίου αναφοράς, οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων έγιναν με το DJ-1, καθώς φάνηκε μόνο αυτό να έρχεται σε συμφωνία με τη χρωματογραφική μέθοδο ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών (Bradford).

Συμπεράσματα - Συζήτηση: Από τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης βρέθηκε υπερέκφραση του c-MYC στους καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς με τη μεγαλύτερη έκφραση στους μεταστατικούς ασθενείς κάτι το οποίο επιβεβαιώνει ευρήματα που συνδέουν το c-MYC με κακή πρόγνωση και μειωμένη βιωσιμότητα. Επιπλέον, δε φάνηκε να υπάρχει απορρύθμιση του μηχανισμού που ελέγχει την πρωτεϊνική σταθερότητα του c-MYC αφού τα επίπεδα των δύο φωσφορυλιωμένων μορφών του c-MYC δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών.

Λέξεις-Κλειδιά: παγκρεατικός καρκίνος, KRAS, c-MYC, phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), πρωτεϊνική σταθερότητα

Abstract

Purpose: Pancreatic cancer is one of the most aggressive types of cancer with enormous mortality. Many attempts have been made to target pancreatic cancer pharmacologically, but they failed because of the huge genetic heterogeneity of the disease. The most common mutant gene in pancreatic cancer is *KRAS*. Because of the failed attempts to target *KRAS*, we have studied the expression levels of the c-MYC proto-oncogene which is regulated by *KRAS* and is its final target molecule. This study investigated whether there is deregulation of the mechanisms that regulate the protein stability of c-MYC. For this purpose, c-MYC phosphorylation levels were determined at serine 62 and threonine 58 residues and the levels of molecules related with c-MYC phosphorylation, such as GSK3- β through the PI3K / AKT signaling pathway.

Materials and methods: For this purpose, tumor and adjacent normal tissue from seven patients with pancreatic cancer (non-metastatic and metastatic) were used. These tissues were lysed in order to isolate the proteins. After protein isolation, protein quantification was performed by the Bradford method. Western blot analysis was followed to determine the expression levels of c-MYC (total), phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), GSK3- β (total), phospho GSK3- β in the pairs of pancreatic tissues and to compare these levels between cancerous and normal tissues. For the normalization of the results, the DJ-1 protein was used as reference gene. In order to find the appropriate reference gene, Western blot analysis was performed to determine the expression levels of the β -ACTIN, GAPDH and DJ-1 genes in both pancreatic tissues and pancreatic cancer cell lines.

Results: Immunoblotting results showed overexpression of total c-MYC levels in the seven pairs of pancreatic tissues with the highest increase occurring in metastatic patients. Expression levels of the phosphorylated form of c-MYC in both Ser62 and Thr58 did not appear to exhibit statistically significant differences between normal and cancerous tissues. Similarly, the expression pattern of GSK3- β showed some differences between normal and cancer tissues, but they are non-statistically significant. Regarding the reference gene, for the normalization of the results the DJ-1 gene was used, as it was in agreement with the Bradford chromatographic protein quantification method.

Discussion: From the results of the above study, overexpression of c-MYC was found in cancerous pancreatic tissues with the highest expression in metastatic patients, which confirms findings associating c-MYC with poor prognosis and decreased viability. Moreover, there was no deregulation of the mechanism that controls the protein stability of c-MYC since the levels of the two phosphorylated forms of c-MYC did not differ significantly between cancer and normal tissues.

Keywords: pancreatic cancer, KRAS, c-MYC, phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), protein stability

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

AKT	AKT serine/threonine kinase 1
APC	Anaphase-promoting complex
ATM	Adipose Tissue Macrophages
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1	Breast Cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	Breast Cancer type 2 susceptibility protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CA19-9	carbohydrate antigen 19-9 (or cancer antigen 19-9)
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCL5	Chemokine (C-C motif) Ligand 5
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
E2F	A group of genes that codifies a family of transcription factors (TF) in higher eukaryotes
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FBS	Βόειος Εμβρυϊκός Ορός (Fetal Bovine Serum)
FGF1	Acidic Fibroblast Growth Factor (aka aFGF)
GDP	Guanosine diphosphate
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GSK3b	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
kDa	kiloDalton, μονάδα μέτρησης μεγέθους πρωτεϊνών
MAD1	Mitotic Arrest Deficient 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

MAX	Myc-associated factor X
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MHL1	human mutL homolog 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYC	Myelocytomatosis
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PBS	Φωσφορικό Ρυθμιστικό Διάλυμα Άλατος (Phosphate Buffer Saline)
PCP	Planar-Cell Polarity
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PP2A	Protein phosphatase 2A
PRSS1	human cationic trypsinogen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Renin-Angiotensin System
Rb	Retinoblastoma protein
Rpm	Στροφές ανά λεπτό (rounds per minute)
RSK	ribosomal s6 kinase
RT-PCR	Real-timePCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)
SDK1	Sidekick cell adhesion molecule 1
SMAD4	sterile alpha motif domain containing 4

SNP	single-nucleotide polymorphism
STK11	Serine/threonine kinase 11
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TP53	Tumor protein p53
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WNT	Wingless/Integrated
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ένα από τα χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι ο αυστηρός έλεγχος στον οποίο υπόκεινται τόσο η ανάπτυξη όσο και η διαίρεση των επιμέρους σωματικών τους κυττάρων. Εξαιρέση αποτελούν τα καρκινικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από φυσιολογικά κύτταρα που έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού ή/και της απόπτωσης (Park and Lee 2003) (<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος ορίζεται ως η ταχύτατη δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν έξω και πέρα από τα φυσιολογικά τους όρια και να εισβάλλουν σε άλλα παρακείμενα ή απομακρυσμένα όργανα (μετάσταση) και να οδηγήσουν στην εκδήλωση της νόσου και στο θάνατο του ξενιστή, εάν αυτή δεν είναι ιάσιμη.

Ο όρος καρκίνος δε θα πρέπει να συγχέεται με τον όρο όγκος. Ως όγκος ορίζεται μια ακανόνιστη μάζα ιστού προερχόμενη είτε από κύτταρα που διαιρούνται ανεξέλεγκτα είτε από κύτταρα που διαφεύγουν της απόπτωσης και έτσι καθίστανται αθάνατα. Οι όγκοι μπορεί να είναι είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις ανάλογα με την ικανότητά τους να εξαπλώνονται, ενώ ο καρκίνος είναι μια επιθετική μάζα κυττάρων με ικανότητα μετάστασης. Στο σημείο αυτό θα δοθούν κάποιοι ορισμοί ώστε να αποσαφηνιστούν ορισμένες έννοιες.

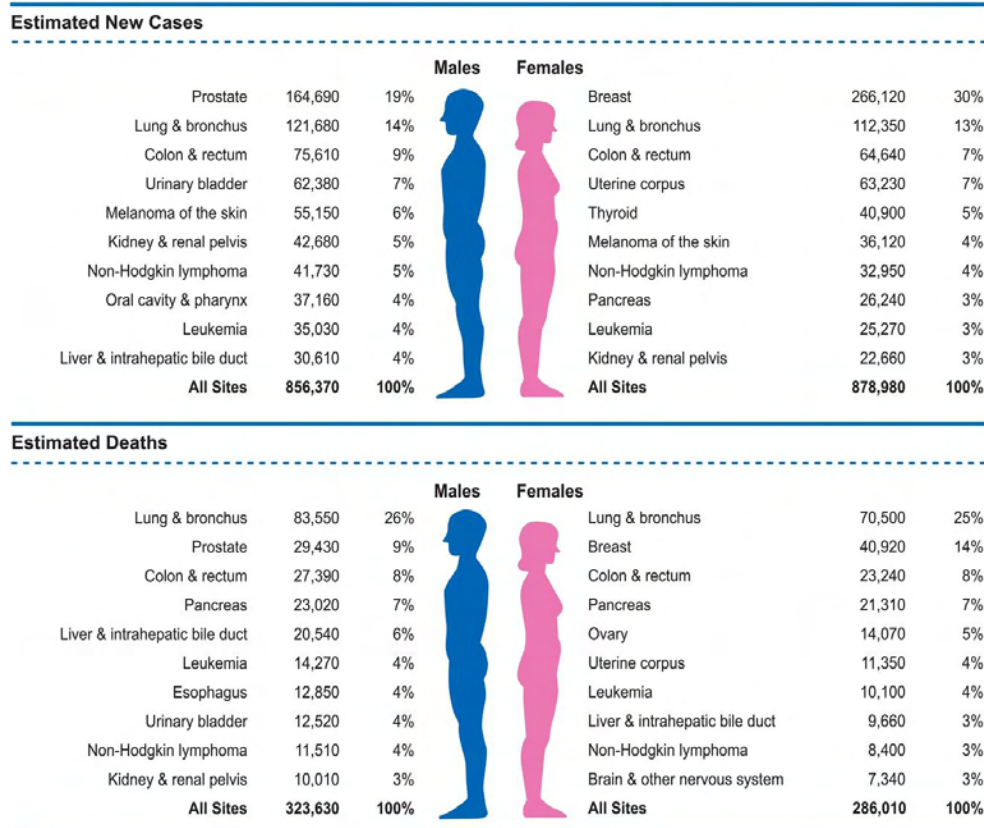
- **Νεόπλασμα:** πρόκειται για την ανάπτυξη μιας ανώμαλης μάζας κυττάρων τα οποία αναπτύσσονται ταχύτατα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>).
- **Καλοήθεις όγκοι:** πρόκειται για όγκους οι οποίοι σε αντίθεση με τους κακοήθεις δεν έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν ή να εξαπλωθούν σε άλλους ιστούς. Επιπλέον, όταν αυτοί οι όγκοι αφαιρούνται συνήθως δεν επανεμφανίζονται όπως συμβαίνει μερικές φορές με τους κακοήθεις. Εξαιρέση αποτελούν οι καλοήθεις όγκοι στον εγκέφαλο οι οποίοι μπορούν να αποβούν αρκετά επικίνδυνοι. Τέλος, υπάρχουν σπάνιες περιπτώσεις όπου το μέγεθος της καλοήθους μάζας είναι τέτοιο ώστε να πιέζει γειτονικά ζωτικά όργανα ή ιστούς (Robert Allan Weinberg, *Biology of Cancer*).

- ο Κακοήθεις όγκοι: πρόκειται για όγκους με πολύ υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού που μπορούν να εξαπλωθούν και να εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς. Επιπλέον, καθώς οι όγκοι αυτοί μεγαλώνουν, καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποσπαστούν και να μεταφερθούν σε άλλους ιστούς μέσω της αιματικής ή λεμφικής κυκλοφορίας όπου έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν νέους όγκους μακριά από τον αρχικό όγκο. Μόνο οι κακοήθεις όγκοι αναφέρονται ως καρκίνοι.

1.2 *Επιδημιολογία του καρκίνου*

Ο καρκίνος αποτελεί παγκοσμίως τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά προβλήματα και ευθύνεται για το 1/6 των θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2015 σημειώθηκαν 8,8 εκατομμύρια θάνατοι λόγω καρκίνου, ενώ εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 τα περιστατικά καρκίνου σε ετήσια βάση θα αυξηθούν σε 23,6 εκατομμύρια. Το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Ηνωμένων Πολιτειών (National Cancer Institute) εκτιμά το 2018 1.730.00 νέα περιστατικά καρκίνου στις ΗΠΑ.

Μεταξύ των δύο φύλων, στους άνδρες ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου σε ηλικίες άνω των 40 ετών, ενώ όγκοι στον εγκέφαλο και γενικά στο νευρικό σύστημα σε ηλικίες κάτω των 40 ετών. Στις γυναίκες, η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο σε ηλικίες άνω των 20 ετών αποτελεί ο καρκίνος του μαστού και ακολούθως ο καρκίνος του πνεύμονα, ενώ σε ηλικίες κάτω των 20 ετών οι όγκοι στον εγκέφαλο και στο νευρικό σύστημα (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>) (Torre et al. 2015) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των συχνότερων τύπων καρκίνου.

(Siegel, Miller and Jemal 2018)

1.3 Τύποι καρκίνου

Υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου οι οποίοι διαφέρουν στη γενετική τους σύσταση, στην αιτιολογία, στα κλινικά χαρακτηριστικά, στην εξέλιξη και στην κατάληξή τους. Οι τύποι του καρκίνου συνήθως, ονομάζονται από το όργανο ή τον ιστό από όπου ο καρκίνος ξεκινάει. Ωστόσο, οι τύποι του καρκίνου μπορούν επίσης να περιγραφούν με βάση τον τύπο του κυττάρου από τον οποίο ξεκινάει ένας καρκίνος όπως περιγράφεται παρακάτω:

- **Καρκινώματα:** πρόκειται για όγκους επιθηλιακών κυττάρων που αποτελούν το 90% των καρκίνων (Tanos and Rodriguez-Boulan 2008). Τα καρκινώματα ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου από τον οποίο προέρχονται διακρίνονται σε:

- Αδενοκαρκινώματα: προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα που παράγουν διάφορα υγρά ή βλέννα.
 - Βασικοκυτταρικά καρκινώματα: προέρχονται από κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας.
 - Πλακώδη καρκινώματα: προέρχονται από τα υπόλοιπα επιθηλιακά κύτταρα.
 - Καρκινώματα μεταβατικών κυττάρων: πρόκειται για έναν τύπο καρκινώματος που επηρεάζει κυρίως το ουροποιητικό σύστημα. Προέρχεται από το μεταβατικό επιθήλιο ή αλλιώς ουροθήλιο, δηλαδή επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται αποκλειστικά στα όργανα του ουροποιητικού συστήματος. Χαρακτηρίζεται ως μεταβατικό, διότι αλλάζει η μορφολογία των κυττάρων από κυλινδρικό σε πλακώδες και αντίστροφα (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>).
- **Σαρκώματα:** πρόκειται για συμπαγείς όγκους που προέρχονται από ποικίλους τύπους μεσεγχυματικών κυττάρων όπως ινοβλάστες, λιποκύτταρα, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα κλπ και αποτελούν περίπου το 1% των καρκίνων (Cormier and Pollock 2007).
 - **Καρκίνους του αιμοποιητικού συστήματος:** αποτελούν το 8% των καρκίνων (Cooper 2000) και διακρίνονται σε:
 - **Λευχαιμίες:** αυτοί οι καρκίνοι προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και δε σχηματίζουν στερεούς όγκους. Διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες ανάλογα με το πόσο γρήγορα εξελίσσονται και σε λεμφοβλαστικές ή μυελοειδείς ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων όπου ξεκινάει ο καρκίνος.
 - **Λεμφώματα:** πρόκειται για καρκίνους οι οποίοι προέρχονται από τα Β ή τα Τ λεμφοκύτταρα.
 - **Μυελώματα:** πρόκειται για καρκίνους οι οποίοι προέρχονται από πλασματοκύτταρα.
 - **Νευροεκτοδερμικοί όγκοι:** πρόκειται για όγκους που προέρχονται από κύτταρα του νευρικού συστήματος (αστροκύτωμα, γλοιοβλάστωμα κλπ) και αποτελούν περίπου το 1,3% των περιστατικών καρκίνου (Rober A. Weinberg, Biology of Cancer).

1.4 Ορόσημα του καρκίνου

Κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης των όγκων τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία δικαιολογούν και την τεράστια πολυπλοκότητα αυτής της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων φέρουν έξι βασικές αλλαγές στη φυσιολογία τους οι οποίες περιγράφηκαν από τους Hanahan D και Weinberg RA το 2000 και είναι οι εξής (Εικόνα 2):

➤ **Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα:** Θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται αέναα. Τα φυσιολογικά κύτταρα αντιθέτως, υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο της έκφρασής τους ελέγχοντας την παραγωγή και απελευθέρωση αυξητικών σημάτων που καθοδηγούν την είσοδό τους στον κυτταρικό κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η ομοιόσταση του αριθμού των κυττάρων και έτσι η διατήρηση της αρχιτεκτονικής και της λειτουργίας των διάφορων ιστών. Τα καρκινικά κύτταρα ωστόσο, μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα να διατηρούν την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση με διάφορους εναλλακτικούς τρόπους όπως:

- Αυξητικοί παράγοντες στους οποίους ανταποκρίνονται μέσω συγγενών υποδοχέων με αποτέλεσμα την αυτοκρινή πολλαπλασιαστική διέγερση
- Μεταλλάσσοντας τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων που οδηγεί σε αύξηση του αριθμού τους
- Μεταβάλλοντας τη δομή των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων
- Μεταβάλλοντας τη σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας προς εκείνους τους τύπους που προωθούν τον πολλαπλασιασμό και αντιστέκονται στην απόπτωση ή το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (Lukashev and Werb 1998); (Giancotti and Ruoslahti 1999).

Ο πιο πολύπλοκος μηχανισμός μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αυτάρκεια στα αυξητικά σήματα αφορά αλλαγές σε μόρια που βρίσκονται καθοδικά των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και μεταβιβάζουν το σήμα ενδοκυττάρια. Τα αυξητικά σήματα διαβιβάζονται κατά κύριο λόγο μέσω της RAS πρωτεΐνης και συγκεκριμένα μέσω του μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK. Περίπου στο 25% των ανθρώπινων καρκίνων οι RAS πρωτεΐνες είναι δομικά αλλαγμένες με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταγωγή σήματος στον πυρήνα (Medema and Bos 1993).

- **Αντοχή ενάντια στα αντιαυξητικά σήματα:** Οι αντιαυξητικοί παράγοντες μπορεί να είναι είτε διαλυτοί αντι-αυξητικοί παράγοντες είτε μόρια της εξωκυττάριας ουσίας ή της επιφάνειας των γειτονικών κυττάρων τα οποία δρουν ανασταλτικά. Η προσδεσή τους οδηγεί στην ενεργοποίηση μονοπατιών που καταλήγουν στην έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία εμποδίζουν την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο. Σχεδόν όλα τα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα διαβιβάζονται κυρίως από την πρωτεΐνη RB. Η πρωτεΐνη αυτή όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένη βρίσκεται σε σύμπλοκο με το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Όταν όμως η RB φωσφορυλιώνεται παύει η ανασταλτική της δράση και έτσι ο E2F είναι πλέον ενεργός ώστε να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που ενέχονται στη σύνθεση DNA. Σε ένα κύτταρο, λοιπόν με δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα η RB δεν μπορεί να προσδεθεί στον E2F ο οποίος είναι συνεχώς ενεργός με αποτέλεσμα τη μη προγραμματισμένη κυτταρική διαίρεση. Συνεπώς μεταλλάξεις είτε στα ογκοκατασταλτικά γονίδια είτε στους υποδοχείς των αντι-αυξητικών σημάτων οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου.
- **Αποφυγή απόπτωσης:** Η ικανότητα ενός πληθυσμού καρκινικών κυττάρων να επιβιώνουν δεν εξαρτάται μόνο από το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, αλλά και από το βαθμό της κυτταρικής φθοράς που υφίστανται. Κύτταρα με πολλές φθορές, όπως για παράδειγμα, συσσωρευμένες βλάβες στο γενετικό υλικό υπόκεινται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που ονομάζεται απόπτωση. Ο μηχανισμός της απόπτωσης αφορά σχεδόν όλα τα κύτταρα και περιλαμβάνει μια σειρά διαδικασιών. Τα καρκινικά κύτταρα επομένως, πρέπει να ξεπεράσουν το στάδιο αυτό. Η αποφυγή της απόπτωσης μπορεί να προκύψει με διάφορους τρόπους από τους οποίους ο πιο συχνός είναι μέσω μεταλλάξεων στο γονίδιο p53. Στα καρκινικά κύτταρα το μεταλλαγμένο P53 δεν μπορεί να οδηγήσει κύτταρα με βλάβες σε απόπτωση με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να διαιρούνται και να συσσωρεύονται όλο και περισσότερες βλάβες. Το P53 είναι το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο στους καρκίνους.
- **Απεριόριστος πολλαπλασιασμός:** Ένα ακόμη εμπόδιο το οποίο πρέπει να υπερβούν τα καρκινικά κύτταρα είναι ο εσωτερικός μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Κάθε κύτταρο έχει συγκεκριμένο δυναμικό αντιγραφής το οποίο σημαίνει ότι μετά από κάποιο συγκεκριμένο αριθμό αντιγραφών σταματά να διαιρείται και μπαίνει στη φάση της κυτταρικής γήρανσης. Το κρίσιμο αυτό σημείο σε κάθε κύτταρο

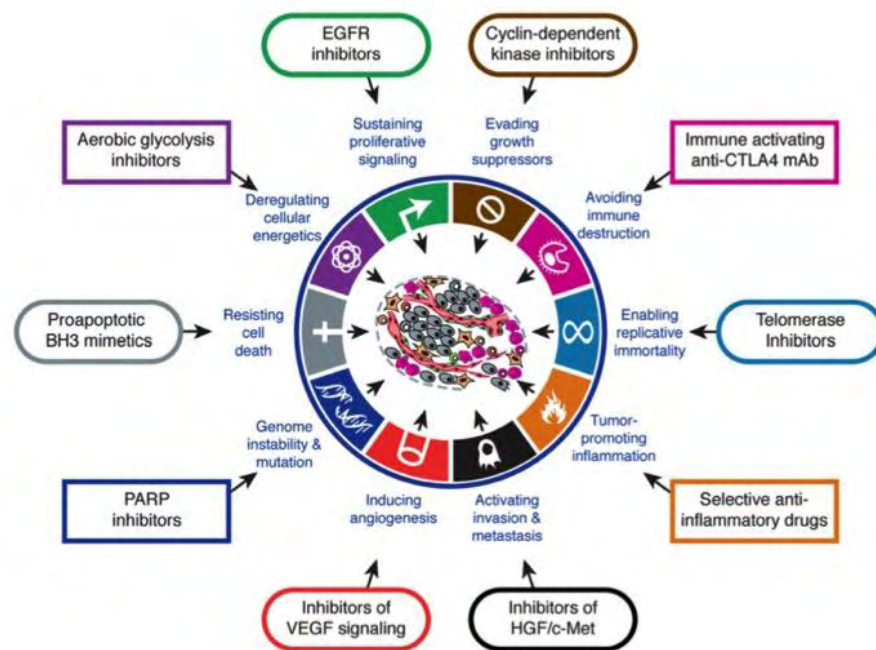
καθορίζεται από το μήκος των τελομερών. Τα τελομερή είναι αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στα άκρα κάθε χρωμοσώματος. Το μήκος των αλληλουχιών αυτών μειώνεται μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA, διότι στα ακραία αυτά τμήματα δεν υπάρχει χώρος για το σχηματισμό RNA εκκινητή κατά την αντιγραφή. Μετά από ένα συγκεκριμένο αριθμό κύκλων αντιγραφής τα τελομερή φτάνουν σε ένα ελάχιστο μήκος και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σταματά, επέρχεται δηλαδή αναδιπλασιαστική γήρανση. Τα καρκινικά κύτταρα όμως καθίστανται αθάνατα λόγω της ενεργοποίησης του ενζύμου τελομεράση η οποία προσθέτει τα τελομερή στο άκρο του μορίου DNA. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης από τα καρκινικά κύτταρα δεν αποτελεί πρωταρχικό συμβάν σε έναν καρκίνο, αλλά δευτερογενές συμβάν το οποίο σχετίζεται με την ικανότητα επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων.

- **Αγγειογένεση:** Απαραίτητα για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων είναι η συνεχής παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών από το αγγειακό σύστημα. Η μέγιστη απόσταση η οποία μπορεί να απέχει ένα καρκινικό κύτταρο από ένα αιμοφόρο αγγείο προκειμένου να αιματώνεται ικανοποιητικά είναι 100μm. Οι αυξημένες όμως ενεργειακές απαιτήσεις των καρκινικών κυττάρων οδηγούν σε αγγειογένεση κοντά στην περιοχή του όγκου. Αυτό προϋποθέτει την ενεργοποίηση προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως οι VEGF, FGF1 και FGF2 οι οποίοι σηματοδοτούν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αύξηση των αγγείων.
- **Διήθηση όγκου και μετάσταση:** Η διαδικασία κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα από μια πρωτογενή εστία εισβάλλουν και μεταναστεύουν σε άλλα σημεία του σώματος ονομάζεται μετάσταση. Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να αποκτήσουν ικανότητα διήθησης και μετάστασης υφίστανται ορισμένες αλλαγές που αφορούν είτε μόρια υπεύθυνα για τις διακυτταρικές συνδέσεις και τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας είτε αλλαγές στις εξωκυτταρικές πρωτεάσες. Όσον αφορά τα μόρια των διακυτταρικών συνδέσεων στον καρκίνο παρατηρείται απώλεια της λειτουργικότητας της E-καντερίνης με αποτέλεσμα να χάνεται η σύνδεση και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, η λειτουργία των πρωτεασών διαταράσσεται με αποτέλεσμα να αποδομείται η εξωκυττάρια ουσία και να διευκολύνεται η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων σε άλλους ιστούς.

Σύμφωνα με νέο άρθρο το οποίο δημοσίευσαν οι Douglas Hanahan και Robert A. Weinberg το 2011, απαραίτητα για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι τέσσερα χαρακτηριστικά τα οποία περιγράφονται παρακάτω (Hanahan and Weinberg 2011):

- **Μεταλλάξεις και γενετική αστάθεια:** Κάθε φυσιολογικό κύτταρο πριν ξεκινήσει τη μίτωση εξασφαλίζει τη γενετική σταθερότητά του με μια σειρά σημείων ελέγχου στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Σε περίπτωση που εντοπιστούν βλάβες στο γενετικό υλικό ενεργοποιούνται οι κατάλληλοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης. Μεταλλάξεις στα επιδιορθωτικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα τη μη επιδιόρθωση των λαθών και τη συσσώρευση μεταλλάξεων με αποτέλεσμα να προκύψει το καρκινικό κύτταρο.
- **Φλεγμονή:** Αρκετοί όγκοι παρουσιάζουν μεγάλη διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτές οι ανοσολογικές αποκρίσεις αντανακλούν την προσπάθεια του ανοσοποιητικού συστήματος να εξαλείψει τον όγκο. Τα φλεγμονώδη αυτά κύτταρα του όγκου όμως, προωθούν την ογκογένεση αλλά και τη μετάσταση ρυθμίζοντας το μικροπεριβάλλον του όγκου.
- **Μεταβολές στο μεταβολισμό:** Ο Warburg πρώτος παρατήρησε ένα πρωτοφανές χαρακτηριστικό του ενεργειακού μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στα καρκινικά κύτταρα γίνεται μετάπτωση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση ή την αερόβια αναπνοή σε μορφές παραγωγής ενέργειας εκτός των μιτοχονδρίων, σε αναερόβιες διαδικασίες στο κυτταρόπλασμα. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg και προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα τα εξής πλεονεκτήματα:
 - Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: αυξημένη αερόβια γλυκόλυση οδηγεί σε αυξημένη βιοσύνθεση και συνεπώς παραγωγή δομικών λίθων (αμινοξέα, νουκλεοτίδια κλπ) κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για τη δημιουργία νέων κυττάρων.
 - Αποφυγή απόπτωσης: Τα καρκινικά κύτταρα μέσω της οδού της γλυκόλυσης οδηγούνται στην αδρανοποίηση των μιτοχονδρίων και συνεπώς στην αποφυγή της απόπτωσης.
 - Επιβίωση κάτω από συνθήκες υποξίας: Η αναερόβια παραγωγή ενέργειας αποτελεί και ένα μηχανισμό προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης.

- Αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (pH) : Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος από τη γλυκόλυση οδηγεί σε μείωση του pH των καρκινικών κυττάρων κάτι το οποίο έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί τη μετακίνηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Pavlova and Thompson 2016).
- **Αποφυγή ανοσοκαταστροφής:** Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν εναντίον των καρκινικών κυττάρων με σκοπό την καταστροφή τους κάτι το οποίο χαρακτηρίζεται ως ανοσοεπιτήρηση. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς μέσα από τους οποίους διαφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα και έτσι επιβιώνουν.



Εικόνα 2. Τα ορόσημα του καρκίνου.

<https://idmprogram.com/emerging-hallmarks-of-cancer-cancer-13/>

1.5 *Μοριακά γεγονότα που συμβάλλουν στην καρκινογένεση*

Ο καρκίνος αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση γενετικής ασθένειας η οποία δεν μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα μιας μόνο γενετικής δυσλειτουργίας. Αντιθέτως, είναι το αποτέλεσμα αρκετών μεταλλάξεων που απορυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο/πολλαπλασιασμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της καρκινογένεσης αποτελείται από πολλαπλά στάδια που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Weinberg 1983). Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν διαδοχικά και προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα.

- **Ογκογονίδια:** Τα προϊόντα των ογκογονιδίων είναι κυρίως ενεργοποιητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αναστολείς της απόπτωσης. Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, που μπορεί να προκληθούν από μεταλλαξιογόνους παράγοντες, μπορούν να μετατρέψουν τα πρωτο-ογκογονίδια σε ογκογονίδια τα οποία υπερλειτουργούν και οδηγούν το κύτταρο σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (McManus Valmer et al 2000). Οι μεταλλάξεις των πρωτο-ογκογονιδίων είναι συνήθως επικρατές σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Σημειακές μεταλλάξεις, επαύξηση γονιδίων ή ακόμη και αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων αποτελούν τις κυριότερες γενετικές αλλαγές που μπορούν να μετατρέψουν ένα πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο.

Οι κυριότερες κατηγορίες των πρωτο-ογκογονιδίων ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους στα διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος είναι οι εξής:

- Αυξητικοί παράγοντες
 - Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων
 - Σηματοδοτικά μόρια
 - Μεταγραφικοί παράγοντες
 - Παράγοντες αναδιάταξης της χρωματίνης
 - Ρυθμιστές της απόπτωσης
-
- **Ογκοκατασταλτικά γονίδια:** Πρόκειται για γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση με τρόπο αντίθετο από εκείνο των πρωτο-ογκογονιδίων. Τα προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και

διαμεσολαβητές της απόπτωσης. Οποιαδήποτε αναστολή της δράσης τους αφαιρεί από το κύτταρο τη δυνατότητα ελέγχου του πολλαπλασιασμού και οδηγεί σε καρκινογένεση. Οι μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι κυρίως υπολειπόμενες. Κληρονομήσιμη μετάλλαξη σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο προδιαθέτει ένα άτομο για την ανάπτυξη καρκίνου, καθώς χρειάζεται μόνο μία επιπλέον μετάλλαξη για να χαθεί πλήρως η λειτουργικότητα του γονιδίου (κληρονομικοί καρκίνοι). Το ένα αλληλόμορφο ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου χάνεται μέσω του φαινομένου της απώλειας της ετεροζυγωτίας. Η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να συμβεί μέσω σημειακών μεταλλάξεων, απαλοιφών χρωμοσωμικών περιοχών ή επιγενετικών αλλαγών του υποκινητή τους.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια περιλαμβάνουν γονίδια ελέγχου των βλαβών του DNA, γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, γονίδια καταστολής του κυτταρικού κύκλου καθώς και γονίδια επαγωγής της απόπτωσης. Τα δύο καλύτερα χαρακτηρισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι αυτά που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RB και P53 (Park and Vogelstein 2003). Η πρωτεΐνη RB αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1, G1/S ή S. Υπερφωσφορλίωση της RB την καθιστούν ανενεργή με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδεθεί και να απενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα E2F ο οποίος είναι ελεύθερος να επάγει την έκφραση γονιδίων-στόχων απαραίτητων για τη μετάβαση στη φάση S.

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53 είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο της ακεραιότητας του DNA και πολλές φορές αποκαλείται ως «ο φύλακας του ανθρώπινου γονιδιώματος» (Priestman 2008). Έτσι λοιπόν σε περίπτωση βλάβης του DNA προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου αυτού λόγω μεταλλάξεων αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των περισσότερων τύπων καρκίνου (Petitjean et al. 2007) (Cooper 2000).

1.6 Μετάσταση –Στάδια

Το βασικό χαρακτηριστικό που διακρίνει τους κακοήθεις όγκους είναι η ικανότητά τους να εξαπλώνονται είτε σε γειτονικούς ιστούς (διήθηση) είτε σε απομακρυσμένους ιστούς μέσω του λεμφικού ή του κυκλοφορικού συστήματος όπου σχηματίζουν νέα αποικία (μετάσταση). (Talmadge and Fidler 2010). Η μετάσταση ενός όγκου αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία και είναι υπεύθυνη για πάνω από το 90% των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο (Sethi and Kang 2011).

Η διαδικασία της μετάστασης αποτελείται από διαφορετικά στάδια τα οποία περιγράφονται παρακάτω (Poste and Fidler 1980) (Εικόνα 3):

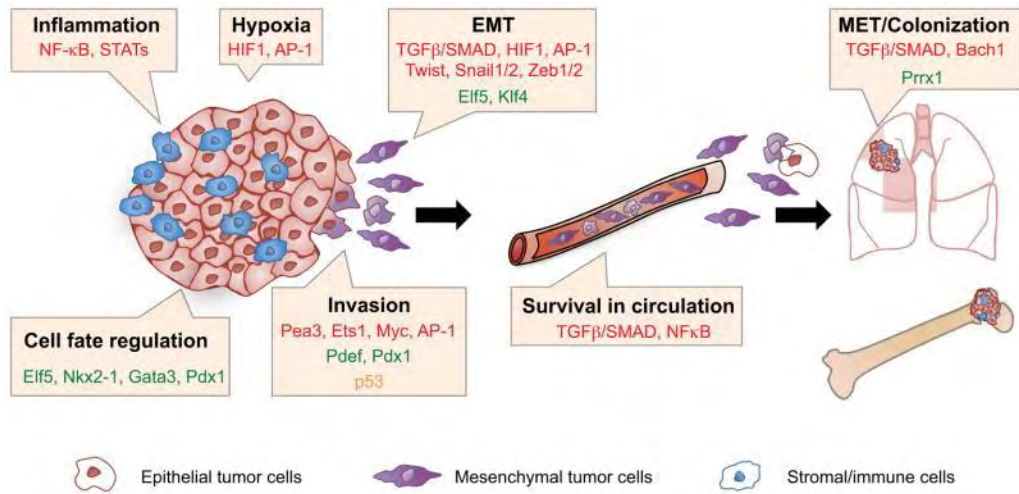
- **Εισβολή και διήθηση:** κατά το στάδιο αυτό ορισμένα κακοήθη καρκινικά κύτταρα διαπερνούν τη βασική μεμβράνη από τον πρωτοπαθή όγκο και μετακινούνται προς τα αιμοφόρα αγγεία ή τα λεμφαγγεία. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει αλλαγές στο φαινότυπο αυτών των κυττάρων καθώς και αλλαγές στην κινητικότητά τους. Πιο συγκεκριμένα τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να διεισδύουν σε άλλους ιστούς μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάπτωση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται φυσιολογικά κατά την εμβρυογένεση στο σχηματισμό των τριών βλαστικών στοιβάδων καθώς και κατά τη διαδικασία επούλωσης πληγών.

Στο πλαίσιο της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετάπτωσης οι μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές που υφίστανται τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα είναι οι εξής: η απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων, η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, η απόκτηση ατρακτοειδούς μορφολογίας, ο σχηματισμός ψευδοποδίων, η απώλεια πολικότητας, η απώλεια έκφρασης της E-cadherin, η νεοαγγειογένεση κλπ. (Gurzu et al. 2016). Επιπλέον, εξωκυττάρια σήματα όπως η πρόσδεση του παράγοντα TGF- β και η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt χρειάζονται για να προχωρήσει η επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάπτωση.

- **Ενδοαγγείωση:** πρόκειται για την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στο εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων ή των λεμφαγγείων. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την προσκόλληση του καρκινικού κυττάρου στην επιφάνεια του στρώματος του αγγείου, την

αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης με τη βοήθεια μεταλλοπρωτεασών και πρωτεασών σερίνης και τη διέλευσή τους μέσα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων μέσα στην αιματική ή λεμφική κυκλοφορία (Lauren Pecorino, Molecular Biology of Cancer).

- **Απελευθέρωση στην κυκλοφορία:** τα καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται μέσω της λεμφικής ή αιματικής κυκλοφορίας είτε μονήρη είτε σε συστάδες μαζί με αιμοπετάλια. Μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών των κυττάρων που εισέρχονται στην κυκλοφορία θα σχηματίσουν μια επιτυχημένη μεταστατική αποικία (Lauren Pecorino, Molecular Biology of Cancer).
- **Εξαγγείωση:** μέσα σε μερικές μέρες τα καρκινικά κύτταρα διασπών τη βασική μεμβράνη του τοιχώματος των αγγείων και εξαπλώνονται στο γειτονικό παρεγχυματικό ιστό. Σημαντικό ρόλο στην εξαγγείωση παίζει και το μικροπεριβάλλον του όγκου το οποίο αποτελείται από κύτταρα του στρώματος και από λευκά αιμοσφαίρια. Φλεγμονώδεις χημειοκίνες, όπως η CCL2 και CCL5 θεωρούνται υπεύθυνες για την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων σε άλλα όργανα και για την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό τους (Borsig et al. 2014).
- **Δημιουργία δευτεροπαθούς όγκου:** μόλις τα καρκινικά κύτταρα εξαγγειωθούν στο όργανο-στόχο, εάν καταφέρουν να επιβιώσουν, είτε ζουν ως μονήρη κύτταρα είτε σχηματίζουν μικρές συστάδες κυττάρων που ονομάζονται μικρομεταστάσεις. Στο στάδιο αυτό η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στο νέο περιβάλλον δεν είναι εύκολη, διότι τα κύτταρα στερούνται τους δικούς τους αυξητικούς παράγοντες καθώς και τους παράγοντες για την επιβίωσή τους. Ένα μικρό ποσοστό αυτών των μικρομεταστάσεων θα δώσουν γένεση σε μακρομεταστάσεις, δηλαδή σε δυνητικά εξελισσόμενους όγκους οι οποίοι επάγουν τη δημιουργία νέων αγγείων (νεοαγγειογένεση) για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών (Allan Weinberg, Biology of Cancer) (Lauren Pecorino, Molecular Biology of Cancer).



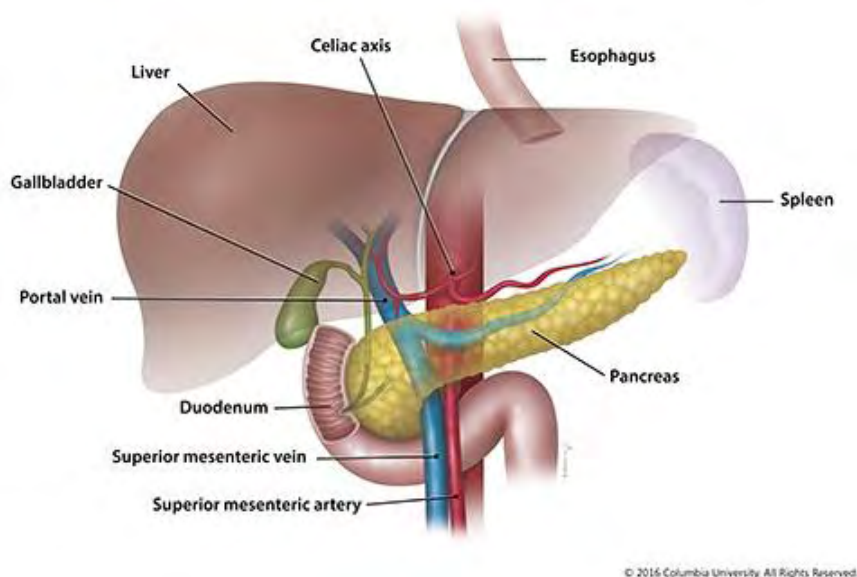
Εικόνα 3. Μεταγραφική ρύθμιση της μετάστασης.

(Ell and Kang 2013)

2. ΠΑΓΚΡΕΑΣ

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το πάγκρεας αποτελεί μετά το ήπαρ, το μεγαλύτερο αδένιο του πεπτικού συστήματος. Βρίσκεται πίσω από το στομάχι, στον ενδοπεριτοναϊκό χώρο της άνω κοιλίας. Εμφανίζει σχήμα κωνικό και εκτείνεται από την αγκύλη του δωδεκαδάχτυλου μέχρι το σπλήνα. Διακρίνεται σε τρία κύρια μέρη, την κεφαλή, τον αυχένα ή σώμα και την ουρά. Το τμήμα του παγκρέατος μπροστά από την άνω μεσεντέρια φλέβα ορίζεται ως αυχένος του αδένιο. Η κεφαλή του αδένιο βρίσκεται στα δεξιά του αυχένιο, μέσα στα όρια της αγκύλης του δωδεκαδακτύλου και περιλαμβάνει την προέκταση που προέρχεται από το κοιλιακό πάγκρεας που λέγεται αγκιστροειδής απόφυση. Η αγκιστροειδής απόφυση εκτείνεται πίσω από τη μεσεντέρια φλέβα, καταλήγοντας στο δεξί όριο της άνω μεσεντέριας αρτηρίας. Το σώμα του παγκρέατος βρίσκεται αριστερά του αυχένιο, ενώ η ουρά του παγκρέατος εκτείνεται στα αριστερά του σώματος μέσα στο σπλήνα (Skandalakis et al. 1993) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Θέση του παγκρέατος σε σχέση με τα άλλα όργανα.

(<http://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions>)

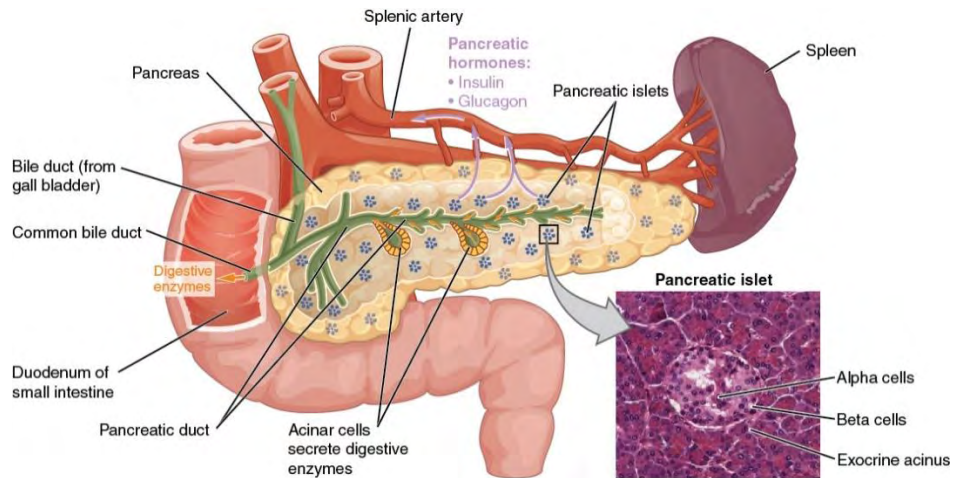
2.2 *Ιστολογία*

Το πάγκρεας περιβάλλεται από μια κάψα συνδετικού ιστού και αποτελείται από την ενδοκρινή και την εξωκρινή μοίρα. Όσον αφορά την εξωκρινή μοίρα, αυτή αποτελείται από τα παγκρεατικά λοβία και τους παγκρεατικούς πόρους. Κάθε λόβιο αποτελείται από σφαιρικές αθροίσεις εκκριτικών εξωκρινών κυττάρων, τις αδenoκυψέλες. Κάθε αδenoκυψέλη έχει έναν ενδοκυψελιδικό χώρο στον οποίο συγκεντρώνεται το περιεχόμενο των εκκριτικών κοκκίων. Τα παγκρεατικά λοβία αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των κυττάρων του παγκρέατος. Τα κύτταρα των παγκρεατικών λοβίων συνθέτουν την πλειονότητα των πεπτικών ενζύμων με τη μορφή προ-ενζύμων, που ονομάζονται ζυμογόνα. Τα κύτταρα των παγκρεατικών λοβίων παράγουν επίσης πρωτεΐνες που δεν προορίζονται για έκκριση, αλλά για ενδοκυττάρια χρήση, όπως για παράδειγμα οι δομικές κυτταρικές πρωτεΐνες και οι υδρολάσες των λυσοσωμάτων. Η πρωτεϊνική έκκριση των παγκρεατικών λοβίων αποτελεί μια διαδικασία που υφίστανται τόσο ορμονική όσο και νευρική ρύθμιση (Yamada et al. 2003)(Pansky 2018).

Όσον αφορά τα κύτταρα των παγκρεατικών πόρων αυτά αποτελούν μόλις το 5% της παγκρεατικής μάζας. Τα κύτταρα αυτά είναι κυλινδρικά και περιέχουν κοκκία βλέννης. Με βάση το μέγεθος των παγκρετικών πόρων από τους μεγάλους προς τους μικρότερους πόρους των λοβίων, το επιθήλιο μετατρέπεται από κυλινδρικό σε κυβικό χωρίς κοκκία βλέννης. Ο μεγαλύτερος παγκρεατικός πόρος (πόρος του Wirsung) ξεκινά από την ουρά του παγκρέατος και καταλήγει στο φύμα του Vater και το δωδεκαδάκτυλο, ενώ ο επικουρικός πόρος του Santorini είναι μικρότερος και ξεκινά από τον μείζονα παγκρεατικό πόρο στο ύψος του αυχένα του παγκρέατος και καταλήγει στο έλασσον φύμα, σε απόσταση 2 εκατοστών του μείζονος φύματος του Vater. Τα κύτταρα των παγκρεατικών πόρων εκκρίνουν τη μεγαλύτερη ποσότητα παγκρεατικού χυμού και ηλεκτρολυτών.

Το ενδοκρινικό τμήμα του παγκρέατος αποτελείται από δομές που ονομάζονται νησίδια του Langerhans, και βρίσκονται διάσπαρτα στη μάζα του παγκρέατος και κυρίως στην ουρά. Αποτελούνται από σφαιρικά ενδοκρινικά κύτταρα τα οποία διακρίνονται σε α και β-κύτταρα. Τα α-κύτταρα βρίσκονται στην περιφέρεια των νησίδων, εκκρίνουν γλυκαγόνη και αποτελούν περίπου το 20-25% του συνολικού αριθμού των κυττάρων.. Τα β-κύτταρα βρίσκονται στο κέντρο των νησιδίων, παράγουν ινσουλίνη και αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων. Εκτός από τα α-κύτταρα, διασκορπισμένα στην περιφέρεια των νησίδων βρίσκονται τα δ-κύτταρα τα οποία

παράγουν σωματοστατίνη και αποτελούν περίπου το 5% των κυττάρων (Papachristou and Whitcomb 2004) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ιστολογική απεικόνιση του ενδοκρινικού τμήματος του παγκρέατος. Διακρίνεται επίσης, το εξωκρινές τμήμα (παγκρεατικά λοβία και παγκρεατικοί πόροι) και μέρος της αιμάτωσής του.

(<http://teachmephysiology.com/gastrointestinal-system/pancreas/exocrine-pancreas/>)

3. ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά – Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του παγκρέατος αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου στο σύνολο των θανάτων από καρκίνο και αναμένεται μέχρι το 2030 να ανέλθει σε δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισής του κατατάσσεται έβδομος, αλλά τα τελευταία 60 έτη παρουσιάζει σταθερή αύξηση. Στο σύνολο όλων των καρκίνων αποτελεί το 2% όλων των περιπτώσεων καρκίνου και οφείλεται για το 5% των θανάτων από καρκίνο. Εμφανίζεται κυρίως σε άνδρες ηλικίας 40-85 ετών με μέση ηλικία διάγνωσης τα 71 έτη και κατέχει την πρώτη θέση στην κατηγορία των ασυμπτωματικών καρκίνων.

Ένας από τους λόγους για τους οποίους ο παγκρεατικός καρκίνος έχει τόσο κακή πρόγνωση είναι η έλλειψη ειδικών συμπτωμάτων με αποτέλεσμα να γίνεται διάγνωση σε αρκετά προχωρημένο στάδιο. Άλλοι παράγοντες υπεύθυνοι για την κακή πρόγνωσή του αποτελούν η έλλειψη εξειδικευμένων καρκινικών βιοδεικτών, καθώς και γενικά κάποιου αιματολογικού ελέγχου ή άλλων ειδικών ελέγχων, καθώς και η ικανότητά του να σχηματίζει μεταστατικές εστίες πολύ γρήγορα λόγω της αυξημένης περινευρικής και αγγειακής ανάπτυξης που εμφανίζει. Πρόκειται για έναν καρκίνο με αυξημένη ανθεκτικότητα στις θεραπείες είτε χημειοθεραπείες είτε ραδιοθεραπείες είτε μοριακές στοχεύουσες θεραπείες λόγω γενετικών αλλά και επιγενετικών αλλαγών. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες καθιστούν τον παγκρεατικό καρκίνο έναν από τους πιο επιθετικούς καρκίνους με σημαντική θνησιμότητα με αποτέλεσμα το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών να είναι κάτω από 7% με εξαίρεση τους ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση όπου το ποσοστό κυμαίνεται στο 15-25% (Kleeff et al. 2016) (Goral 2015) (Oberstein and Olive 2013). Τέλος, παρά τη μείωση που έχει σημειωθεί στα ποσοστά θανάτου από καρκίνο τις τελευταίες δεκαετίες, τα ποσοστά θανάτου από τον παγκρεατικό καρκίνο παρουσιάζουν αύξηση (Roberts and Porter 1989).

3.2 Παράγοντες κινδύνου

Πέρα από το φύλο και την ηλικία, που έχουν προαναφερθεί, μερικοί ακόμη παράγοντες κινδύνου είναι: το κάπνισμα, το οικογενειακό ιστορικό χρόνιων παγκρεατίτιδων, η ηλικία, ο διαβήτης, η παχυσαρκία, η αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών, η χαμηλή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών καθώς και δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε κόκκινο κρέας. Η κατανάλωση καφέ δεν έχει ακόμη συσχετιστεί σαν παράγοντας κινδύνου για τη νόσο. Επιπλέον, θετικά έχει συσχετιστεί η αυξημένη, και όχι η μέτρια, κατανάλωση αλκοόλ. Πιθανότατα η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με χρόνια παγκρεατίτιδα η οποία με τη σειρά της αυξάνει τον κίνδυνο παγκρεατικού καρκίνου έως και δέκα φορές. Ο διαβήτης αποτελεί τόσο παράγοντα κινδύνου για τη νόσο διπλασιάζοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης την νόσου όσο και συνέπεια της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση διαβήτη μπορεί να αποτελέσει το πρώτο σύμπτωμα για τη διάγνωση του καρκίνου σε ηλικιωμένους ασθενείς. Τέλος, γαστροεντερικές μικρο-επεμβάσεις ή γαστρεκτομή, ίσως έχει κάποια επίδραση στην εμφάνιση της νόσου, αλλά στο πλαίσιο του γενικού πληθυσμού η επίδραση αυτή είναι περιορισμένη.

Επίσης, η εμφάνιση της νόσου εμφανίζει και διαφοροποίηση ανάλογα με τη φυλή, με την αμερικάνικη φυλή να παρουσιάζει ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο, ενώ αντίστοιχη διαφοροποίηση έχει παρατηρηθεί στη μαύρη φυλή οι οποία εμφανίζει έως και 30-70% μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου (Scarton et al. 2018).

Παρά την πολυπλοκότητα όμως της νόσου το κάπνισμα έχει αξιολογηθεί ως ο πιο σημαντικός παράγοντας πρόκλησης καρκίνου του παγκρέατος σε ποσοστό που αγγίζει το 20%. Επιπλέον, το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών-καπνιστών εμφανίζει περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις σε σχέση με εκείνο των μη καπνιστών (Vincent et al. 2011). Οι καπνιστές βρέθηκε να έχουν έως και δύο με τρεις φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου σε σχέση με τους μη καπνιστές (Kleeff et al. 2016).

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου κατέχει και το οικογενειακό ιστορικό, καθώς αφορά περίπου το 10% των ασθενών (Kleeff et al. 2016). Συγκεκριμένα, πρώτου βαθμού συγγενείς ατόμων με παγκρεατικό καρκίνο έχουν εννιαπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Vincent et al. 2011).

Πράγματι, ο παγκρεατικός καρκίνος έχει ισχυρή γενετική βάση και οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις είτε κληρονομήσιμες είτε *de novo*. Στις περιπτώσεις αυτές, συνήθως κληρονομείται

ένα παθολογικό γονίδιο και ένα φυσιολογικό το οποίο εάν υποστεί κάποια βλάβη μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε καρκινογένεση αφού θα χαθεί πλήρως η λειτουργικότητα του συγκεκριμένου γονιδίου. Τα γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο είναι κυρίως ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια που αποτελούν μέρος των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA. Όσον αφορά την κληρονομική βάση του παγκρεατικού καρκίνου πολλά γενετικά σύνδρομα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης παγκρεατικού καρκίνου, όπως το σύνδρομο Peutz-Jeghers. Μεταλλάξεις σε γονίδια όπως *BRCA2*, *BRCA1*, *CDKN2A*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1*, *MLH1* and *PALB2* έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη παγκρεατικού καρκίνου με διαφορετική διεισδυτικότητα το καθένα από αυτά (Kleeff et al. 2016) (Winter, Maitra, and Yeo 2006).

3.3 Παθοφυσιολογία

Το 60% των καρκίνων του παγκρέατος εντοπίζεται στην κεφαλή, το 15% στο σώμα και το 5% στην ουρά. Το μεγαλύτερο ποσοστό των καρκίνων του παγκρέατος αφορούν την εξωκρινή μοίρα και συγκεκριμένα το αδενικό επιθήλιο και χαρακτηρίζονται ως αδenoκαρκινώματα. Ένα μόνο μικρό ποσοστό, περίπου 5%, αφορά όγκους στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Οι όγκοι αυτοί διακρίνονται σε περαιτέρω κατηγορίες ανάλογα με το είδος των κυττάρων που μεταλλάσσονται και των ορμονών που εκκρίνουν. Έτσι, η διάγνωση των όγκων αυτών γίνεται από την εκτεταμένη ορμονική έκκριση που οδηγεί σε συμπτώματα, όπως για παράδειγμα υπογλυκαιμία λόγω υπερβολικής παραγωγής ινσουλίνης.

Όσον αφορά τους όγκους που προέρχονται από την εξωκρινή μοίρα αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο ιστολογικούς υπότυπους. Το καρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου αποτελεί το συνηθέστερο καρκίνωμα του παγκρέατος σε ποσοστό περίπου 90% και προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του πόρου. Υπερπλαστικές αλλοιώσεις γνωστές σαν παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (PanIN) προηγούνται της ανάπτυξης του καρκίνου. Οι νεοπλασίες αυτές προέρχονται από διάφορα προγονικά βλαστοκύτταρα δημιουργώντας κλωνική ετερογένεια δικαιολογώντας έτσι τη γενετική εξέλιξη και ετερογένεια του παγκρεατικού καρκίνου (Deeb, Haque, and Olowokure 2015). Ο δεύτερος πιο συχνός υπότυπος παγκρεατικού καρκίνου είναι οι όγκοι του βλεννώδους επιθηλίου που αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων. Πρόκειται για λιγότερο επιθετικούς και με χαμηλότερη θνησιμότητα όγκους σε σχέση με τα

αδενοκαρκινώματα.. Οι όγκοι αυτοί μπορεί επίσης να προέρχονται από παγκρεατικό αδενικό επιθήλιο το οποίο όμως εκκρίνει βλέννα ορατή μέσα και γύρω από τα κύτταρα (Grant, Hua, and Singh 2016).

3.4 Διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου

Τα κυριότερα κλινικά ευρήματα των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο είναι ίκτερος, λόγω συμπίεσης του χοληφόρου αγωγού στην κεφαλή του παγκρέατος, απώλεια βάρους και κοιλιακό άλγος ή πόνος στην πλάτη. Μπορεί να υπάρχουν επίσης ανορεξία, αδυναμία, κνησμός και διαταραχή των κενώσεων.

Η αξονική τομογραφία αποτελεί το πιο χρήσιμο εργαλείο διάγνωσης και σταδιοποίησης της νόσου. Η υπερηχογραφία, η μαγνητική τομογραφία και η ενδοσκοπική χολαγγειο-παγκρεατογραφία μπορούν να παρέχουν επιπρόσθετες πληροφορίες. Η πλειονότητα των όγκων δεν είναι χειρουργικά ανιχνεύσιμοι λόγω μεταστάσεων και εισβολής των κύριων αγγείων πίσω από το πάγκρεας. Οι ανιχνεύσιμοι όγκοι αντιμετωπίζονται χειρουργικά με τη διαδικασία Whipple ή αλλιώς παγκρεατο-δωδεκαδακτυλεκτομή.

Η κακή πρόγνωση του παγκρεατικού καρκίνου οφείλεται και στην έλλειψη εξειδικευμένων καρκινικών δεικτών. Πολλοί παγκρεατικοί όγκοι παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση του υδατανθρακικού αντιγόνου CA19-9 κάτι το οποίο έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας και στην απόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο διαγνωστικό δείκτη λόγω χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, καθώς μπορεί να αυξηθεί και σε πολλές περιπτώσεις καλοήθειας (Oberstein and Olive 2013) (Goral 2015) (Locker et al. 2006).

Η σταδιοποίηση ενός όγκου γίνεται σύμφωνα με το σύστημα TNM (Εικόνα 6). Το σύστημα αυτό είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα και εξετάζει τρεις μεταβλητές οι οποίες είναι (Brierley and National Cancer Institute of Canada Committee on Cancer Staging 2006):

T (Tumor): αναφέρεται στο μέγεθος του όγκου

N (Number of nodes): αναφέρεται στον αριθμό των λεμφαδένων που έχουν προσβληθεί

M (Metastasis): αναφέρεται στην παρουσία μετάστασης σε γειτονικούς ή απομακρυσμένους ιστούς

Stage	TNM	Description
0	Tis, N0, M0	Tis = Carcinoma in situ
IA	T1, N0, M0	T1 = Tumour limited to the pancreas, ≤2 cm in greatest dimension
IB	T2, N0, M0	T2 = Tumour limited to the pancreas, >2 cm in greatest dimension
IIA	T3, N0, M0	T3 = Tumour extends beyond the pancreas but without involvement of the coeliac axis or superior mesenteric artery
IIB	T1, N1, M0 T2, N1, M0 T3, N1, M0	N1 = Regional lymph node metastasis
III	T4, any N, M0	T4 = Tumour involves the coeliac axis or the superior mesenteric artery (unresectable primary tumour)
IV	any T, any N, M1	M1 = Distant metastasis

Εικόνα 6. Σταδιοποίηση του παγκρεατικού καρκίνου με το σύστημα ταξινόμησης TNM.

<https://www.slideshare.net/yezza-jiharish/determining-resectability-in-pancreatic-cancer>

3.5 Θεραπεία

Η μέχρι τώρα θεραπεία για τον παγκρεατικό καρκίνο στοχεύει κυρίως στην ίαση των συμπτωμάτων και όχι στην καταπολέμηση της νόσου. Στην κλασική χημειοθεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως η γεμισιταμίνη μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η ακτινοβολία σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία επιβραδύνει επίσης την πρόοδο σε προχωρημένους καρκίνους. Η χειρουργική θεραπεία συνήθως δεν είναι πολύ αποτελεσματική, γιατί έχουν ήδη δημιουργηθεί μεταστατικές εστίες όταν ο καρκίνος γίνει αντιληπτός. Δυστυχώς, μόνο το 15-20% των ασθενών που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση έχουν διαγνωστεί σε ιάσιμο στάδιο. Από αυτούς, ο μέσος όρος του χρόνου επιβίωσης μετά την επέμβαση είναι λιγότερο από 20 μήνες με εξαίρεση ένα ποσοστό 20% που φτάνει την 5ετή επιβίωση (Griffin, Poruk, and

Wolfgang 2015). Γενικότερα οι ασθενείς καθ' όλη τη διάρκεια της ασθένειας και κατά τη διάρκεια της θεραπείας χρειάζονται πλήρη έλεγχο των συμπτωμάτων (Freelove and Walling 2006).

3.6 Μοριακοί μηχανισμοί εμπλεκόμενοι στην καρκινογένεση του παγκρέατος

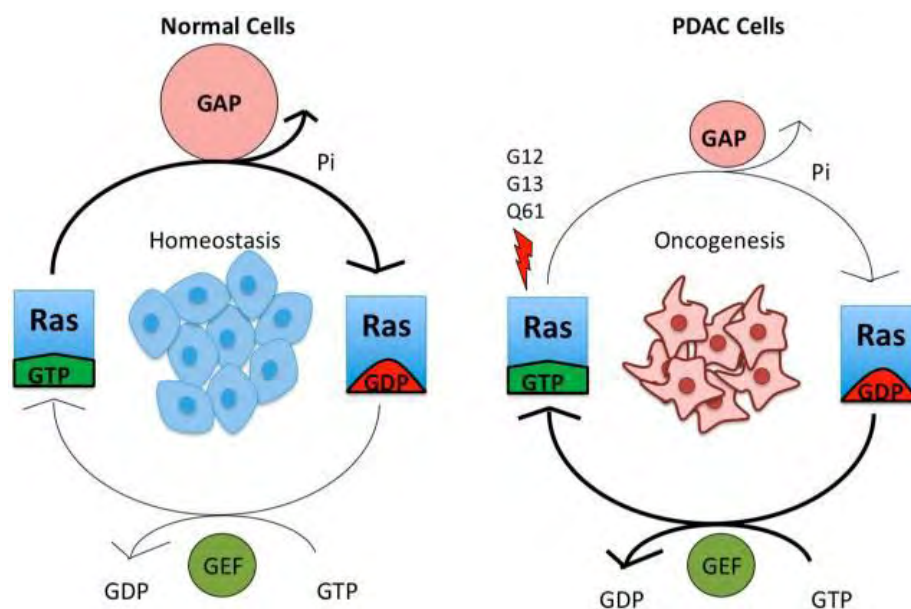
Τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στον παγκρεατικό καρκίνο είναι τα: *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* και *SMAD4*. Το *KRAS* αποτελεί ογκογονίδιο, είναι μεταλλαγμένο σε πάνω από το 90% των όγκων και συνήθως σχετίζεται με υψηλή θνησιμότητα. Τα υπόλοιπα τρία γονίδια ανήκουν στα ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία είναι μεταλλαγμένα στο 50-80% των παγκρεατικών καρκίνων. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν τόσο σημειακές μεταλλάξεις όσο και άλλες γενετικές αλλαγές που μπορούν να συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Για παράδειγμα, το γονίδιο *CDKN2A* καθίσταται ανενεργό μέσω μεθυλίωσης, ενώ το *SMAD4* απενεργοποιείται μέσω ομόζυγου ελλείματος (Grant et al. 2016).

Το *KRAS* αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο ογκογονίδιο στον παγκρεατικό καρκίνο. Μεταλλάξεις στο *KRAS* αποτελούν τις αρχικές γενετικές αλλαγές που υφίστανται τα κύτταρα, γι' αυτό και το 95% των PanINs φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό. Ωστόσο, η εξέλιξη του όγκου σε κακοήθεια προϋποθέτει τη συσσώρευση και άλλων γενετικών αλλαγών, όπως για παράδειγμα την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το *CDKN2A*. Η απώλεια λειτουργίας του μπορεί να οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις είτε σε υπερμεθυλίωση του εκκινητή και συναντάται σε ποσοστό 95%. Στα επόμενα στάδια της εξέλιξης του όγκου συμβαίνουν μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του *P53* σε ποσοστό 75%. Τέλος, μεταλλάξεις στη *SMAD4* η οποία βρίσκεται καθοδικά της σηματοδότησης του *TGF-β* σχετίζονται συνήθως με το μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο (Εικόνα 8).

Όπως προαναφέρθηκε πάνω από το 90% των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS*. Το *KRAS* μαζί με τα γονίδια *HRAS* και *NRAS* ανήκουν στην οικογένεια των RAS GTPασών. Και τα τρία γονίδια σχετίζονται με μεταλλάξεις διάφορων τύπων καρκίνου με το *KRAS* να σχετίζεται κυρίως με καρκίνο ουροδόχου κύστεως, ωοθηκών, πνεύμονα, θυρεοειδούς, παχέος εντέρου και παγκρέατος. Οι RAS πρωτεΐνες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο

στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την κυτταρική μετανάστευση και την απόπτωση καθιστώντας αυτές πολύ σημαντικές στην καρκινική κυτταρική σηματοδότηση. Φέρουν δύο επικράτειες, τη G η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση και υδρόλυση του GTP και την επικράτεια πρόσδεσης στην πλασματική μεμβράνη.

Οι μεταλλάξεις στο *KRAS* μπορεί να είναι είτε μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην έναρξη της νόσου είτε μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου. Μεταλλάξεις στη γλυκίνη 12 (G12D και G12V) αποτελούν τις πιο κοινές σημειακές μεταλλάξεις σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο και βρίσκονται στη G επικράτεια του *KRAS* επηρεάζοντας την ικανότητά του να υδρολύει το GTP σε GDP (Zeitouni et al. 2016) (εικόνα 7).



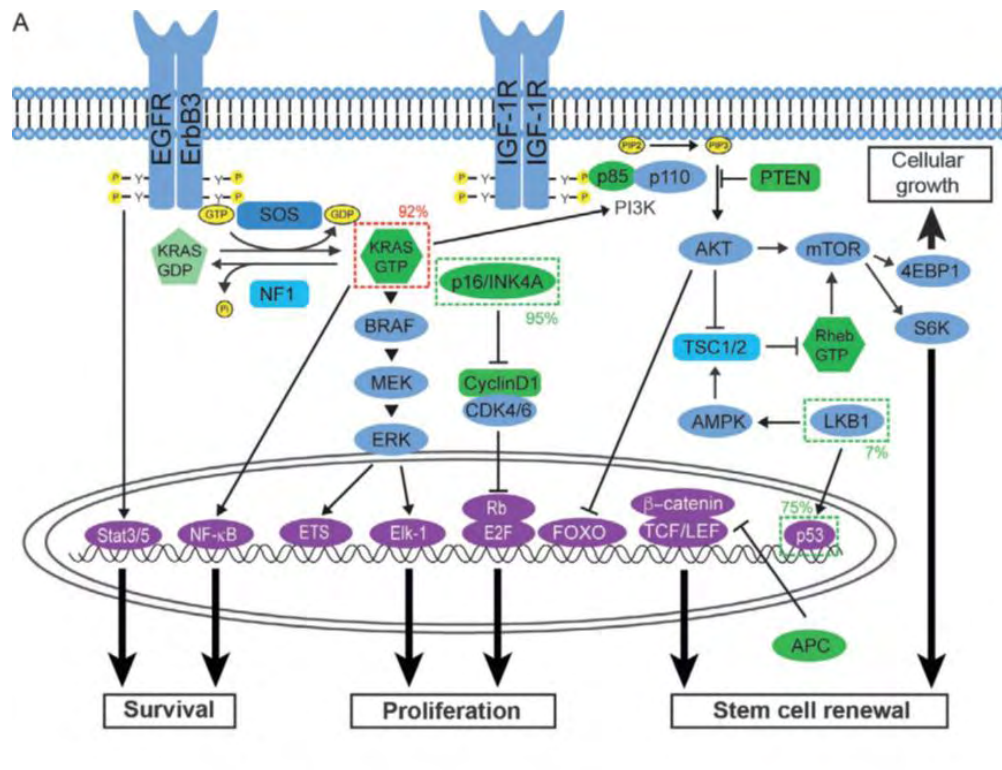
Εικόνα 7. Το μεταλλαγμένο *KRAS* βρίσκεται σε μία διαρκώς ενεργή μορφή μέσω πρόσδεσης του με το GTP.

(Zeitouni et al. 2016)

Ο ρόλος επομένως του *KRAS* είναι καθοριστικός για τον παγκρεατικό καρκίνο. Για το λόγο αυτό πολλές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να στοχευτεί φαρμακολογικά το *KRAS*. Οι προσπάθειες αυτές αφορούν είτε αναστολείς που επιτρέπουν την πρόσδεσή του στην πλασματική μεμβράνη είτε αναστολείς που στοχεύουν απευθείας πάνω στο *KRAS* προσπαθώντας να εμποδίσουν την ικανότητά του να υδρολύσει το GDP σε GTP είτε αναστολείς σηματοδοτικών μορίων που βρίσκονται downstream του *KRAS*. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα παρά τις προσπάθειες

που γίνονται το KRAS χαρακτηρίζεται ως μη στοχεύσιμο μόριο. Ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος στον κατάρρου του KRAS αποτελεί το πρωτο-ογκογονίδιο MYC το οποίο βρέθηκε να αποτελεί σημαντικό παράγοντα αντίστασης στις αντι-KRAS θεραπείες (Ischenko et al. 2017) (Zeitouni et al. 2016).

Η σηματοδότηση μέσω του RAS επηρεάζει το MYC ρυθμίζοντας την πρωτεϊνική σταθερότητά του μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT και RAF/MAP-K. Αυτό έγινε γνωστό μετά από μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι το KRAS από μόνο του δεν μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του MYC σε μεταγραφικό επίπεδο. Έτσι, βρέθηκε ότι το KRAS σταθεροποιεί το c-MYC μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και συγκεκριμένα μέσω σταθεροποίησης της πρωτεΐνης MYC (Wang et al. 2018). Το KRAS/ERK/c-MYC μονοπάτι αποτελεί το κύριο μονοπάτι καρκινογένεσης στον παγκρεατικό καρκίνο καθιστώντας έτσι το c-MYC έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο (Kortlever et al. 2017) (Wang et al. 2018).



Εικόνα 8. Οι κυριότεροι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παγκρέατος

(Grant et al. 2016)

Όπως προαναφέρθηκε το ενεργό KRAS, ενεργοποιεί πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το RAF/MAP-K για κυτταρικό πολλαπλασιασμό και το PI3K/AKT για κυτταρική αύξηση και επιβίωση.

PI3K/AKT μονοπάτι

Ένα από τα μονοπάτια που βρίσκονται στον καρύρου του KRAS είναι το PI3K μονοπάτι το οποίο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, το μεταβολισμό, την πρωτεϊνοσύνθεση, την απόπτωση, την κινητικότητα, τη μετάσταση, την επιβίωση, την απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, καθώς και το μικροπεριβάλλον και την εξέλιξη του όγκου. Το PI3K ελέγχει τις παραπάνω λειτουργίες μέσω πολλαπλών σηματοδοτικών μορίων όπως ο mTOR, NF-κB, GSK3-β και p27 (Yuan and Cantley 2008).

Πέρα όμως από το KRAS, το PI3K μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί και από μια ποικιλία ογκογόνων μεταλλάξεων στους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Μεταλλάξεις στα γονίδια του PI3K/AKT μονοπατιού έχουν παρατηρηθεί στο 50% όλων των ασθενών με καρκίνο και στο 60% των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο. Οι PI3K πρωτεΐνες ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κινητικότητα και η επιβίωση (Cantley 2002) (Vanhaesebroeck et al. 2010). Ανήκουν στην οικογένεια των λιπωδών κινασών που αποκρίνονται τόσο σε σήματα από το KRAS όσο και από τους υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης μετατρέποντας εξωκυττάρια σήματα σε ενδοκυττάρια μέσω της φωσφορυλίωσης δευτερογενών μηνυματοφόρων μορίων PIP2 σε PIP3 και ακολούθως φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης AKT. Το PTEN ανταγωνίζεται τη δράση του PI3K αποφωσφορυλιώνοντας το PIP3 σε PIP2. Μόλις η AKT ενεργοποιηθεί ρυθμίζει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, όπως η GSK3. Η AKT απενεργοποιεί τη GSK3 φωσφορυλιώνοντάς την και έτσι αναστέλλει την ικανότητά της να φωσφορυλιώσει το MYC και να το οδηγήσει προς αποικοδόμηση.

Επιπλέον, στον καρκίνο η PI3K σηματοδότηση αναστέλλει την απόπτωση και ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μεταλλάξεις σε μόρια του PI3K μονοπατιού συναντώνται σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο και σχετίζονται τόσο με την έναρξη της νόσου όσο και με την εξέλιξή της. Εκτός από το ρόλο του στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, το μονοπάτι PI3K ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των

κυττάρων του όγκου με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Murthy, Kuldeep S Attri, and Singh 2018).

Όσον αφορά τη ρύθμιση του c-MYC από το μονοπάτι αυτό στον παγκρεατικό καρκίνο, έχειδειχθεί ότι αφενός το c-MYC μέσω του mTOR ρυθμίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό και αφετέρου μέσω της GSK3b ελέγχονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του c-MYC (Murthy, Kuldeep S. Attri, and Singh 2018).

RAF/MEK/ERK (MAPK) μονοπάτι

Ένα ακόμη μονοπάτι που βρίσκεται στον κατάρρου του *KRAS* με καθοριστικό ρόλο στον καρκίνο είναι το μονοπάτι RAF/MEK/ERK (MARK). Εξωκυττάριοι αυξητικοί παράγοντες οδηγούν στην ενεργοποίηση των RAS GTPασών οι οποίοι διμερίζονται και ενεργοποιούν μόρια καθοδικά από αυτούς, όπως είναι οι RAF κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις MEK κινάσες (MEK1 MEK2) οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση των ERK κινασών (ERK1, ERK2). Οι MEK1/2 είναι κινάσες τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης, ενώ οι ERK1/2 αποτελούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης που έχουν αμινοξική ομολογία 85%. Μόλις οι ERK κινάσες ενεργοποιηθούν από τις MEK κινάσες αποσπώνται από αυτές και μεταφέρονται στον πυρήνα. Μπορούν να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν πάνω από 600 στόχους συμπεριλαμβανομένων μεταγραφικών παραγόντων, κινασών, φωσφατασών και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού.

Ένα από τα υποστρώματα της ERK, όπως προαναφέρθηκε είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας MYC. Η ERK οδηγεί στη σταθεροποίηση του *c-MYC* μέσω φωσφορυλίωσης του στη σερίνη 62. Επιπλέον, οι ERK κινάσες ενεργοποιούν την κινάση RSK η οποία φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα MAD1 προάγοντας την ουβικουιτινίωση και την αποικοδόμησή του επιτρέποντας έτσι στο *MYC* να δημιουργήσει διμερές με το μεταγραφικό παράγοντα MAX και να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Kalkat et al. 2017).

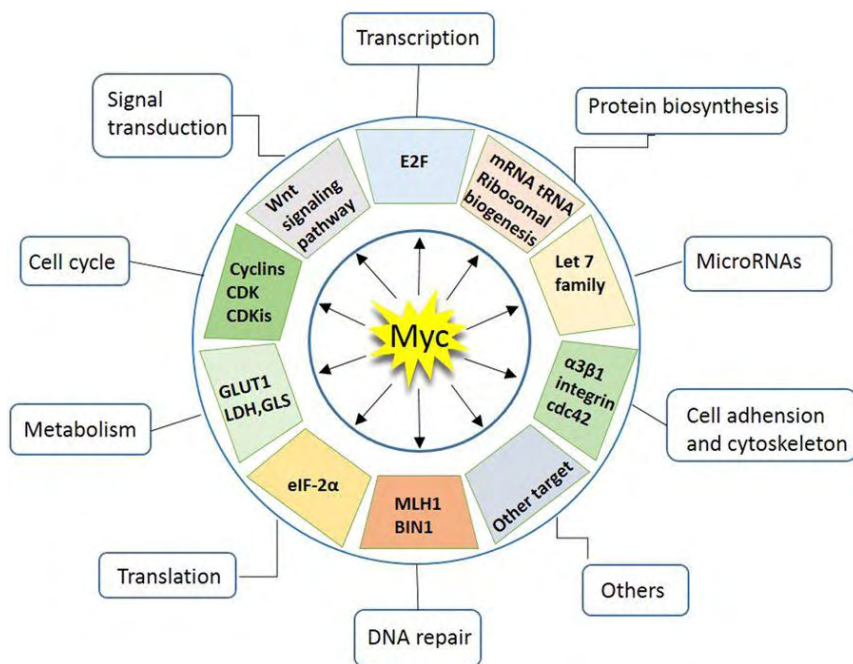
4. C-myc και παγκρεατικός καρκίνος

4.1 Δομή και λειτουργία του c-MYC

Η πρωτεΐνη MYC ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων και αποτελείται από τρία μέλη, τα C-MYC, L-MYC και N-MYC. Η οικογένεια αυτή ανακαλύφθηκε εξαιτίας της ομολογίας ενός ογκογονιδίου του ιού της μυελομάτωσης (V-MYC) και ενός ανθρώπινου γονιδίου το οποίο φάνηκε να υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκίνους (C-MYC). Αργότερα, ανακαλύφθηκαν και οι ομόλογες μορφές N-MYC και L-MYC. Αυτή η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζει τη μεταγραφή τουλάχιστον του 15% του συνόλου του ανθρώπινου γονιδιώματος (Bretonnes et al 2015).

Το MYC δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών γονιδίων υπεύθυνων για την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής των κυκλινών και μείωσης του p21, την κυτταρική ανάπτυξη, την απόπτωση μέσω μείωσης του BCL-2, καθώς και την κυτταρική διαφοροποίηση (Εικόνα 11). Επιπλέον, το c-MYC διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη μέσω του μονοπατιού WNT/β-κατενίνη. Το c-MYC αποτελεί ένα από τα γονίδια-στόχους της β-κατενίνης και συμβάλλει στην παγκρεατική οργανογένεση και συγκεκριμένα στη ρύθμιση του κυτταρικού πληθυσμού της εξωκρινούς, αλλά και της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος.

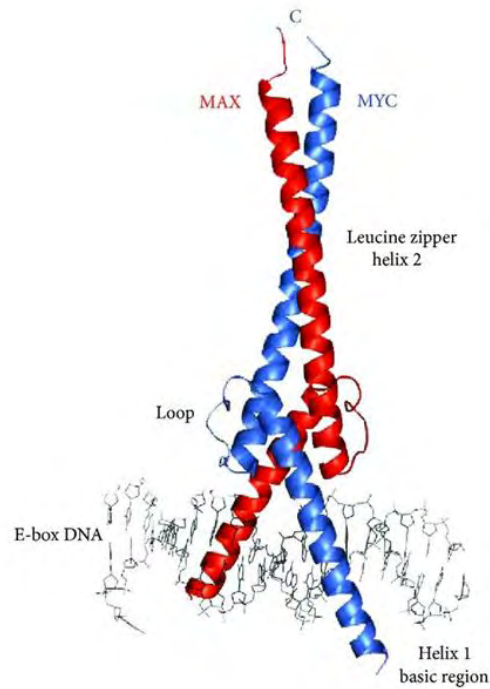
Ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν bHLH και LZ μοτίβα. Το μοτίβο bHLH χαρακτηρίζεται από δύο α-έλικες οι οποίες ενώνονται με μια θηλιά και χαρακτηρίζει μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων. Το μοτίβο LZ ή αλλιώς «φερμουάρ» λευκίνης χαρακτηρίζει πρωτείνες οι οποίες αποτελούνται από μια χαρακτηριστική αλληλουχία αμινοξέων με δομή α-έλικας η οποία αποτελείται από περιοδικές επαναλήψεις του αμινοξέος λευκίνη κάθε 7 αμινοξέα. Το MYC ως μεταγραφικός παράγοντας δεσμεύεται σε ειδικές συντηρημένες αλληλουχίες (E-boxes) στο DNA που βρίσκονται στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων-στόχων του. Επιπλέον, εκτός από κλασικός μεταγραφικός παράγοντας το MYC έχει την ικανότητα πρόσληψης ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών, δηλαδή ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών.



Εικόνα 9. Πλειοτροπικές δράσεις του *c-MYC*.

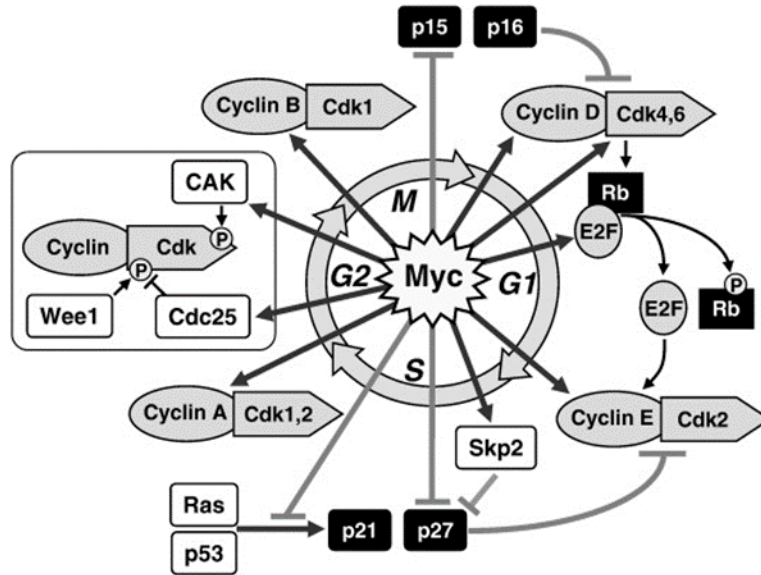
Φυσιολογικά το *c-MYC* ογκογονίδιο εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 8 στη ζώνη 8q24. Το γονίδιο αυτό αποτελείται από τρία εξόνια και δύο εσώνια. Από την αρχή έως το τέλος το μήκος του γονιδίου είναι 5000 ζεύγη βάσεων. Σημαντικές δομές του γονιδίου αποτελούν οι αλληλουχίες P1 και P2 οι οποίες είναι 5' επαγωγείς και βοηθούν στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Επιπλέον, υπάρχουν δύο TATAA κουτιά που εντοπίζονται το πρώτο στο 5' άκρο του εξωνίου 1 και το δεύτερο μέσα στο εξόνιο 1 και αποτελούν ρυθμιστές της γονιδιακής έναρξης. Το mRNA του *c-MYC* έχει μήκος περίπου 2300 βάσεις και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 439 αμινοξέα. Από τη μετάφραση του *c-MYC* mRNA προκύπτουν δύο προϊόντα με μέγεθος 67 και 64 kDa αντίστοιχα. Τα δύο προϊόντα διαφέρουν κατά 15 αμινοξέα, ωστόσο δεν έχει αποδοθεί κάποια διαφορετική λειτουργία μεταξύ τους (Dang 2012). Η κύρια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται έχει μέγεθος 64 kDa και είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες (Chen et al 2018). Αποτελείται από τρεις περιοχές, μια αμινοτελική περιοχή με 140 αμινοξέα που φέρει ρυθμιστικά στοιχεία, μια κεντρική μη δομημένη περιοχή και μια καρβοξυτελική με επικράτεια «δακτύλου-ψευδαργύρου» (zinc-finger) που φέρει κυρίως αλληλουχίες για την πρόσδεση στο DNA. Η πρόσδεση του MYC στο DNA γίνεται με τη βοήθεια ενός άλλου παράγοντα, του MAX, ο οποίος σχηματίζει ετεροδιμερές με το MYC και

προσδένονται στο DNA και προσδένονται στις ειδικές αλληλουχίες υπερέκφρασης (E-boxes) και ρυθμίζουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων-στόχων. (Dang et al. 1999) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Ετεροδιμερές του MYC με το μεταγραφικό παράγοντα MAX κατά την πρόσδεσή τους στις ειδικές αλληλουχίες του DNA.

https://www.researchgate.net/figure/Crystal-structure-of-a-MYC-MAX-heterodimer-bound-to-a-canonical-E-box-Only-the-structure_fig4_270103355



Εικόνα 11. Ο ρόλος του MYC στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου.

(Bretones et al. 2015)

4.2 Κύκλος ζωής του *c-MYC*

Φυσιολογικά το *c-MYC* βρίσκεται υπό έλεγχο και εκφράζεται μόνο κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων του κυτταρικού κύκλου. Τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης το *c-MYC* έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής με διάρκεια περίπου 20-30 λεπτά (Levens 2013). Επομένως, είναι σημαντικός ο αυστηρός έλεγχος των επιπέδων του προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Ο έλεγχος των επιπέδων του *c-MYC* μπορεί να γίνει σε επίπεδο μεταγραφικό μετα-μεταγραφικό κα μετα-μεταφραστικό.

Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο είναι αρκετά πολύπλοκες, καθώς το *c-MYC* ρυθμίζεται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το WNT / β -κατενίνη, TGF- β / SMAD, FGF / ERK1 / 2, SHH / SMO και NOTCH. Μόλις ενεργοποιηθεί, αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες για να ρυθμίσει θετικά ή αρνητικά άλλα μόρια

συμπεριλαμβανομένων των κυκλινών, των E2Fs, των IDs, των CDKI και διαφόρων microRNAs (Korecky et al. 2012).

Η ρύθμιση της έκφρασης του c-MYC σε μεταγραφικό επίπεδο περιλαμβάνει:

- Τροποποιήσεις σε επίπεδο χρωματίνης: σημαντικό ρόλο στα επίπεδα έκφρασης του c-MYC βρέθηκε ότι κατέχει η κατάσταση μεθυλίωσης θέσεων CCGG στην 5' περιοχή του γονιδίου.
- Ρύθμιση της έναρξης και της λήξης της μεταγραφής: ένα σύνολο μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζουν την ενεργότητα του υποκινητή του c-MYC (Lang et al. 1988).

Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν:

- Ρύθμιση της σταθερότητας του παραγόμενου mRNA: η προσθήκη της καλύπτρας στο 5' άκρο, η δημιουργία της πολυ (A) ουράς και η συρραφή των εξωνίων αποτελούν τα βασικά στάδια αυτής της διαδικασίας. Στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση, επίσης, φαίνεται ότι συμμετέχουν αρκετά miRNAs καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων. Έτσι, η λειτουργία πολλών miRNAs είναι πιθανό να συμβάλλουν στις ογκογόνες ιδιότητες του *MYC* (Jackstadt and Hermeking 2015).
- Ρύθμιση της μετάφρασης: η ρύθμιση στο επίπεδο της μετάφρασης γίνεται κυρίως κατά την έναρξη της μετάφρασης και περιλαμβάνει την πρόσδεση του mRNA στο ριβόσωμα, την προσβασιμότητα του mRNA και τη συμμετοχή μεταγραφικών παραγόντων έναρξης (Lang et al. 1988).

Τέλος, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τροποποιήσεις που υφίστανται οι πρωτεΐνες μετά τη σύνθεσή τους, όπως η φωσφορυλίωση, η ουβικουιτινίωση, η γλυκοζυλίωση, η υδροξυλίωση, η μεθυλίωση κλπ (Rg Vervoorts, Lü Scher-Firzloff, and Lü Scher 2006).

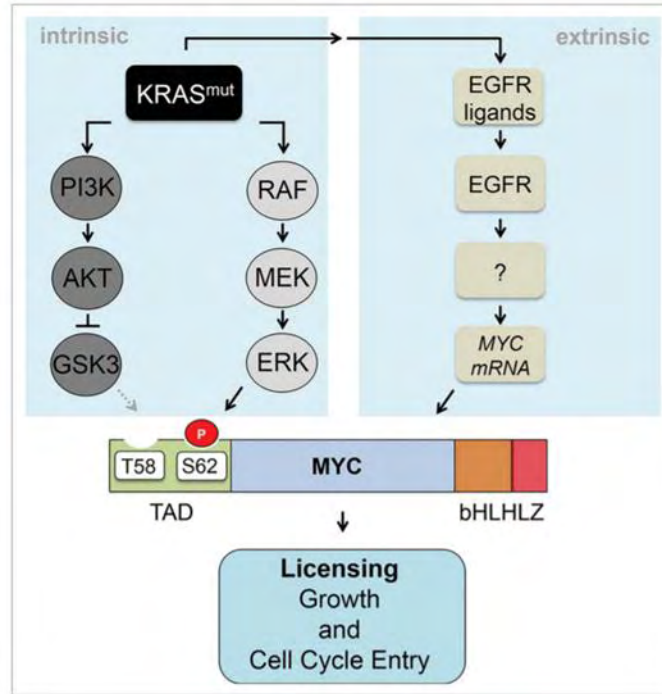
Η ενεργοποίηση του c-MYC ρυθμίζεται από το σύστημα ουμπικουιτίνης-πρωτεασώματος το οποίο, όπως είναι γνωστό, ελέγχει την αποικοδόμηση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική σταθερότητα του c-MYC ρυθμίζεται με τρόπο εξαρτώμενο από το στάδιο του

κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα. Για παράδειγμα, το c-MYC είναι πολύ ασταθές σε κύτταρα που βρίσκονται στη G₀ φάση, ενώ μετά την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο το c-MYC σταθεροποιείται και συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα.

4.3 Φωσφορυλίωση του c-MYC και πρωτεϊνική σταθερότητα

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που προορίζονται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα φωσφορυλιώνονται αρχικά σε συγκεκριμένα κατάλοιπα ώστε να αναγνωριστούν από τη συσκευή ουβικουιτινιλίωσης. Υπάρχουν δύο θέσεις φωσφορυλίωσης στην αμινοτελική περιοχή του c-MYC, στη σερίνη 62 η οποία σταθεροποιεί το c-MYC και στη θρεονίνη 58 όπου αποσταθεροποιεί το c-MYC. Η σερίνη 62 αποτελεί στόχο της κινάσης ERK και η θρεονίνη 58 της κινάσης GSK3-b. Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 62 προηγείται και είναι προϋπόθεση της φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 58.

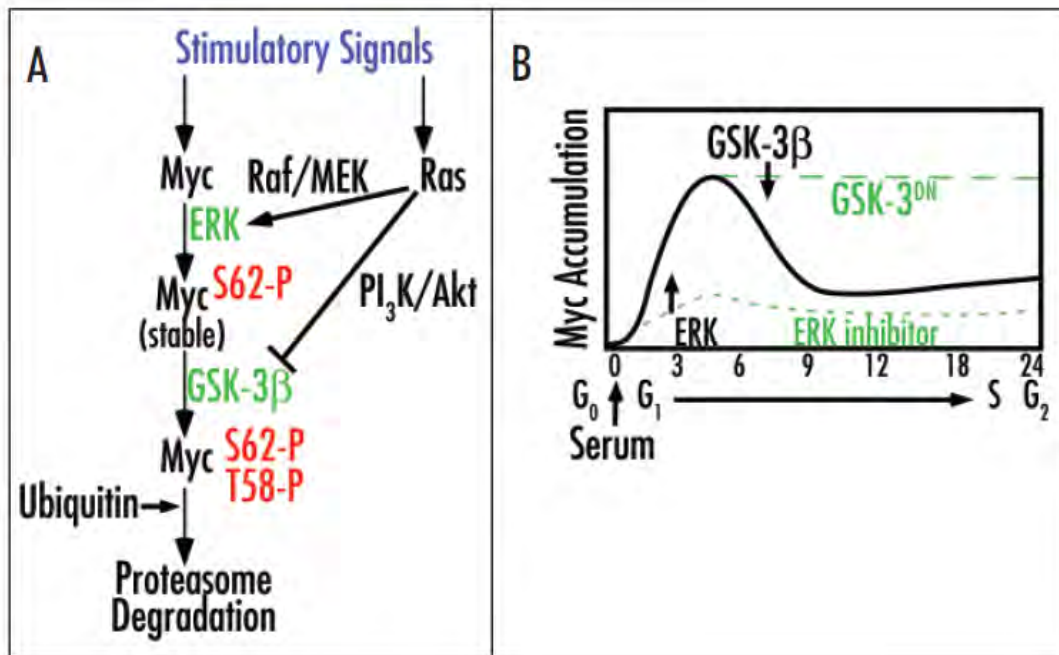
Η φωσφορυλίωση, λοιπόν, αυτών των δύο καταλοίπων ρυθμίζεται από τα εξής δύο μονοπάτια: το μονοπάτι RAF/MEK/ERK και το PI3K/AKT όπου τα δύο μονοπάτια βρίσκονται υπό τον έλεγχο του KRAS (εικόνα 12). Εξωκυττάρια σήματα που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οδηγούν σε παραγωγή του c-myc και ενεργοποίηση του RAS η οποία οδηγεί σε σταθεροποίηση του c-MYC μέσω της κινάσης ERK η οποία βρίσκεται καθοδικά του Ras γονιδίου. Η φωσφορυλίωση, λοιπόν, του c-MYC στη σερίνη 62 αναγνωρίζεται από το PIN1 που ισομερίζει την προλίνη 63 από τη trans στη cis μορφή της διευκολύνοντας έτσι την πρόσδεση του c-MYC στο DNA και την επακόλουθη ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του. Η ενεργοποίηση του RAS, επίσης, αποτρέπει τη φωσφορυλίωσή του στη θρεονίνη 58 μέσω αναστολής της GSK3-b σταθεροποιώντας το c-MYC και αυξάνοντας τα επίπεδά του σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αργότερα, στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, καθώς μειώνεται η σηματοδότηση PI3K/AKT η GSK3-b ενεργοποιείται και οδηγεί στην αποικοδόμηση του c-myc μέσω της φωσφορυλίωσής του στη θρεονίνη 58. Το φωσφορυλιωμένο c-MYC τόσο στη σερίνη 62 όσο και στη θρεονίνη 58 ισομερίζεται ξανά στην προλίνη 63 από cis σε trans από το PIN1 επιτρέποντας έτσι στη φωσφατάση PP2A να αποφωσφορυλιώσει το c-MYC στη σερίνη 62. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το c-MYC να αναγνωριστεί από την E3 λιγάση FBXW7 η οποία ουβικουιτινιλιώνει το c-MYC οδηγώντας το τελικά στην αποικοδόμηση (Gabay, Li, and Felsher 2014).



Εικόνα 12. Μεταγωγή σήματος από το *KRAS* στο *c-MYC* στον παγκρεατικό καρκίνο. Η κανονική σηματοδότηση οδηγεί στην ενεργοποίηση του *RAF/MEK/ERK* σηματοδοτικού μονοπατιού. Η μη κανονική σηματοδότηση ενεργοποιεί τη σηματοδότηση *PI3K/AKT/GSK3*.

(Schneeweis et al. 2016)

Η φωσφορυλίωση στη θρεονίνη 58 αποτελεί σημείο κλειδί στη ρύθμιση των επιπέδων του *c-MYC*. Μεταλλάξεις στη θέση αυτή καθώς και σε γειτονικά αμινοξέα οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης του *c-MYC* και έχουν παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις λεμφώματος Burkitt. Παρόλο που η μεταγραφή του *c-MYC* οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων, αναστολή της κινάσης ERK οδηγεί σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του *c-MYC* χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα του mRNA του, ενώ η αναστολή της κινάσης GSK3-β οδηγεί σε συσσώρευση του οδηγώντας σε αύξηση της αναλογίας pSer62/pThr58-MYC. Έτσι, τα γεγονότα της φωσφορυλίωσης που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική σταθερότητα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του *c-MYC* κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Hessmann et al. 2016) (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Γεγονότα φωσφορυλίωσης που ελέγχουν την πρωτεϊνική σταθερότητα του *c-MYC*. A) Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση και τη συσσώρευση του *c-MYC*. B) Συσσώρευση του *c-MYC* στη φάση *G1* του κυτταρικού κύκλου μέσω της *ERK* και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του στη μετέπειτα *G1* φάση μέσω της *GSK3-b*

(Hessmann et al. 2016).

4.4 Ρόλος του *c-MYC* στον καρκίνο

Το *c-MYC* αποτελεί ένα πρωτο-ογκογονίδιο το οποίο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης και της διαίρεσης των κυττάρων με αποτέλεσμα δυσλειτουργίες του γονιδίου αυτού να έχουν συσχετιστεί με ποικίλους ανθρώπινους καρκίνους (Ramsay, Evan, and Bishop 1984). Περίπου το 50% των περιστατικών καρκίνου σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του ογκογονιδίου *c-MYC*.

Στον καρκίνο, η δραστηριότητα του μεταγραφικού δικτύου του *MYC* συχνά απορυθμίζεται, συμβάλλοντας στην έναρξη και τη διατήρηση της νόσου. Μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση του

c-MYC σε όλες τις παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, στην πλειοψηφία των ιστών ασθενών με PDAC, καθώς και στους όγκους ποντικών με παγκρεατικό καρκίνο που προέρχονται από μεταλλάξεις στο KRAS. Επιπλέον, υπερέκφραση του *c-MYC* σε ειδικά γενετικά σχεδιασμένα ποντικά έδειξε ότι επαρκεί ώστε να επάγει ακόμη και μετάσταση. Επίσης, βρέθηκε ότι το *c-MYC* είναι απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση και την εξέλιξη του παγκρεατικού καρκίνου και είναι ανεξάρτητο από τα επίπεδα έκφρασης του p53 και του CDKN2A (Rajbhandari et al. 2017).

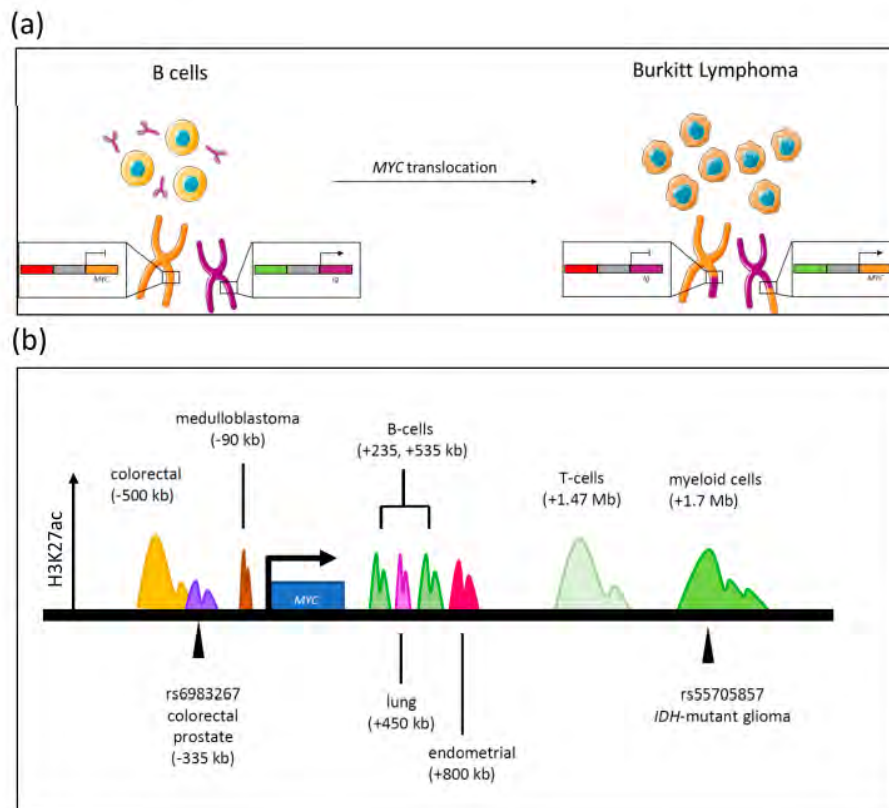
Υπερέκφραση του *MYC* μπορεί να επιτευχθεί μέσω γενετικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων αλλαγών του αριθμού αντιγράφων, χρωμοσωματικών μετατοπίσεων, ενεργοποίηση ενισχυτών, ή μέσω αλλαγών σε σηματοδοτικά μόρια στον ανάρρου του *MYC* που οδηγούν σε αυξημένη μεταγραφή του *MYC* ή αυξημένο *MYC* mRNA και αυξημένη πρωτεϊνική σταθερότητα.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι τρόποι με τους οποίους το *c-MYC* μπορεί να απορρυθμιστεί στον καρκίνο συμβάλλοντας τόσο στην εκκίνησή του όσο και στη διατήρηση του δυναμικού του όγκου (Kalkat et al. 2017) (εικόνα 15).

- **Γονιδιακή ενίσχυση:** Η γονιδιακή ενίσχυση του *MYC* είναι η συχνότερη αιτία υπερέκφρασής του στον καρκίνο. Η επανάληψη γονιδίων αποτελεί βασικό μηχανισμό για αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων πολλών ογκογονιδίων. Σε μελέτη περισσότερων των 500 δειγμάτων παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (PDAC), γονιδιακή ενίσχυση παρατηρήθηκε στο 14% των περιπτώσεων. Συγκριτικές μελέτες γενωμικού υβριδισμού έδειξαν αύξηση του αριθμού αντιγράφων του *c-MYC* μέσω ενίσχυσης του χρωμοσώματος 8q23 στο 32,3% και στο 29,4% των πρωτογενών και μεταστατικών PDAC, αντίστοιχα. Εντούτοις, εκτενής γενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι το *MYC* ενισχύεται κυρίως σε χαμηλά επίπεδα με μόνο ένα έως τρία επιπλέον γονιδιακά αντίγραφα ανά κύτταρο και έτσι δεν ευθύνεται η γονιδιακή ενίσχυση αποκλειστικά για τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών που υπάρχουν στον ανθρώπινο PDAC.
- **Ενεργοποίηση ενισχυτών:** Ο στενός έλεγχος της έκφρασης του *MYC* ως απάντηση στην εξωκυτταρική και ενδοκυτταρική σηματοδότηση επιτυγχάνεται μέσω ειδικών ενισχυτικών αλληλουχιών κοντά στο γενετικό τόπο του *MYC*. Στον καρκίνο τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *MYC* μπορούν να οφείλονται σε μετατοπίσεις όπου το *MYC* βρίσκεται υπό τον έλεγχο δραστικών ειδικών αυξητικών παραγόντων, όπως συμβαίνει στο Burkitt Lymphoma (BL) (εικόνα 14).

- **Μεταθέσεις:** Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα όπου η ενεργοποίηση του *c-MYC* οφείλεται σε χρωμοσωματική μετάθεση αποτελεί το λέμφωμα Burkitt. Τα κύτταρα στο λέμφωμα Burkitt χαρακτηρίζονται από αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ τμήματος του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος 8, όπου εντοπίζεται το *c-MYC*, και του τμήματος του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος 14, όπου εντοπίζονται γονίδια για τις βαριές και τις ελαφριές αλυσίδες των αιμοσφαιρινών. Η μετάθεση αυτή είναι η πιο συχνή στο λέμφωμα Burkitt και συμβαίνει σε ποσοστό 90%.
- **Πολυμορφισμοί:** GWAS (Genome-wide Association Studies) μελέτες έχουν δείξει ότι SNPs συχνά συναντώνται σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες δεν κωδικοποιούν γονίδια. Οι περιοχές αυτές περιλαμβάνουν ενισχυτές ή άλλες ρυθμιστικές περιοχές και έτσι τα SNPs εμπλέκονται σε αλλαγή στη δραστηριότητα αυτών των περιοχών. Αρκετά SNPs συσχετιζόμενα με πολλούς τύπους καρκίνου (κυρίως του προστάτη και του παχέος εντέρου) έχουν βρεθεί στο γενετικό τόπο 8q24 (Grisanzio and Freedman 2010).
- **Ενεργοποίηση ενισχυτών:** Η ακετυλίωση των ιστονών οδηγεί στην ανοικτή δομή της χρωματίνης και επιτρέπει τη μεταγραφή των γονιδίων. Υπερακετυλίωση και υπερενεργοποίηση των ενισχυτών που βρίσκονται

καθοδικά του γονιδίου του *MYC* και αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή του γονιδίου βρέθηκε να προκαλεί υπερέκφραση του *MYC* (Shi et al. 2013)



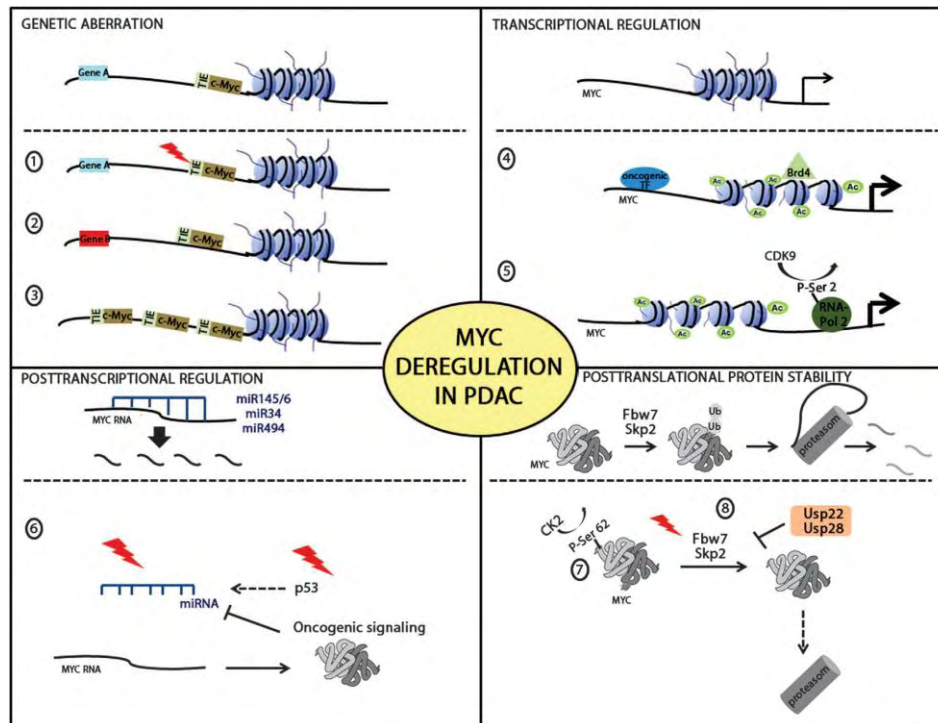
Εικόνα 14. Γενετικές αλλαγές που απορρυθμίζουν τη μεταγραφή του *c-MYC* γονιδίου.

(Kalkat et al. 2017)

- **Πρωτεϊνική σταθερότητα:** Εκτός από τις παραπάνω μεταλλάξεις παρατηρούνται και μεταλλάξεις είτε στο ίδιο το *c-MYC* σε θέσεις οι οποίες είναι καθοριστικές για τη σταθερότητα του μορίου είτε στα μόρια των σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν την πρωτεϊνική σταθερότητα του *c-MYC* (Chen et al. 2018). Τέτοια μονοπάτια είναι το PI3K/AKT και RAF/MEK/ERK που περιγράφηκαν παραπάνω. Απορρύθμιση των επιπέδων του *c-MYC* που οφείλεται σε αλλαγή στη δραστηριότητα τέτοιων μορίων που τροποποιούν το *c-MYC* σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο αφορούν κυρίως παγκρεατικούς καρκίνους με μεταλλαγμένο το KRAS. (Kalkat et al. 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν μεταλλάξεις των PI3Ks πρωτεϊνών που καθιστά την πρωτεΐνη διαρκώς ενεργή. Η πρωτεΐνη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση β, η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση

GSK3-b. Η πρωτεΐνη έτσι δεν φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη MYC στο κατάλοιπο θρεονίνης 58 με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αποικοδόμηση της (Kalkat *et al.*2017).

Μεταλλάξεις στο ίδιο *c-MYC* που μπορεί να επηρεάζουν τη σταθερότητά του συμβαίνουν σε περιοχές σημαντικές για διεργασίες, όπως όπως η ακετυλίωση, ουβικουτινίωση, σουμοϊλίωση, γλυκοζυλίωση και φωσφορυλίωση. Για παράδειγμα, μετάλλαξη που οδηγεί στην αντικατάσταση της θρεονίνης 58 σε αλανίνη οδηγεί σε αύξηση της πρωτεϊνικής σταθερότητας με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του *c-MYC* σε υψηλά επίπεδα. Αυτό συμβαίνει λόγω μη φωσφορυλίωσης του *c-MYC* από τη GSK3-b στη θέση όπου βρίσκεται η θρεονίνη.



Εικόνα 15. Απορρύθμιση των επιπέδων του *c-MYC* σε επίπεδο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό.

(Kalkat *et al.* 2017)

5. C-MYC ως θεραπεία για τον παγκρεατικό καρκίνο

Πολλές έρευνες των τελευταίων δεκαετιών κατέδειξαν ότι το *MYC* αποτελεί θεμελιώδες ογκογονίδιο στον παγκρεατικό καρκίνο. Ο παγκρεατικός καρκίνος ανήκει στις πιο ετερογενείς μορφές καρκίνων και γι' αυτό παρουσιάζει δυσκολίες στη θεραπεία του. Πολλά γενετικά και επιγενετικά γεγονότα στον PDAC συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του *MYC*. Το γεγονός ότι πολλά ογκογονικά σήματα οφείλονται στο *MYC*, καθιστά τη στόχευσή του στον PDAC μια εξέχουσα και πολύ ελπιδοφόρα θεραπευτική επιλογή (Chen et al. 2018).

5.1 Άμεση στόχευση του *c-MYC*

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να στοχευτεί το διμερές *MYC/MAX* με τη βοήθεια αναστολέα ο οποίος αλληλεπιδρά με συγκεκριμένα αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής της bHLH-LZ επικράτειας του *MYC*. Μάλιστα, βρέθηκε ότι ο αναστολέας αυτός έχει καλύτερη δράση σε συνδυασμό με κλασσικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως για παράδειγμα η γκεμισιταμίνη. Επιπλέον, σε κλινικές δοκιμές φάσης III βρίσκονται και μικρά αντι-νοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν απευθείας το *MYC* (Chen, Liu, and Qing 2018).

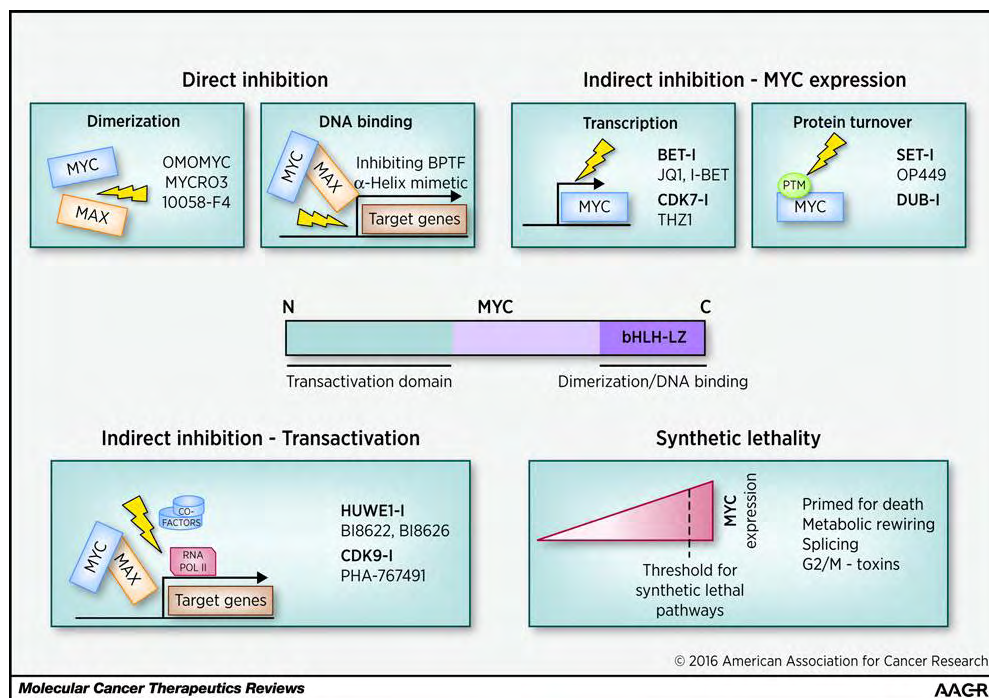
Ωστόσο το *c-MYC* αποτελεί έναν εξαιρετικά δύσκολο στόχο διότι ως μεταγραφικός παράγοντας δεν έχει ειδικό ενεργό κέντρο το οποίο θα αποτελέσει στόχο μικρών μορίων. Επιπλέον, το *c-MYC* βρίσκεται στον πυρήνα οπότε δεν μπορεί να στοχευτεί εύκολα με ειδικά σχεδιασμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Για το λόγο αυτό υπάρχουν εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις μέσω έμμεσων κυρίως μηχανισμών που στοχεύουν σε μονοπάτια στον ανάρρου που ρυθμίζουν το *c-MYC* σε διάφορα επίπεδα (μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό) (Wirth et al. 2016)(Chen et al. 2018) (εικόνα 17).

5.2 Έμμεση στόχευση του *c-MYC*

Οι αναστολείς που στοχεύουν το *c-MYC* με έμμεσο τρόπο διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: αναστολείς που μειώνουν απευθείας την πρωτεϊνική έκφραση του *c-MYC* και αναστολείς που επιδρούν σε γονίδια σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την έκφραση του *c-MYC*, όπως

για παράδειγμα το μονοπάτι MEK/ERK και PI3K/AKT (εικόνα 16). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση αναστολέων που οδηγούν στην επανενεργοποίηση της φωσφατάσης PP2A η οποία μειώνει τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου c-MYC στη σερίνη 62 και συνεπώς την έκφρασή του στα κύτταρα του PDAC (Wirth et al. 2016).

Η αναστολή της ERK, επίσης, αποτελεί σημαντική θεραπευτική προσέγγιση στον εξαρτώμενο από το K-RAS καρκίνο του παγκρέατος. Παρόλο που οι αναστολείς του PI3K δεν έχουν δείξει σημαντική θεραπευτική δράση ο συνδυασμός τους με άλλα φάρμακα αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό σχήμα που βρίσκεται ήδη σε κλινικές δοκιμές. Επιπλέον, μελέτη των Hayes et al επισήμανε τους ρυθμιστικούς ρόλους του PI3K / Akt / mTOR μονοπατιού που σηματοδοτεί την ευαισθησία του αναστολέα ERK. Ως εκ τούτου, το μονοπάτι σηματοδότησης ERK μαζί με τη σηματοδότηση PI3K μπορεί να αποτελέσει μια ξεχωριστή και θεραπευτική στρατηγική για τον καρκίνο του παγκρέατος (Murthy, Kuldeep S. Attri, et al. 2018).

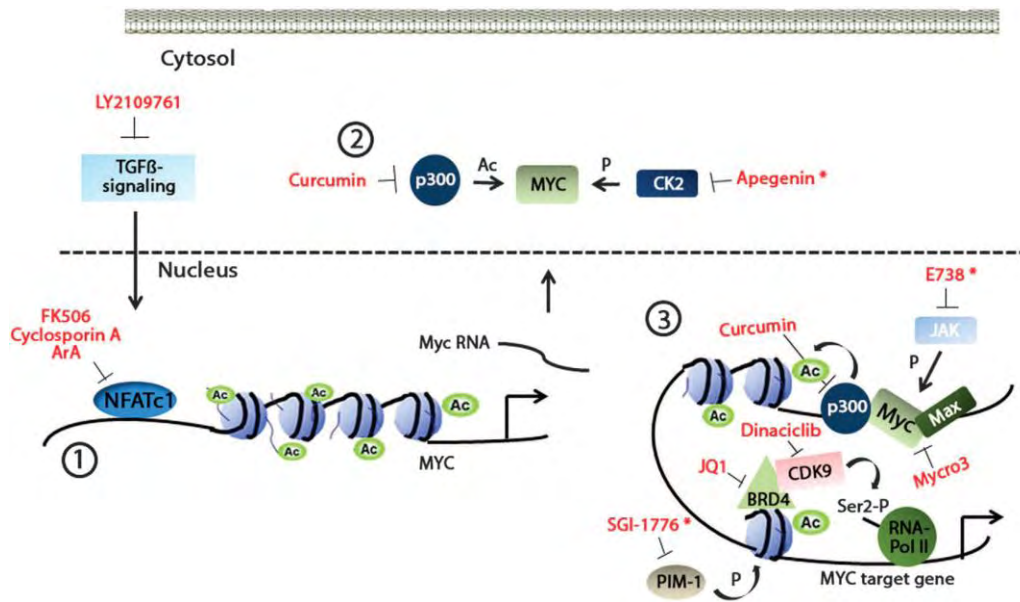


Εικόνα 16. Μηχανισμοί αναστολής του c-MYC.

(Wirth et al. 2016)

Μια πολύ σημαντική φαρμακευτική καινοτομία στην προσπάθεια στόχευσης του c-MYC σε πρωτεϊνικό επίπεδο αποτελεί η χρήση των BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif)

αναστολέων. Πρόκειται για αναστολείς με διττή λειτουργία οι οποίοι αφενός προσδένονται στην πρωτεΐνη-στόχο και αφετέρου στη λιγάση E3. Έτσι, οδηγούν την πρωτεΐνη-στόχο προς αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος (Gabay et al. 2014).



Εικόνα 17. Άμεση και έμμεση στόχευση του *c-MYC* σε επίπεδο μεταγραφής (1) (3) και σταθερότητας (2).

(Gabay et al. 2014)

Συμπερασματικά, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει στοχεύοντας στο *MYC* από τη στιγμή που όλο και περισσότερες έρευνες ενισχύουν το ρόλο του σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του παγκρεατικού. Θα πρέπει, λοιπόν, να εκμεταλλευτούμε όλα τα πρόσφατα ευρήματα των τελευταίων ερευνών σχετικά με τη δυσλειτουργία του *MYC* στον PDAC σε ωφέλιμες θεραπευτικές στρατηγικές.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του c-MYC στον παγκρεατικό καρκίνο. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ελέγχθηκαν σε καρκινικούς ιστούς, καθώς και γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς από κάθε ασθενή. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι τροποποιήσεις του c-MYC σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο προκειμένου να αποσαφηνιστεί εάν υπάρχει απορρύθμιση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική σταθερότητα του c-MYC. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του c-MYC στα κατάλοιπα σερίνη 62 και θρεονίνη 58 που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική σταθερότητά του προκειμένου να διασαφηνιστεί εάν επηρεάζεται ο ρυθμός αποικοδόμησης του c-MYC μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Περαιτέρω εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης θεμελιωδών μορίων που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση του c-MYC, όπως για παράδειγμα η GSK3-b μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων πραγματοποιήθηκε απομόνωση πρωτεϊνών από τους όγκους των ασθενών, ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Image J.

Επισημαίνεται ότι όλοι οι ασθενείς έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση και η παραπάνω μελέτη έχει εγκριθεί από το επιστημονικό συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6. Κυτταροκαλλιέργειες

Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τόσο εγκαθιδρυμένες (established) κυτταρικές σειρές, τις οποίες προμηθευτήκαμε από την ATCC (American Type Culture Collection) όσο και πρωτογενείς (primary) κυτταρικές σειρές οι οποίες δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο από όγκο ασθενούς με καρκίνο του παγκρέατος. Οι εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- **AsPC1** : Πρόκειται για μία κυτταρική σειρά που προέρχεται από μεταστατικά παγκρεατικά κύτταρα απομονωμένα από πάσχουσα γυναίκα 62 ετών
- **BxPC-3**: Πρόκειται για μία κυτταρική σειρά που προέρχεται από επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος απομονωμένα από πάσχουσα γυναίκα 61 ετών
- **Panc1**: Πρόκειται για μία κυτταρική σειρά που προέρχεται από μεταστατικά παγκρεατικά κύτταρα απομονωμένα από πάσχων άντρα 56 ετών

Οι πρωτογενείς κυτταρικοί πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- **Attached 021013**
- **Floating 021013**

Κυτταροκαλλιέργειες (συνθήκες και θρεπτικό μέσο)

Η διαδικασία των κυτταροκαλλιεργειών περιλαμβάνει επιμέρους διαδικασίες όπως, η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση διάφορων κυτταρικών τύπων υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, αερίων και θρεπτικού υλικού. Συγκεκριμένα η επώαση των κυττάρων γίνεται σε ειδικό επωαστικό κλίβανο στους 37 °C με παροχή 5% CO₂ και 95% υγρασία. Ο χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε ειδικό θάλαμο νηματικής ροής (hood).

Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται μέσα σε ειδικές φλάσκες όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται προκειμένου να καλύψουν όλο το διαθέσιμο χώρο της φλάσκας και να

εκμεταλλευτούν όλο το θρεπτικό μέσο. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι το RPMI 1640 (Gibco). Σε αυτό προστίθενται επιπλέον:

- 5% ορός βοοειδούς (FBS) ο οποίος περιέχει αυξητικούς παράγοντες που ενισχύουν την ανάπτυξη των κυττάρων και ευνοεί την προσκόλληση των κυττάρων στη φλάσκα
- 1% L-Glutamine
- 1% αντιβιοτικό πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Pen-Strep) για αποφυγή μολύνσεων στην καλλιέργεια

Κατά τη διαδικασία της καλλιέργειας λαμβάνουν χώρα διαδικασίες, όπως η ανανέωση του θρεπτικού μέσου και η ανακαλλιέργεια των κυττάρων (subculturing/passaging).

6.1 *Ανανέωση θρεπτικού υλικού*

Η ανανέωση του θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται περίπου κάθε δύο μέρες ανάλογα με τη μεταβολική κατάσταση των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται:

- Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού υλικού που έχει μεταβολιστεί.
- Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού στη φλάσκα. Η ποσότητα του θρεπτικού υλικού που προστίθεται εξαρτάται από το μέγεθος της επιφάνειας της φλάσκας, σε φλάσκες 25 cm² προστίθενται 5ml θρεπτικού υλικού, ενώ σε φλάσκες 75 cm² 12-15ml θρεπτικού υλικού.

6.2 *Ανακαλλιέργεια κυττάρων*

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει περισσότερο από το 80% της επιφάνειας της φλάσκας. Τα βήματα για τη διαδικασία αυτή είναι τα εξής:

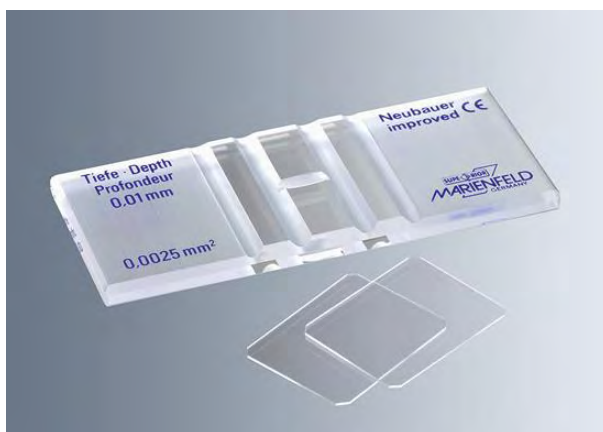
- Απόρριψη του παλιού θρεπτικού υλικού.
- Πλύση με 2-3ml PBS 1x προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως ο ορός που περιέχεται στο θρεπτικό υλικό ώστε να δράσει η τρυψίνη η οποία προστίθεται αμέσως μετά (ο ορός

αναστέλλει τη δράση της τρυψίνης). Το PBS είναι ένα διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο είναι ισότονο και γι'αυτό χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας των κυττάρων.

- Προσθήκη 1-2ml τρυψίνης ανάλογα με το μέγεθος της επιφάνειας της κάθε φλάσκας.
- Επώαση της φλάσκας στον κλίβανο για περίπου 5 λεπτά, ώστε να ενεργοποιηθεί η τρυψίνη και να υδρολύσει τις πρωτεΐνες του υποστρώματος των κυττάρων προκειμένου να αποκολληθούν από την επιφάνεια της φλάσκας καθώς και μεταξύ τους. Ο χρόνος επώασης προσαρμόζεται ανάλογα με το πόσο εύκολα αποκολλάται από την επιφάνεια της φλάσκας κάθε είδος κυττάρου, αλλά σε κάθε περίπτωση δε θα πρέπει να ξεπερνάει τα 10 λεπτά. Ο έλεγχος για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας γίνεται στο μικροσκόπιο.
- Αφού γίνει η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού με ορό ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της τρυψίνης.
- Προσθήκη του κατάλληλου όγκου κυτταρικού εναιωρήματος στην ίδια ή και σε άλλες φλάσκες (expand) ανάλογα με την προτεινόμενη αναλογία ανακαλλιέργειας (subculturing ratio) και με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος.

6.3 Μέτρηση κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων αποτελεί μια διαδικασία απαραίτητη για πολλές διεργασίες που αφορούν τα κύτταρα. Γίνεται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα ειδικά σχεδιασμένη για την καταμέτρηση των κυττάρων. Αποτελείται από δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες κάθε μία από τις οποίες έχει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα.

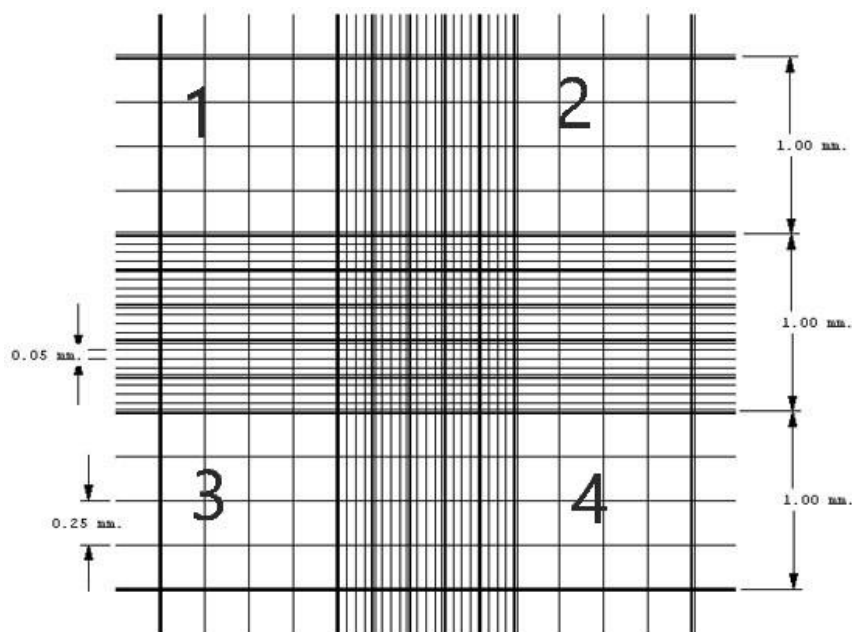


Εικόνα 18. Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer

Η διαδικασία που ακολουθείται για το μέτρημα των κυττάρων είναι η εξής:

- Προσθήκη σε erpendorf 10μl χρωστικής trypan blue 0,4% w/v και 90μl από το εναιώρημα των κυττάρων που συλλέχθηκε αφού πρώτα γίνει καλή ανάμειξή του. Η χρωστική trypan blue είναι μια χρωστική που βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα, γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων.
- Τοποθέτηση περίπου 50μl από το εναιώρημα του erpendorf στην πλάκα Neubauer, αφού γίνει πρώτα καλή ανάμειξη του εναιωρήματος. Το κυτταρικό εναιώρημα με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη πλάκα.
- Μέτρηση των κυττάρων και στα τέσσερα κύρια τετράγωνα που αριθμούνται στην εικόνα 19
- Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα προκύπτει ως εξής:

Συνολικός αριθμός κυττάρων/ml= (Μέτρηση στα 4 κύρια τετράγωνα/4 * 10⁴)



Εικόνα 19. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63511.aspx>

6.4 Πάγωμα κυττάρων

Τα ζωικά κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασίες μεταξύ $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ τα κύτταρα μπορούν, επίσης, να διατηρηθούν αλλά για μικρότερο χρονικό διάστημα. Η αποθήκευση των κυττάρων για ενδεχόμενη μελλοντική χρήση τους εξασφαλίζει τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση και την αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης. Η διαδικασία του παγώματος πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει περίπου το 80% της φλάσκας και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει αφού γίνει συλλογή τους να μετρηθούν σε αιμοκυτταρόμετρο και εφόσον είναι τουλάχιστον 4-5.000.000 ώστε να αποθηκευτούν. Επιπλέον, η διαδικασία του παγώματος θα πρέπει να γίνεται σταδιακά προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού. Επίσης ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους αποφεύγεται με την προσθήκη διμεθυλοσουλφοξιδίου (DMSO).

Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία του παγώματος είναι οι εξής:

- Απόρριψη του παλιού θρεπτικού υλικού.
- Πλύση με 2-3ml PBS.
- Προσθήκη 1-2ml τρυψίνης.
- Επώαση της φλάσκας στον κλίβανο για περίπου 5 λεπτά ώστε να δράσει η τρυψίνη και να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας.
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού, αφού γίνει η αποκόλληση των κυττάρων, ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της τρυψίνης.
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε σωλήνα φυγοκέντρησης.
- Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά.
- Αναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε freezing medium. Το freezing medium αποτελείται από 90%FBS και 10% DMSO. Η ποσότητα του freezing medium που προστίθεται εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων (1ml για κάθε $4 \cdot 10^6$ κύτταρα).
- Τοποθέτηση 1ml freezing medium ανά cryovial.
- Μεταφορά των cryovial για ένα 24ωρο σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη προκειμένου να γίνει σταδιακά η ψύξη, αφού η ισοπροπανόλη είναι ένας οργανικός διαλύτης που ρίχνει τη θερμοκρασία 1 °C ανά λεπτό. Ακολούθως τα cryovial μεταφέρονται στους -80 °C για τουλάχιστον μια μέρα και από εκεί μπορούν να μεταφερθούν στο υγρό άζωτο για μακροχρόνια αποθήκευση.

6.5 *Ξεπάγωμα κυττάρων*

Η διαδικασία του ξεπαγώματος των κυττάρων, σε αντίθεση με τη διαδικασία του παγώματος, είναι μια διαδικασία που πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν γρηγορότερα, διότι το DMSO σε θερμοκρασία δωματίου είναι τοξικό για τα κύτταρα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Μεταφορά των cryovials από τους -80 °C ή το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C όπου αναδεύονται διαρκώς μέχρι να ξεπαγώσουν τα κύτταρα.

- Μεταφορά του περιεχομένου του cryovial, αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, σε σωλήνα φυγοκέντρου.
- Στάγδην προσθήκη θρεπτικού υλικού
- Φυγοκέντρωση του εναιωρήματος στις 900 στροφές για 10 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Αναδιάλυση του κυττάρων σε θρεπτικό υλικό. Τοποθέτηση του εναιωρήματος σε φλάσκα.

7. Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών έγινε τόσο από τις κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν όσο και από τους όγκους των ασθενών που απομονώθηκαν. Όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές η διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να συλλεγούν τα κύτταρα για να ακολουθήσει η λύση τους ήταν παρόμοια με εκείνη της ανακαλλιέργειας των κυττάρων με τις εξής διαφοροποιήσεις:

- Αφού συλλεγούν τα κύτταρα μετά την προσθήκη τρυψίνης προστίθεται θρεπτικό υλικό για να απενεργοποιηθεί η δράση της.
- Καταμέτρηση των κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο. Ο ελάχιστον αριθμός κυττάρων που απαιτούνται είναι 2.000.000 κύτταρα.
- Μεταφορά του εναιωρήματος από τη φλάσκα σε ένα σωλήνα φυγοκέντρου.
- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 10 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Πλύση του ιζήματος με PBS 1x.
- Φυγοκέντρωση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά.
- Επανάληψη της διαδικασίας της πλύσης με PBS 1x άλλες δύο φορές.
- Στέγνωμα του ιζήματος προκειμένου να μην έχει καθόλου υπολείμματα PBS.
- Αποθήκευση των κυττάρων στους -80 °C.

7.1 Λύση κυττάρων

Κατά τη λύση των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Μεταφορά των κυττάρων από τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ στον πάγο προκειμένου να ξεπαγώσουν σταδιακά.
- Προετοιμασία του διαλύματος λύσης. Οι λύσεις έγιναν με το T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent.
- Για την παρασκευή του διαλύματος λύσης χρησιμοποιήθηκαν:

T-PER: πρόκειται για το διάλυμα λύσης το οποίο προστίθεται σε ποσότητα ανάλογη του ιζήματος των κυττάρων, δηλαδή για κάθε 1.000.000 κύτταρα προστίθεται 100μl T-PER ή στην περίπτωση των ιστών προστίθενται 20ml T-PER σε 1g ιστού.

Protease inhibitors: οι αναστολείς πρωτεασών στο διάλυμα λύσης είναι απαραίτητοι προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα της δομής των πρωτεϊνών αφού κατά τη λύση των κυττάρων γίνεται απελευθέρωση των πρωτεασών οι οποίες είναι ένζυμα που υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και έτσι χάνει το μόριο την ενεργότητά του.

Phosphatase inhibitors: οι αναστολείς φωσφατασών στο διάλυμα λύσης προστίθενται προκειμένου να διατηρηθούν τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα των πρωτεϊνών αφού κατά τη λύση των κυττάρων απελευθερώνονται φωσφατάσες οι οποίες είναι ένζυμα που αποφωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες. Οι αναστολείς φωσφατασών, σε αντίθεση με τους αναστολείς πρωτεασών που προστίθενται πάντα στο διάλυμα λύσης, είναι απαραίτητοι κυρίως όταν μελετώνται οι φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών (Πίνακας 1).

Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι οι εξής:

- **Sodium orthovanadate (Na_3VO_4):** πρόκειται για έναν αναστολέα των φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης
- **Sodium pyrophosphate decahydrate:** πρόκειται για έναν αναστολέα των φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης
- **Sodium fluoride:** πρόκειται για έναν αναστολέα των φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης
- **B-Glycerophosphate:** πρόκειται για έναν αναστολέα των φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης

Πίνακας 1. Αναστολείς φωσφατασών που χρησιμοποιήθηκαν για τη λύση των κυττάρων και των ιστών.

	Sodium orthovanadate (Na₃VO₄):	Sodium pyrophosphate decahydrate	Sodium fluoride	B-Glycerophosphate
C_{stock}	200mM	200Mm	1M	200Mm
C_{τελική}	1mM	1Mm	10Mm	1Mm

- Τα παραπάνω αντιδραστήρια προστέθηκαν σε κατάλληλες ποσότητες σε ένα erpendorf και ακολούθησε ανάμειξή τους με τον αναδευτήρα vortex.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από το διάλυμα λύσης στο ίζημα των κυττάρων και αναδιάλυση του ιζήματος
- Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε erpendorf. Διατήρηση των erpendorf σε πάγο προκειμένου να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών.
- Το διάλυμα λύσης αφήνεται να δράσει για 30 λεπτά. Στο διάστημα αυτό ανά διαστήματα 5 λεπτών τα erpendorf με τα λύματα αναδεύονται στη συσκευή vortex. Καθόλη τη διάρκεια της επώασης με το διάλυμα λύσης τα κύτταρα βρίσκονται σε πάγο.
- Μετά το πέρας του μισάωρου ακολουθεί sonication 3 κύκλων διάρκειας 10sec η καθεμία συγκεκριμένης συχνότητας εν ψυχρώ, δηλαδή, καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας τα erpendorf με τα λύματα είναι τοποθετημένα σε πάγο. Η μέθοδος των υπερήχων αποτελεί μια από τις ισχυρές μεθόδους μηχανικής διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων.
- Φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και επαναφυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.
- Έλεγχος της καθαρότητας του υπερκείμενου. Αν το υπερκείμενο εξακολουθεί να μην είναι διαυγές, τότε επαναλαμβάνεται η διαδικασία των φυγοκεντρήσεων και των υπερήχων μέχρι να καταλήξουμε σε διαυγές πρωτεϊνικό λύμα. .
- Αποθήκευση του πρωτεϊνικού λύματος στους -80 °C.

7.2 *Λύση όγκων προερχόμενων από ασθενείς*

Οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτεϊνών προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος (πρωτοπαθείς όγκοι), αλλά και από ασθενείς με δευτεροπαθείς όγκους σε άλλα όργανα (μεταστατικοί) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Για τη λύση των όγκων η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Ζύγισμα 0,03g ιστού.
- Τοποθέτηση του όγκου σε plate, τεμαχισμός και πολτοποίησή του.
- Μεταφορά του τεμαχισμένου ιστού σε σωλήνα τύπου erpendorf
- Προσθήκη 50 μl από το διάλυμα λύσης και ομογενοποίηση.
- Προσθήκη 550 μl από το διάλυμα λύσης
- Επώαση με το διάλυμα λύσης για 30 λεπτά. Στο χρόνο αυτό γίνεται ανά διαστήματα 5 λεπτών ανάδευση σε συσκευή vortex. Καθόλη τη διάρκεια της επώασης με το διάλυμα λύσης τα λύματα βρίσκονται σε πάγο.
- Μετά το πέρας του μισάωρου ακολουθεί sonication 3 κύκλων διάρκειας 10sec η καθεμία συγκεκριμένης συχνότητας εν ψυχρώ, δηλαδή καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας τα erpendorf με τα λύματα είναι τοποθετημένα σε πάγο. Η μέθοδος των υπερήχων αποτελεί μια από τις ισχυρές μεθόδους μηχανικής διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και επαναφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- Έλεγχος της καθαρότητας του υπερκείμενου. Αν το υπερκείμενο εξακολουθεί να μην είναι διαυγές, τότε επαναλαμβάνεται η διαδικασία των sonication και των φυγοκεντρήσεων για όσο χρειαστεί.
- Αποθήκευση του πρωτεϊνικού λύματος στους -80 °C.

8. Μέθοδος Bradford και φωτομέτρηση

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης που περιέχεται σε ένα διάλυμα. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία

χρησιμοποιήθηκε το Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Η αντίδραση βασίζεται στην αναγωγή του Cu^{2+} σε Cu^+ από τις πρωτεΐνες. Η ποσότητα του αναγόμενου Cu είναι ανάλογη με την ποσότητα των πρωτεϊνών που περιέχονται στο διάλυμα. Στη συνέχεια δύο μόρια δικιγchonικού οξέος (BCA) αντιδρούν με κάθε μόριο Cu^+ μεταβάλλοντας το χρώμα του διαλύματος σε μωβ το οποίο απορροφά στα 562nm.

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford είναι απαραίτητη η πρότυπη καμπύλη. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις ενός διαλύματος αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια τα δείγματα με άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης φωτομετρούνται και οι τιμές των απορροφήσεων τους αντιστοιχίζονται με εκείνες των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

➤ Διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης.

Οι αραιώσεις έγιναν με το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε και για τη λύση των κυττάρων και των ιστών. Αυτό γίνεται προκειμένου οι συνθήκες αραιώσης του διαλύματος της αλβουμίνης να είναι ίδιες με τις συνθήκες αραιώσης των δειγμάτων μας.

Στον πίνακα 2 φαίνεται η διαδικασία δημιουργίας των διαδοχικών αραιώσεων της αλβουμίνης:

Πίνακας 2: Διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης

2mg/ml	10μl από stock
1,5mg/ml	75μl από 2mg/ml + 25μl lysis buffer
1mg/ml	60μl από 1,5mg/ml + 30μl lysis buffer
0,75mg/ml	60μl από 1mg/ml + 20μl lysis buffer
0,5mg/ml	40μl από 0,75mg/ml + 20μl lysis buffer
0,25mg/ml	20μl από 0,5mg/ml + 20μl lysis buffer

0,125mg/ml	10μl από τη συγκέντρωση 0,25mg/ml + 10μl lysis buffer
-------------------	---

- Σε πιάτο 96 οπών εισάγονται 10μl από τις διαδοχικές αραιώσεις και τα προς ανάλυση δείγματα. Συγκεκριμένα, εισάγονται 5μl PBS 1x και 5μl δείγματος και ακολουθεί καλή ανάδευσή τους.
- Τέλος, προστίθεται το αντιδραστήριο Bradford το οποίο αποτελείται από:
 - BCA αντιδραστήριο A
 - BCA αντιδραστήριο B

Η αναλογία των δύο αντιδραστηρίων είναι A/B=50/1. Γίνεται καλή ανάδευση του μείγματος.

Το μείγμα των δύο αντιδραστηρίων προστατεύεται από το φως, διότι είναι φωτοευαίσθητο. Ακολουθεί η προσθήκη 200μl από το αντιδραστήριο Bradford σε κάθε οπή. Αναδεύουμε καλά προσέχοντας όμως το σχηματισμό φυσαλίδων.

- Αφού τοποθετηθεί το αντιδραστήριο Bradford ακολουθεί τοποθέτηση του πιάτου 96 οπών για επώαση στον κλίβανο για 30 λεπτά. Στο χρονικό διάστημα της επώασης παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του αντιδραστηρίου από ανοιχτό πράσινο σε μωβ.
- Μετά το πέρας της επώασης το πιάτο 96 οπών αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά υπό ανάδευση.
- Φωτομέτρηση στα 540nm.
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των δειγμάτων με βάση την πρότυπη καμπύλη και την απορρόφηση των δειγμάτων.

9. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και Western Blotting

Η μέθοδος του ανοσοαποτυπώματος κατά Western είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά

από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.

Η ηλεκτροφόρηση, αποτελεί μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δεοξυριβονουκλεϊκών, ριβονουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνικών μορίων με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος. Η ταχύτητα μετακίνησης του μορίου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από: την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f): $U = Ez/f$. Η σταθερά της τριβής εξαρτάται από την μάζα και το σχήμα του μορίου, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου που μετακινείται. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται σε πηκτή η οποία λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμότερες για ηλεκτροφόρηση, καθώς έχουν μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, οπότε, επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου ρυθμίζονται οι πόροι του πηκτώματος.

Σε μια SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται με βάση τη μοριακή τους μάζα αφού έχουν την ίδια πυκνότητα φορτίου. Το μείγμα των πρωτεϊνών διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS) το οποίο είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο με τις μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες παραμένουν κοντά στο σημείο εκκίνησης.

9.1 Προετοιμασία πηκτώματος

Στις περισσότερες περιπτώσεις, όπως και στην παρούσα διπλωματική εργασία, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, επιτελείται δηλαδή σε δύο διαφορετικά πηκτώματα. Το ένα πήκτωμα ονομάζεται πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) και είναι μικρότερου μεγέθους σε σχέση με το άλλο πήκτωμα, έχει πυκνότητα 5% και είναι περισσότερο όξινο (pH=6,8). Επιτρέπει στις πρωτεΐνες να συγκεντρωθούν σε μια καλά στοιβαγμένη ζώνη ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα

στο τζελ διαχωρισμού. Το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) έχει υψηλότερο (pH=8,8) και η πυκνότητά του διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μελετηθούν. Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρασκευάστηκε resolving gel 12% και stacking gel 5% όπως φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 3. Συστατικά και ποσότητες stacking και resolving gel.

Stacking gel 5%	Resolving gel 12%
<ul style="list-style-type: none"> ○ 5,7 ml Dh2O ○ 2,5ml Tris-Cl ○ 1,7ml acrylamide ○ 0,1ml SDS ○ 10μl TEMED ○ 50μl APS 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3,4 ml Dh2O ○ 2,5ml Tris-Cl ○ 4ml acrylamide ○ 0,1ml SDS ○ 5μl TEMED ○ 50μl APS

- Προσθέτουμε σε ένα σωλήνα φυγοκέντρου με την εξής σειρά τα συστατικά του resolving όπως αναγράφονται στον πίνακα. Το TEMED και APS προστίθενται στο τέλος, καθώς αυτά είναι που προκαλούν τον πολυμερισμό και συνεπώς την πήξη των gel.
- Ακολουθεί πολύ ήπια ανάδευση του μείγματος.
- Αποχύνουμε το διάλυμα διαχωρισμού (resolving gel) στα ειδικά τζαμάκια της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Μετά προσθέτουμε λίγο νερό προσεκτικά ώστε να μην αφυδατωθεί το gel.
- Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος προετοιμάζουμε το διάλυμα του πακεταρίσματος (stacking gel) προσθέτοντας τις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 3.
- Απομακρύνουμε το νερό που είχαμε τοποθετήσει πάνω από το resolving gel.
- Προσθέτουμε το stacking gel καθώς και κατάλληλο χτενάκι με τη βοήθεια του οποίου θα σχηματιστούν τα πηγαδάκια.
- Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του stacking gel απομακρύνουμε το χτενάκι.
- Ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια.

9.2 Προετοιμασία δειγμάτων

- Τοποθέτηση των κυτταρικών λυμάτων από τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε πάγο προκειμένου να ξεπαγώνουν σταδιακά.
- Προετοιμασία loading buffer. Η σύσταση του loading buffer είναι:
 - **Γλυκερόλη:** πρόκειται για ένα παχύρευστο υγρό που έχει αυξημένο ιξώδες και βοηθάει το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγαδάκια της συσκευής
 - **SDS 20%:** πρόκειται για ένα ανιοντικό συστατικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες και αφενός καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης αφετέρου προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες προκειμένου να μετακινηθούν όλες μαζί από την άνοδο προς την κάθοδο
 - **Tris-Cl 0,5M:** πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα
 - **Μπλε της βρωμοφαινόλης:** πρόκειται για έναν δείκτη ο οποίος χρησιμοποιείται προκειμένου να παρακολουθήσουμε το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης
 - **B-μερκαπτοαιθανόλη:** ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταστρέφει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Προστίθεται στον απαγωγό, διότι είναι πολύ πτητική.
- Καλή ανάδευση του loading buffer με τον αναδευτήρα vortex.
- Προσθήκη σε erpendorf κατάλληλης ποσότητας PBS για κάθε δείγμα.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας δείγματος. Οι ποσότητες του PBS και του δείγματος που προστίθενται έχουν υπολογιστεί από την επεξεργασία μετά τη Bradford και τη φωτομέτρηση των δειγμάτων. Αυτό γίνεται προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι σε κάθε πηγαδάκι της συσκευής θα έχουμε φορτώσει την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας loading buffer. Η προσθήκη γίνεται στον απαγωγό.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά. Το στάδιο αυτό του βρασμού βοηθά στην αποδιάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.
- Μετά το πέρας των 5 λεπτών τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο προκειμένου να υγροποιηθούν οι υδρατμοί που έχουν σχηματιστεί και να μην έχουμε απώλεια ποσότητας.
- Βραχεία φυγοκέντρηση των δειγμάτων.

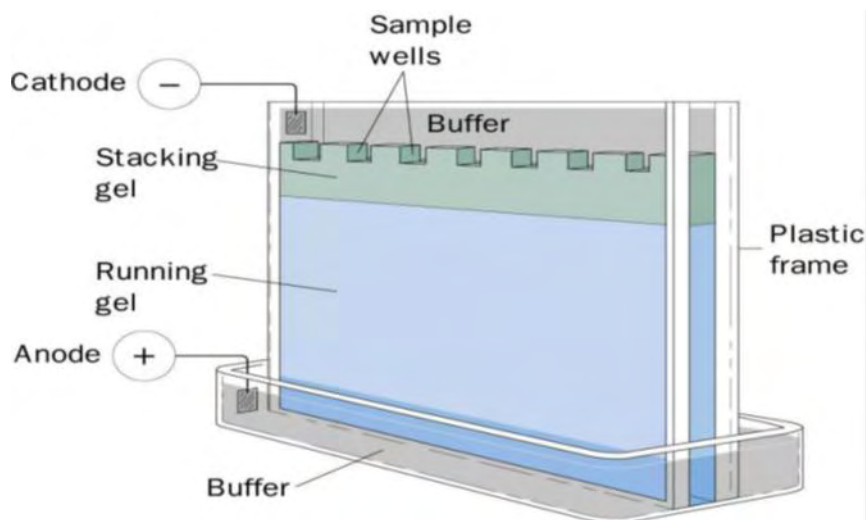
9.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

- Τοποθέτηση του πήκτωματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) (Εικόνα 22). Το running buffer 10x περιέχει:

- 144 gr γλυκίνη
- 30,3gr Tris Base
- 10gr SDS
- dH₂O

Ακολούθως παρασκευάζεται το running buffer 1x το οποίο περιέχει:

- 100ml Running buffer 10x
 - 900ml dH₂O
- Φόρτωση του πρωτεϊνικού μάρτυρα (protein ladder) στις δύο ακριανές θέσεις του πήκτωματος.
 - Ηλεκτροφόρηση στα 100V για περίπου 10 λεπτά όσο το πρωτεϊνικό μέτωπο βρίσκεται μέσα στο πήκτωμα πακεταρίσματος. Διπλασιασμός της τάσης στα 200V.



Εικόνα 20. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης

http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm

9.4 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών (ανοσοαποτύπωση)

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Η μεμβράνη πρέπει να βρίσκεται σε επαφή με το πήκτωμα ώστε να δημιουργηθεί σε αυτή ένα αποτύπωμα των πρωτεϊνών του πηκτώματος. Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται ισχυρά στη μεμβράνη, κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα.

- Προετοιμασία του διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer). Το transfer buffer παρασκευάζεται με συγκέντρωση 10x και περιέχει:
 - 144gr γλυκίνη
 - 30,3gr Trizma
 - dH₂O

Ακολούθως παρασκευάζεται το transfer buffer 1x το οποίο περιέχει:

- 100ml Transfer buffer 10x
 - 200ml Μεθανόλη
 - 700 ml dH₂O
- Κόψιμο της μεμβράνης PVDF σε διαστάσεις 9x6 cm
 - Τοποθέτηση της μεμβράνης σε μεθανόλη για 5 λεπτά υπό ανάδευση, με σκοπό η μεμβράνη να αποκτήσει υδρόφιλες ιδιότητες.
 - Απομάκρυνση της μεθανόλης και τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα σε transfer buffer για 20 λεπτά υπό ανάδευση με σκοπό την εξισορρόπηση της μεμβράνης.
 - Μόλις τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, αφαιρούνται τα τζαμάκια, και κόβεται προσεκτικά το staining gel έτσι ώστε να απομονωθεί μόνο το resolving gel.
 - Τοποθέτηση του gel μέσα σε transfer buffer.
 - Στο «θετικό» τμήμα της συσκευής blot-«κασέτα», τοποθετούνται με τη σειρά τα παρακάτω:
 - Σφουγγαράκι εμποτισμένο με κρύο transfer buffer
 - 1 χαρτί Whattmann
 - Gel

- PVDF
 - Ιχαρτί Whattmann εμποτισμένο με κρύο transfer buffer
 - Σφουγγαράκι εμποτισμένο με κρύο transfer buffer
- Απομάκρυνση τυχόν εγκλωβισμένων φυσαλίδων μεταξύ του gel και της PVDF.
 - Κλείσιμο της κασέτας και τοποθέτησή της μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τον αρνητικό πόλο προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Η συσκευή, βρίσκεται μέσα σε πάγο για να μην αυξηθεί η θερμοκρασία και γεμίζεται με transfer buffer.
 - Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 100V μέχρι αύξησης των mA κατά εκατό μονάδες.

9.5 *Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων*

- Το διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer), χρησιμοποιείται με σκοπό τη μείωση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και του αντισώματος με το οποίο θα επωαστεί η μεμβράνη. Το μπλοκάρισμα γίνεται με επώαση για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση στο rocker. Το διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking buffer) TTBS 5%, περιέχει 5% FBS μαζί με TTBS 1x. Το TTBS 1x φτιάχνεται ως εξής:
 - Tween 20
 - 0,9% NaCl
 - 50ml Tris-Cl 1M

Gel staining/destaining

- Το gel τοποθετείται μέσα σε Coomassie για 1h, προκειμένου να διαπιστωθεί αν πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η μεταφορά των πρωτεϊνών.
- Στη συνέχεια το gel τοποθετείται μέσα σε διάλυμα αποχρωματισμού.

9.6 *Δέσμευση πρωτογενούς αντισώματος*

- Αφαίρεση της μεμβράνης από το διάλυμα μπλοκαρίσματος και προσθήκη του πρώτου αντισώματος. Τα αντισώματα αραιώνονται σε διάλυμα TTBS 5% FBS. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται παρακάτω (πίνακας 4):

Πίνακας 4. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους.

Αντίσωμα	Συγκέντρωση
c-Myc (N-262): sc-764	1/200
Phospho-c-Myc (Ser62) (E1J4K) Rabbit mAb Cell Signaling	1/200
Phospho-c-Myc (Thr58) Polyclonal Antibody (PA5-36673) ThermoFisher Scientific	1/200
GSK3-b (D5C5Z) Cell Signaling	1/1000
Phospho-GSK3-b (Ser9) (D85E12) Cell Signaling	1/1000

- Επώαση καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C υπό ανάδευση.
- Έκπλυση της μεμβράνης με TTBS 1x για 10 λεπτά υπό ανάδευση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος. Προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι έχουμε φορτώσει την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης μεταξύ των δειγμάτων, μελετάται το ποσό της έκφρασης μίας κατηγορίας πρωτεϊνών οι οποίες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς πάντα και η έκφρασή τους δεν επηρεάζεται από κάποια παθολογική κατάσταση (Housekeeping proteins). Έτσι ελέγχεται το ποσοστό έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών σε κάθε δείγμα, ώστε να επιβεβαιωθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH, η β-ακτίνη και ο DJ-1. Το μοριακό βάρος του GAPDH είναι 37kDa με προτεινόμενη αραιώση 1/5000, της ακτίνης 42kDa με προτεινόμενη αραιώση 1/10000 και του DJ-1 23kDa με προτεινόμενη αραιώση 1/1000 .

9.7 Δέσμευση δευτερογενούς αντισώματος

- Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα ακολουθούν 3 πλύσεις με TTBS 1x
- Προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος αραιωμένο σε TTBS 5% FBS. Το δεύτερο αντίσωμα το οποίο προσδένεται στις σταθερές αλυσίδες του πρώτου αντισώματος φέρει προσδεμένο ένα ένζυμο, την υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase- HRP). Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του σήματος που λαμβάνεται από την ανίχνευση της υπό μελέτης πρωτεΐνης.
- Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν είτε anti-mouse είτε anti-rabbit ανάλογα με την προέλευση του πρώτου αντισώματος. Και τα δύο δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1/6000. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθούν 3 πλύσεις με TTBS 1x προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος.

9.8 Εμφάνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-αντισώματος με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας

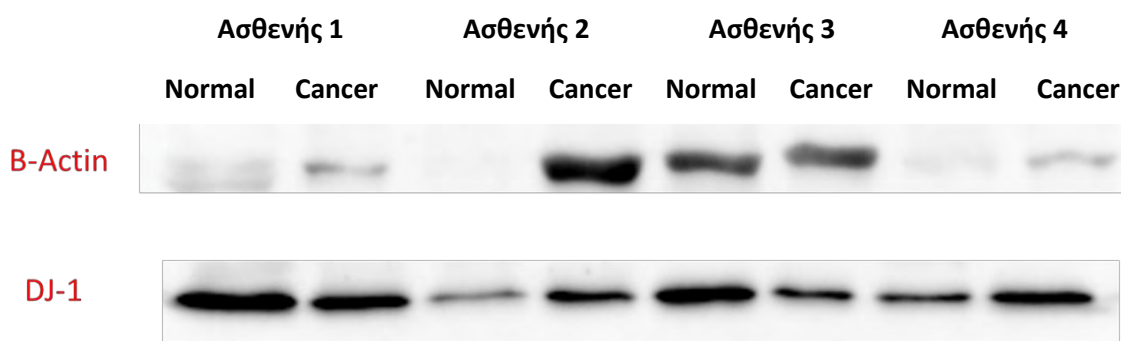
Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η εμφάνιση των προσδεδεμένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα λουμινόλης, κουμαρικού οξέος και υπεροξειδάσης. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξειδίο δημιουργώντας 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, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική συσκευή (Uvitec Cambridge) και εκτίθεται σε ακτινοβολία UV. Τα αποτελέσματα ψηφιοποιούνται και μεταφέρονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Alliance. Στο λογισμικό Alliance ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων.

- Προσθήκη του διαλύματος επώασης ECL πάνω στη μεμβράνη για 5 λεπτά

- Τοποθέτηση της μεμβράνης σε ειδική πλάκα και τοποθέτηση της πλάκας στο μηχάνημα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

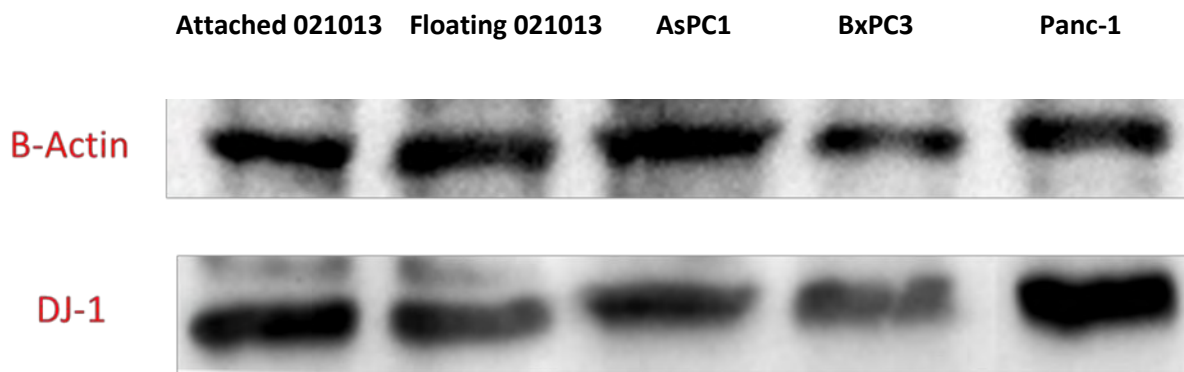
A. Μελέτη της ιδιοστατικής έκφρασης των γονιδίων *b-actin*, *GAPDH* και *DJ-1* σε ιστούς ασθενών από πάγκρεας, καθώς και σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.



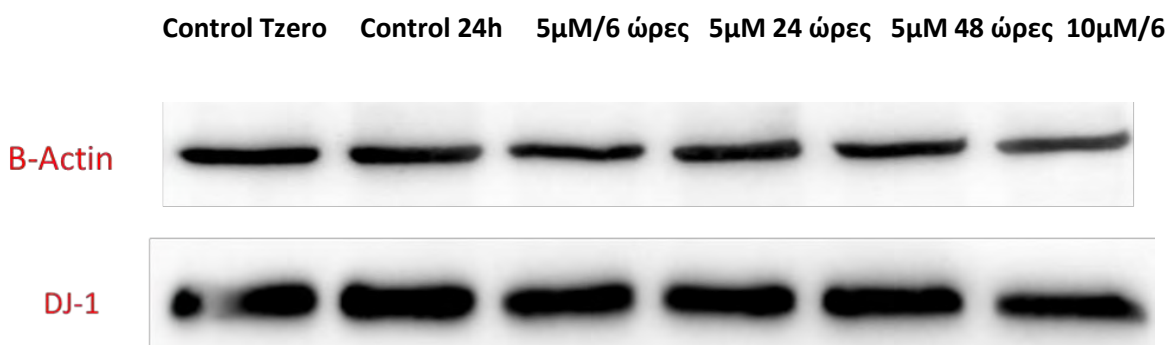
Εικόνα 21. Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών b-ACTIN και DJ-1 σε πρωτογενείς όγκους για ζεύγη φυσιολογικού και καρκινικού ιστού (Normal, Cancer) ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος.

Από την εικόνα 21 φαίνεται πως το γονίδιο αναφοράς DJ-1 βρίσκεται σε συμφωνία με τη χρωματομετρική μέθοδο ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford) σε αντίθεση με τη B-ACTIN η οποία εμφανίζει σημαντικές διαφορές στην ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης μεταξύ των δειγμάτων. Η ίδια ασυμφωνία παρατηρήθηκε και με το γονίδιο GAPDH (δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα) Για το λόγο αυτό το γονίδιο DJ-1 χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μας.

Λόγω της μεγάλης ασυμφωνίας τόσο του GAPDH όσο και της β-ακτίνης με τη μέθοδο Bradford και της μη σταθερής έκφρασής τους στους διαφορετικούς παγκρεατικούς ιστούς ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασής τους και σε παγκρεατικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνονται στην εικόνα 22:



Εικόνα 22. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες *b-ACTIN* και *DJ-1* σε παγκρεατικές κυτταρικές σειρές πρωτογενείς (*Attached 021013*, *Floating 021013*) και εγκαθιδρυμένες (*AsPC1*, *BxPC3*, *Panc-1*).



Εικόνα 23. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες *b-ACTIN* και *DJ-1* σε παγκρεατικές κυτταρικές σειρές πρωτογενείς μετά από χρονοεξαρτώμενες και δοσοεξαρτώμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου.

Σύμφωνα με τις εικόνες 22 και 23 παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων αναφοράς *b-Actin* και *DJ-1* παρουσίασε ελάχιστες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών παγκρεατικών καρκινικών σειρών, ενώ καμία διαφορά στην έκφρασή τους δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της ίδιας καρκινικής κυτταρικής σειράς υπό διαφορετικές χρονοεξαρτώμενες και δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις φαρμάκου. Συνεπώς, φαίνεται ότι η επιλογή του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς σε κάθε περίπτωση μπορεί να είναι διαφορετική και θα πρέπει να γίνεται με πολλή προσοχή.

B. Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών c-MYC (total), phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), phospho GSK3-b, total GSK3-b σε πρωτογενείς παγκρεατικούς όγκους.

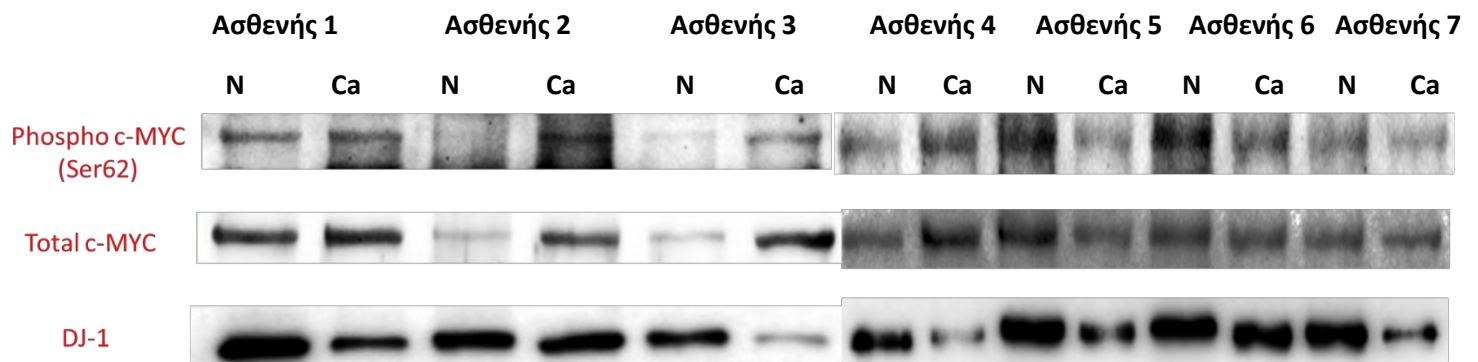
Η έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών μελετήθηκε σε πρωτογενείς όγκους παγκρέατος προερχόμενους από ασθενείς. Από κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκε ζεύγος καρκινικού ιστού (Cancer), και φυσιολογικού παρακείμενου ιστού (Normal). Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5) φαίνονται κάποια χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως καταγράφηκαν από τους χειρουργούς, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Η πλειοψηφία των όγκων εντοπίζονται στην κεφαλή του παγκρέατος και είναι αδενοκαρκινώματα. Από το σύνολο των επτά ασθενών οι ασθενείς 3 και 4 εμφάνισαν μετάσταση στο ήπαρ, ενώ στους ασθενείς 1, 5 και 7 εντοπίστηκαν ύποπτοι λεμφαδένες.

Πίνακας 5. Δείγματα προερχόμενα από παγκρεατικούς όγκους ασθενών και χαρακτηριστικά τους.

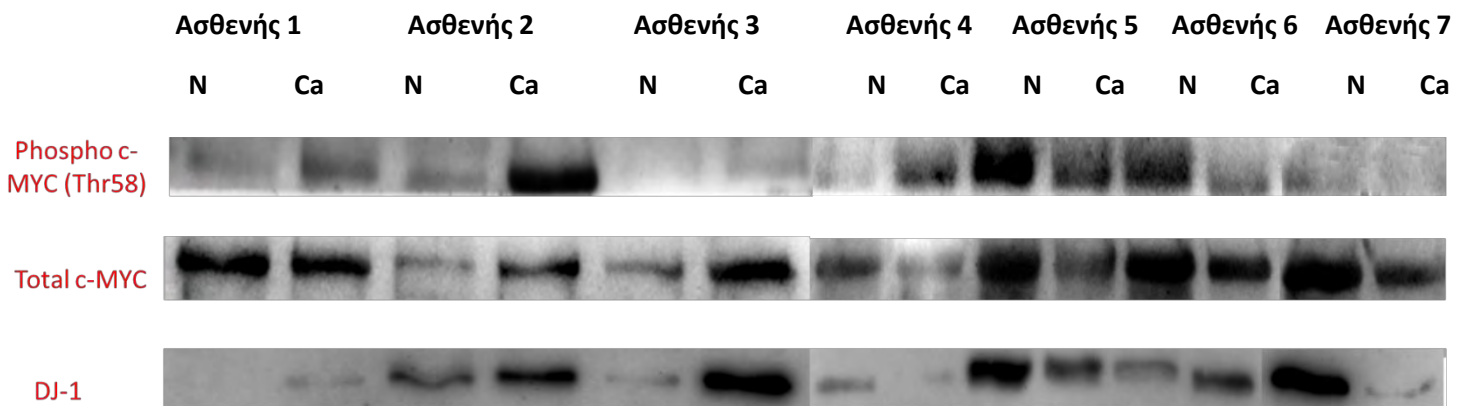
	Φύλο	Ηλικία	Εντόπιση	Ηπατικές βλάβες	Ύποπτοι λεμφαδένες	Διήθηση παρακείμενων οργάνων	Ύποπτες οστικές μεταστάσεις	Ιστολογική
Ασθενής 1 (Patient 1)	Άρρεν	71	Κεφαλή/αγκιστροειδής απόφυση	Όχι	Παρουσία (ολιγάριθμοι)			Αδενοκαρκίνωμα
Ασθενής 2 (Patient 2)	Άρρεν	64						Αδενοκαρκίνωμα
Ασθενής 3 (Patient 3)	Άρρεν	85	Ουρά	Παρουσία		Παρουσία		Αδενοκαρκίνωμα
Ασθενής 4 (Patient 4)	Άρρεν	64	Κεφαλή/αγκιστροειδής απόφυση	Παρουσία	Παρουσία (ολιγάριθμοι περιπαγκρεατικοί)	Παρουσία	Παρουσία	Αδενοκαρκίνωμα

Ασθενής 5 (Patient 5)	Άρρεν	65	Κεφαλή/αγκιστροειδής απόφυση		Παρουσία		Παρουσία	Αδενοκαρκίνωμα
Ασθενής 6 (Patient 6)	Άρρεν							
Ασθενής 7 (Patient 7)	Άρρεν	77	Κεφαλή/αγκιστροειδής απόφυση		Παρουσία		Παρουσία	Αδενοκαρκίνωμα

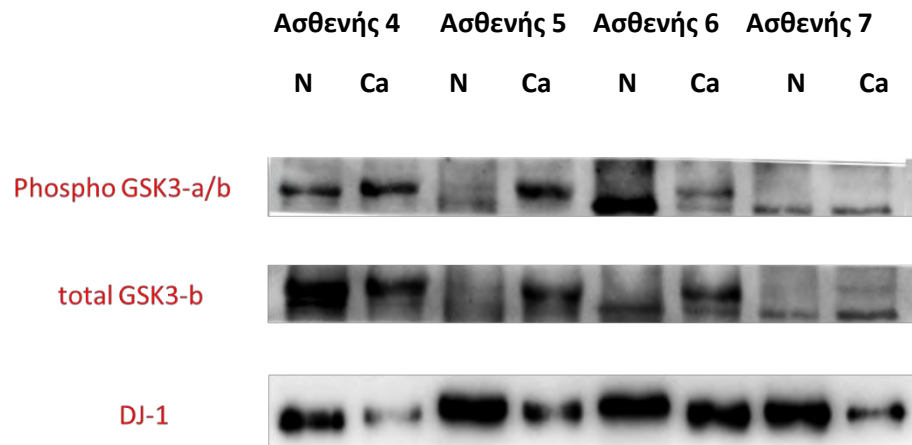
Ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών c-MYC (total), phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), GSK3-b (total), phospho GSK3-b (Ser9) στα παραπάνω επτά ζεύγη παγκρεατικών ιστών. Τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.



Εικόνα 23. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες total c-MYC και phospho c-MYC (Ser62) για κάθε ζευγάρι ασθενούς (N=Normal, Ca=Cancer). Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η housekeeping πρωτεΐνη DJ-1.



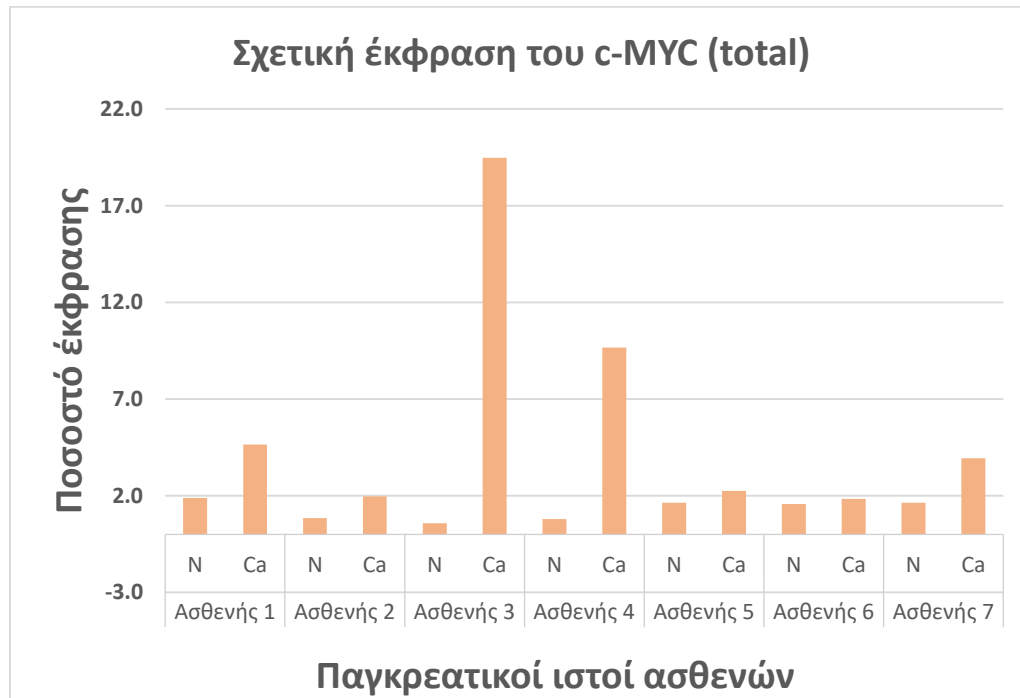
Εικόνα 25. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες total c-MYC και phospho c-MYC (Thr58) για κάθε ζευγάρι ασθενούς (N=Normal, Ca=Cancer). Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η housekeeping πρωτεΐνη DJ-1.



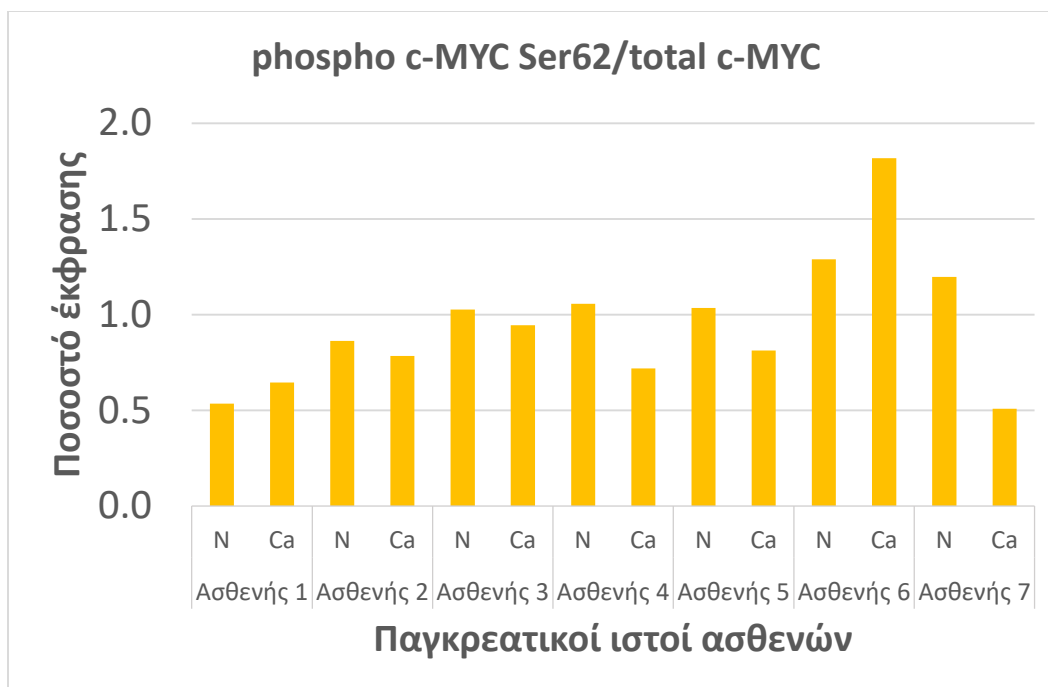
Εικόνα 26. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες phospho GSK3a/b και GSK3a/b για κάθε ζευγάρι ασθενούς (N=Normal, Ca=Cancer). Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η housekeeping πρωτεΐνη DJ-1.

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών και να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Image J με τη βοήθεια του οποίου υπολογίζεται το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης με βάση την ένταση και το μέγεθος της εκάστοτε λωρίδας δείγματος.

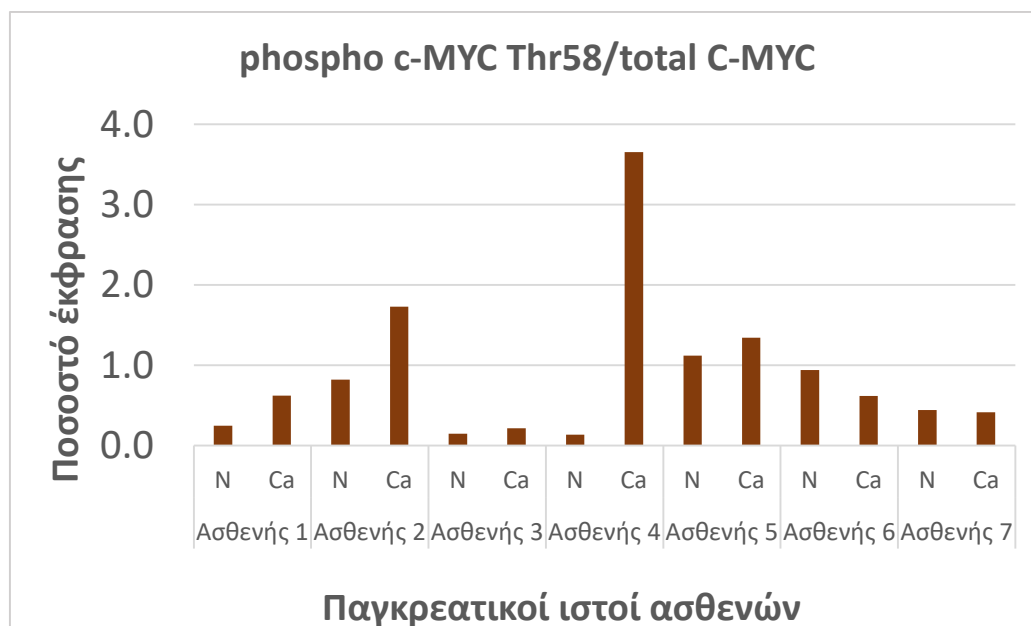
Όσο μεγαλύτερη και εντονότερη η λωρίδα τόσο μεγαλύτερο και το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων του total c-MYC γίνεται διαίρεση μεταξύ της πρωτεΐνης που μελετάται και του DJ-1 για το πρώτο δείγμα (κανονικοποίηση). Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα. Οι τιμές από την παραπάνω κανονικοποίηση τοποθετούνται σε ραβδόγραμμα και έτσι γίνεται η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων.



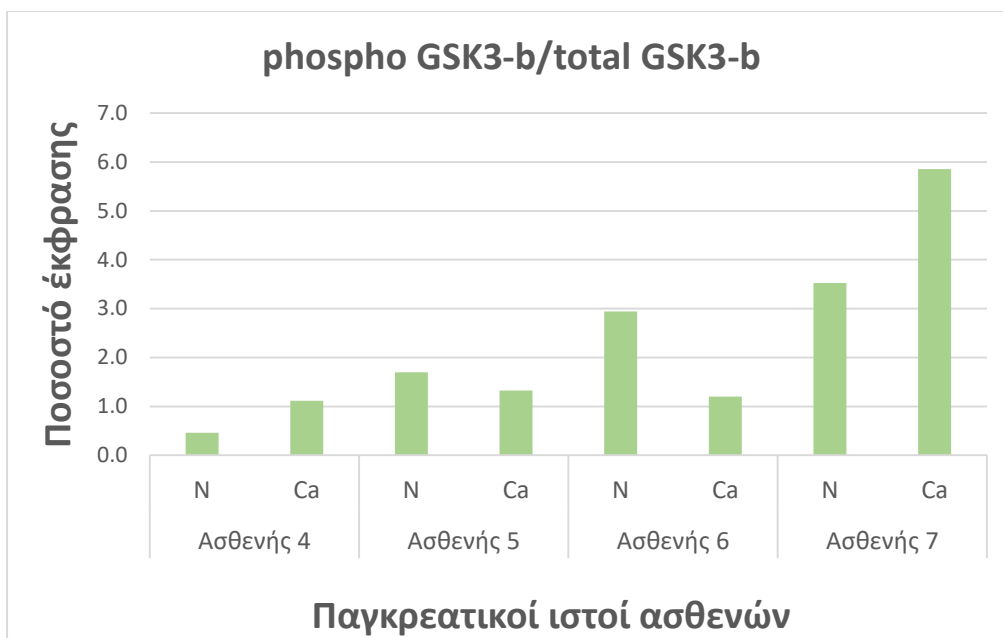
Γράφημα 1. Σχετική έκφραση του total c-MYC στα 7 ζευγάρια παγκρεατικών ιστών των ασθενών (N=Normal, Ca=Cancer).



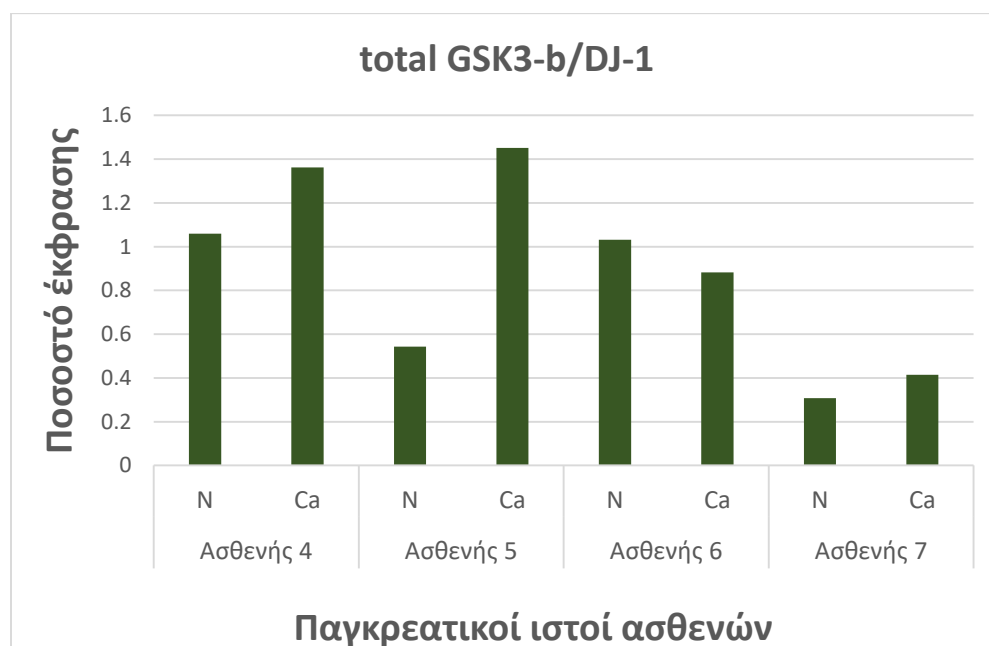
Γράφημα 2. Σχετική έκφραση του phospho c-MYC (Ser62) στα 7 ζευγάρια παγκρεατικών ιστών των ασθενών (N-Normal, Ca=Cancer). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής υπολογίστηκαν ως προς τη συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης total c-MYC.



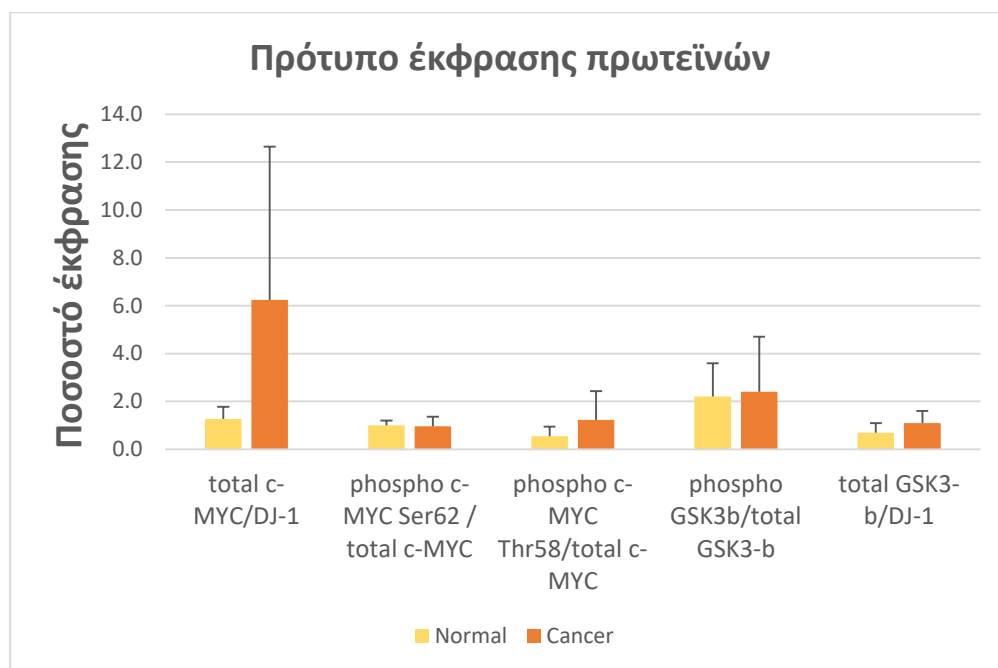
Γράφημα 3. Σχετική έκφραση του phospho c-MYC (Thr58) στα 7 ζευγάρια παγκρεατικών ιστών των ασθενών (N=Normal, Ca=Cancer). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής υπολογίστηκαν ως προς τη συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης total c-MYC.



Γράφημα 4. Σχετική έκφραση της phospho GSK3-b στα 4 ζευγάρια παγκρεατικών ιστών των ασθενών (N=Normal, Ca=Cancer). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής υπολογίστηκαν ως προς τη συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης total GSK3-b.



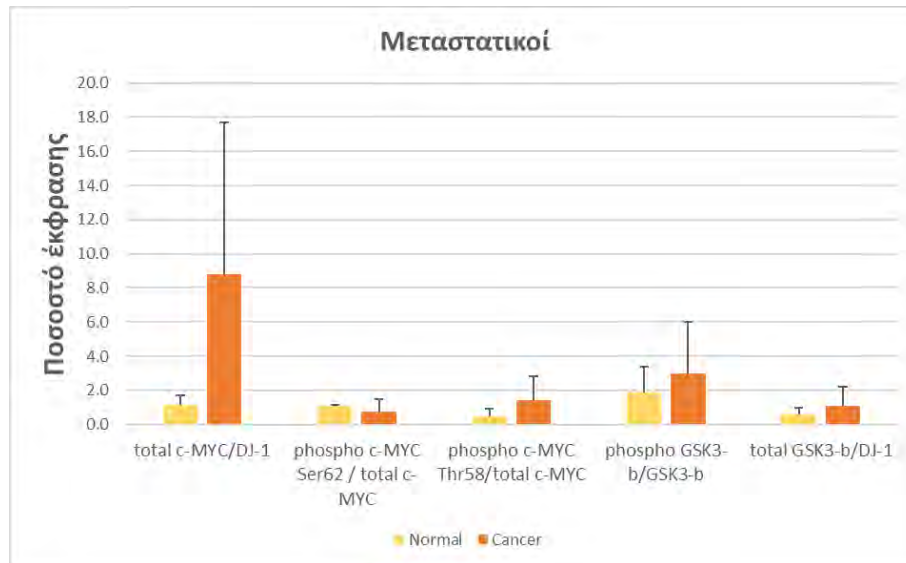
Γράφημα 5. Σχετική έκφραση της total GSK3-b στα 4 ζευγάρια παγκρεατικών ιστών των ασθενών (N=Normal, Ca=Cancer). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής υπολογίστηκαν ως προς το DJ-1.



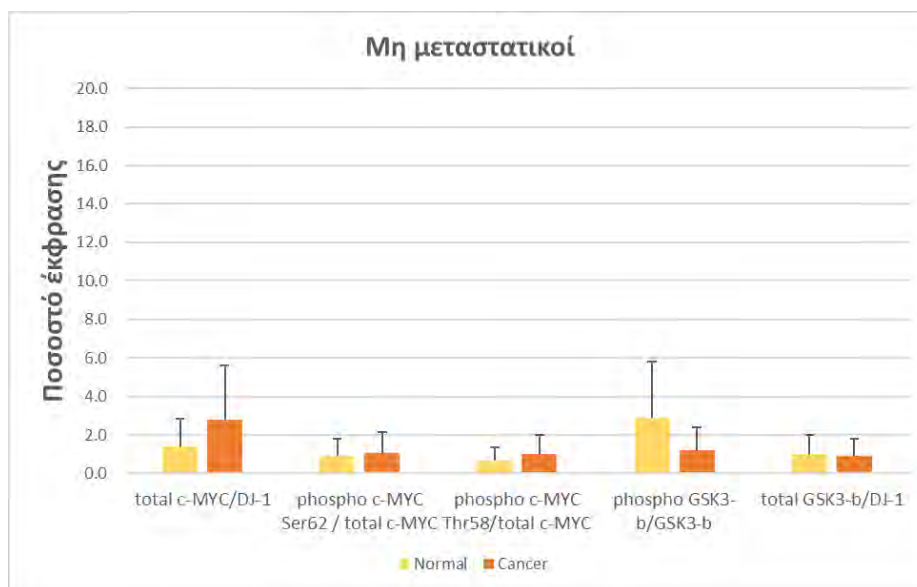
Γράφημα 6. Σχετική έκφραση των πρωτεϊνών total c-MYC, phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), phospho GSK3-b, total GSK3-b στο σύνολο των φυσιολογικών παγκρεατικών ιστών σε σύγκριση με τους καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς.

Συγκεντρωτικά, σημαντική υπερέκφραση του total c-MYC παρατηρείται στους καρκινικούς ιστούς, ενώ καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στους φυσιολογικούς ιστούς (γράφημα 1). Η υπερέκφραση αυτή τείνει στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($t\text{-test}=0,07$). Αντιθέτως, η έκφραση των δύο φωσφορυλιωμένων μορφών του c-MYC δε διέφερε μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών (γράφημα 2,3). Τέλος, η έκφραση των πρωτεϊνών phospho GSK3-b και GSK3-b δε φάνηκε να ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών, ενώ όποιες διαφορές παρατηρήθηκαν δε φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικές (γράφημα 4,5).

Ακολούθησε διαχωρισμός του συνόλου των ασθενών σε μεταστατικούς (ασθενείς 3, 4, 5, 7) και μη μεταστατικούς (1, 2, 6) προκειμένου να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών (γράφημα 7,8).



Γράφημα 7. Σχετική έκφραση των πρωτεϊνών total c-MYC, phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), phospho GSK3-b, total GSK3-b στο σύνολο των φυσιολογικών παγκρεατικών ιστών σε σύγκριση με τους καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς των ασθενών με μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο.



Γράφημα 8. Σχετική έκφραση των πρωτεϊνών total c-MYC, phospho c-MYC (Ser62), phospho c-MYC (Thr58), phospho GSK3-b, total GSK3-b στο σύνολο των φυσιολογικών παγκρεατικών ιστών σε σύγκριση με τους καρκινικούς παγκρεατικούς ιστούς των ασθενών με μη μεταστατικό παγκρεατικό καρκίνο.

Από τα γραφήματα 7 και 8 φαίνεται ότι υπάρχει υπερέκφραση του c-MYC και στις δύο ομάδες ασθενών με τη μεγαλύτερη στους μεταστατικούς ασθενείς (έως και 9 φορές περισσότερη). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης των υπόλοιπων πρωτεϊνών δεν εμφάνισαν κάποια διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών. Ωστόσο, για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της phospho GSK3-β και GSK3-β χρησιμοποιήθηκαν μόνο τέσσερα από τα επτά δείγματα των ιστών με αποτέλεσμα να μην είναι απόλυτα αντιπροσωπευτική αυτή η ανάλυση για την έκφρασή τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος αποτελεί μεγάλη μάστιγα στις μέρες μας αποτελώντας τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Σύμφωνα με το NCI ο αριθμός των νέων περιστατικών καρκίνου ανά έτος αναμένεται να ξεπεράσει τα 23,6 εκατομμύρια παγκοσμίως μέχρι το 2030. Παρά την ανάπτυξη πολλών θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, πολλοί τύποι καρκίνου παρουσιάζουν μεγάλη θνησιμότητα. Στην κατηγορία αυτών των τύπων καρκίνου συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος του παγκρέατος.

Ο παγκρεατικός καρκίνος κατατάσσεται σε έναν από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους αποτελώντας την τρίτη αιτία θανάτου στο σύνολο των θανάτων από καρκίνο, ενώ αναμένεται μέχρι το 2020 να ανέλθει σε δεύτερη αιτία. Το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο δεν ξεπερνά το 7%. Πράγματι ένας από τους λόγους για τους οποίους ο παγκρεατικός καρκίνος έχει τόσο κακή πρόγνωση είναι η διάγνωσή του σε αρκετά προχωρημένο στάδιο, καθώς δεν εμφανίζει εξειδικευμένα συμπτώματα. Άλλοι παράγοντες υπεύθυνοι για την κακή πρόγνωση του αποτελούν η έλλειψη εξειδικευμένων καρκινικών βιοδεικτών, καθώς και γενικά κάποιου αιματολογικού ελέγχου ή άλλων ειδικών ελέγχων, καθώς και η ικανότητά του να σχηματίζει μεταστατικές εστίες πολύ γρήγορα λόγω της αυξημένης περινευρικής και αγγειακής ανάπτυξης που εμφανίζει (Pic and Pic 2016).

Πολλές θεραπευτικές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να αντιμετωπιστεί ο παγκρεατικός καρκίνος. Ωστόσο, ο παγκρεατικός καρκίνος παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα στις θεραπείες είτε χημειοθεραπείες είτε ραδιοθεραπείες είτε μοριακές στοχεύουσες θεραπείες λόγω γενετικών αλλά και επιγενετικών αλλαγών. Πρόκειται για έναν γενετικά ετερογενή καρκίνο με πολλές γενετικές μεταλλάξεις να παρατηρούνται στο γονιδίωμα των ασθενών (Murthy, Kuldeep S Attri, et al. 2018).

Τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στον παγκρεατικό καρκίνο είναι τα: *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* και *SMAD4*. Το *KRAS* αποτελεί ογκογονίδιο, είναι μεταλλαγμένο σε πάνω από το 90% των PDAC και συνήθως σχετίζεται με υψηλή θνησιμότητα. Για το λόγο αυτό η φαρμακολογική στόχευση του *KRAS* αποτελεί πρωταρχικό στόχο πολλών ερευνών. Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες των τριών τελευταίων δεκαετιών καμία αποτελεσματική θεραπεία στόχευσης του *KRAS* δεν έχει φτάσει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος στον παγκρεατικό καρκίνο στον κατάροου του *KRAS* αποτελεί το πρωτο-ογκογονίδιο *MYC* το οποίο

βρέθηκε να αποτελεί σημαντικό παράγοντα αντίστασης στις αντι-KRAS θεραπείες (Ischenko et al. 2017) (Zeitouni et al. 2016). Η σηματοδότηση μέσω του RAS επηρεάζει το MYC ρυθμίζοντας την πρωτεϊνική σταθερότητά του μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/AKT και RAF/MAP-K. Έτσι, βρέθηκε ότι το KRAS σταθεροποιεί το c-MYC μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και συγκεκριμένα μέσω σταθεροποίησης της πρωτεΐνης MYC (Wang et al. 2018). Το KRAS/ERK/c-MYC μονοπάτι αποτελεί το κύριο μονοπάτι καρκινογένεσης στον παγκρεατικό καρκίνο καθιστώντας έτσι το c-MYC έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο (Kortlever et al. 2017) (Wang et al. 2018).

Το *c-MYC* αποτελεί ογκογονίδιο το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή τουλάχιστον του 15% του συνόλου του γονιδιώματος. Οποιαδήποτε απορρύθμιση στην έκφρασή του είτε ποσοτικά είτε χρονικά οδηγεί σε καρκινογένεση με περίπου το 50% των περιστατικών καρκίνου να σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του ογκογονιδίου *c-MYC*. Για το λόγο αυτό η ρύθμιση της έκφρασης του *c-MYC* είναι αυστηρή και ελέγχεται σε όλα τα πιθανά επίπεδα, μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό.

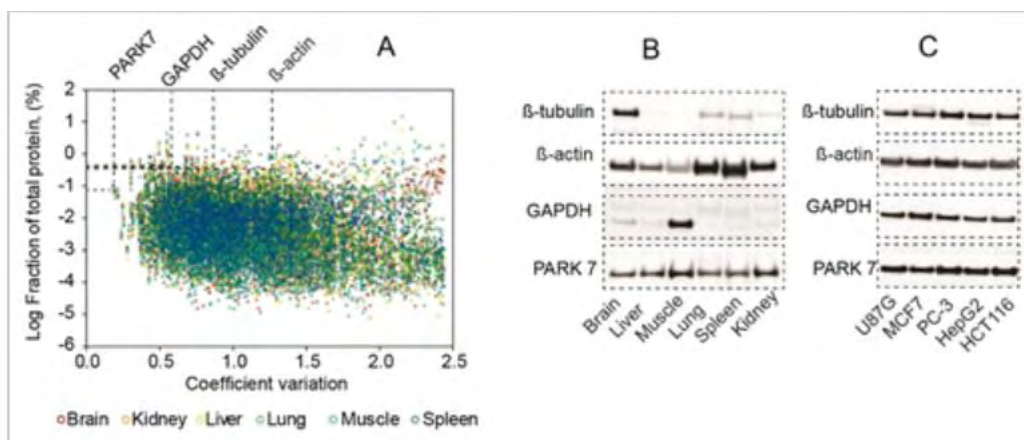
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης του *c-MYC*, των δύο φωσφορυλιωμένων μορφών του καθώς και της phospho GSK3-b και total GSK3-σε παγκρεατικούς καρκινικούς ιστούς ασθενών και να γίνει σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά και να συσχετισθούν με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των όγκων και κυρίως με την παρουσία μεταστάσεων.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ήταν απαραίτητο να μελετηθούν και τα επίπεδα έκφρασης μιας κατηγορίας γονιδίων που ονομάζονται housekeeping genes. Πρόκειται για γονίδια τα οποία εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα στον ίδιο βαθμό και δεν επηρεάζεται η έκφρασή τους από παθολογικές καταστάσεις. Στην παρούσα μελέτη το γονίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς είναι το DJ-1. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη η οποία στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο PARK7 το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 και έχει συσχετιστεί με τη νόσο Parkinson (Xu et al. 2010). Βρίσκεται σε πολλούς ιστούς και όργανα συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Η επιλογή του γονιδίου αυτού σαν γονίδιο αναφοράς έγινε μετά από δοκιμές και με άλλα γονίδια αναφοράς, όπως η ακτίνη και το GAPDH. Τόσο η ακτίνη όσο και το GAPDH αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα γονίδια αναφοράς. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν σημαντικό πρόβλημα, καθώς φάνηκε να υπάρχει ασυμφωνία με τη χρωματομετρική μέθοδο ποσοτικοποίησης συγκέντρωσης πρωτεϊνών (μέθοδος Bradford).

Δηλαδή, φάνηκε ότι η έκφρασή τους δεν παραμένει σταθερή, αλλά μεταβάλλεται μεταξύ των επτά διαφορετικών παγκρεατικών ιστών. Πράγματι, σύμφωνα με το Ramos et al. τα επίπεδα του GAPDH βρέθηκαν αυξημένα σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του νεφρού, του παγκρέατος και του δέρματος (Ramos et al. 2015). Μία πιθανή εξήγηση του γεγονότος αυτού είναι η συμμετοχή του GAPDH στην οδό της γλυκόλυσης. Έτσι, η υποξία αποτελεί σημαντικό παράγοντα που μπορεί να αυξήσει την έκφραση του GAPDH, γι' αυτό και δε συνίσταται σαν γονίδιο αναφοράς σε μελέτες που σχετίζονται με ασθένειες που σχετίζονται με τη συγκέντρωση οξυγόνου στο κυτταρικό περιβάλλον. Ο καρκίνος αποτελεί μία τέτοια περίπτωση, καθώς τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υποξικές συνθήκες και αύξηση της παραγωγής GAPDH ως απόκριση στον παράγοντα HIF με σκοπό την ενίσχυση της γλυκολυτικής οδού, φαινόμενο γνωστό ως φαινόμενο Warburg. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα γλυκόλυσης, άρα και υψηλά επίπεδα GAPDH.

Όσον αφορά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς ακτίνη και DJ-1 σε πέντε διαφορετικές παγκρεατικές κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε μικρή διαφορά στην έκφραση των δύο γονιδίων. Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση των παραπάνω γονιδίων σε μια κυτταρική σειρά με χρονοεξαρτώμενες και δόσοεξαρτώμενες επιδράσεις φαρμάκου όπου καμία διαφορά στην έκφρασή τους δεν παρατηρήθηκε. Έτσι, μετά από τα παραπάνω αποτελέσματα των ανοσοαποτυπώσεων καταλήξαμε να χρησιμοποιήσουμε σαν γονίδιο αναφοράς το DJ-1 ο οποίος φάνηκε να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συμφωνία με τη μέθοδο Bradford.

Αντίστοιχα πειράματα με αναλύσεις rt-PCR έδειξαν ότι η έκφραση τόσο του GAPDH όσο και της β-ακτίνης ενδέχεται να μεταβάλλεται ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο, τον τύπο του ιστού και τις πειραματικές συνθήκες (Lin and Redies 2012). Αντιθέτως, το DJ-1, πράγματι, φάνηκε να είναι σε συμφωνία με τη μέθοδο Bradford κάτι το οποίο διαπιστώθηκε από την ποσοτικοποίηση όπου φάνηκε ότι η έκφρασή του μεταξύ των δειγμάτων δεν παρουσιάζει διαφορές. Η χρήση του DJ-1 σαν γονίδιο αναφοράς ενισχύεται και από μελέτες με πρωτεομικές αναλύσεις λυμάτων κυττάρων και ιστών οι οποίες έδειξαν ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του DJ-1 παρουσιάζουν τη χαμηλότερη διαφοροποίηση μεταξύ των διάφορων κυτταρικών τύπων και ιστών ακόμη και μεταξύ διαφορετικών ειδών. Πρόκειται για μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη η οποία εξάγεται εύκολα από τα κύτταρα και μεταφέρεται εύκολα από τα πηκτώματα ακρυλαμίδης στις μεμβράνες για Western-blot ανάλυση (Wiśniewski and Mann 2016).



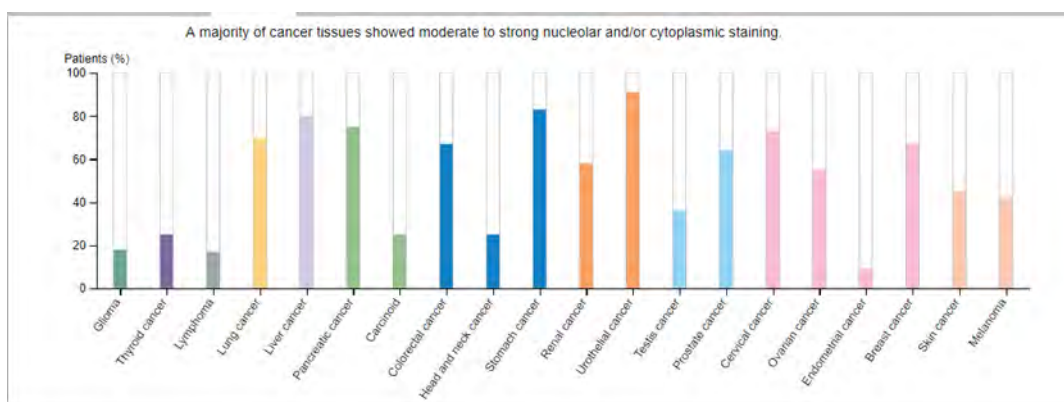
Εικόνα 24. Α. Συσχέτιση της αφθονίας των πρωτεϊνών β -actin, GAPDH, β -tubulin και DJ-1/Rark7 και της διαφοροποίησης των επιπέδων έκφρασής τους ανά ιστό. Β, C. Έκφραση των γονιδίων β -actin, GAPDH, β -tubulin και DJ-1/Rark7 μεταξύ διαφορετικών ιστών.

Wiśniewski and Mann 2016

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με βάση το DJ-1 έδειξαν υπερέκφραση των επιπέδων του c-MYC στο σύνολο των επτά ασθενών σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό στον οποίο δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων του c-MYC. Πιο συγκεκριμένα, σημαντική αύξηση σημειώθηκε στους τέσσερις από τους επτά ασθενείς. Από το σύνολο αυτών των τεσσάρων ασθενών οι τρεις εμφανίζουν μεταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, ο ασθενής 3 εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα c-MYC στο σύνολο όλων των ασθενών. Πρόκειται για ασθενή με μετάσταση στο ήπαρ, ενώ ο πρωτοπαθής όγκος εντοπίζεται στην ουρά του παγκρέατος και είναι αδενοκαρκίνωμα. Επιπλέον, αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι ο ασθενής αυτός δε βρίσκεται εν ζωή. Ο ασθενής 4 εμφανίζει τα αμέσως επόμενα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης c-MYC. Πρόκειται, επίσης, για μεταστατικό ασθενή με αδενοκαρκίνωμα εντοπιζόμενο στην κεφαλή του παγκρέατος. Ο ασθενής αυτός εμφανίζει μετάσταση στο ήπαρ, αλλά και οστικές μεταστάσεις και επίσης δε βρίσκεται εν ζωή. Ο ασθενής 1 διαγνώστηκε, επίσης, με αδενοκαρκίνωμα στην κεφαλή του παγκρέατος. Δε διαπιστώθηκε διήθηση σε κάποιο γειτονικό όργανο, ωστόσο, βρέθηκαν ύποπτοι λεμφαδένες. Τέλος, ο ασθενής 7 με αδενοκαρκίνωμα στην κεφαλή του παγκρέατος φέρει διηθημένους λεμφαδένες και οστικές μεταστάσεις. Έτσι, στο σύνολο των τεσσάρων μεταστατικών ασθενών οι τρεις από αυτούς παρουσιάζουν σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του c-MYC. Τα επίπεδα έκφρασης του c-MYC, επομένως, στο σύνολο των επτά ασθενών παρουσιάζουν

αύξηση με την υψηλότερη αύξηση στα τρία από τα τέσσερα μεταστατικά δείγματα. Το γεγονός αυτό μας υποδεικνύει ότι τα υψηλά επίπεδα του c-MYC σχετίζονται με αυξημένη επιθετικότητα και μειωμένη βιωσιμότητα, αφού παρατηρήθηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης c-MYC παρατηρούνται σε ασθενείς με ηπατική μετάσταση, εκ των οποίων ο ένας έφερε και οστικές μεταστάσεις, οι οποίοι δε βρίσκονται εν ζωή.

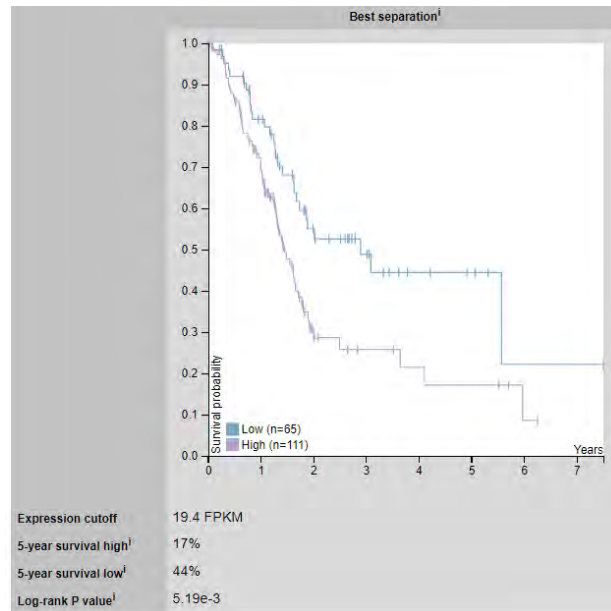
Τα ευρήματά μας αυτά συμφωνούν με ευρήματα από άλλες βάσεις δεδομένων, όπως για παράδειγμα με τη βάση δεδομένων Human Atlas Protein. Στη βάση αυτή μελετώνται τόσο τα επίπεδα των mRNA των γονιδίων όσο και τα επίπεδα των πρωτεϊνών τους σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στην εικόνα 27 φαίνονται τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του c-MYC σε ποικίλους τύπους καρκίνου. Στον παγκρεατικό καρκίνο, συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζουν υψηλά έως μέτρια επίπεδα έκφρασης c-MYC.



Εικόνα 27. Επίπεδα έκφρασης του c-MYC σε διάφορους τύπους καρκίνου ανάλογα με τον προσβεβλημένο ιστό. Ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ένας από τους πέντε τύπους καρκίνου με τα υψηλότερα επίπεδα c-MYC.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136997-MYC/pathology>

Ακολούθως, συσχετίζονται τα επίπεδα των γονιδίων με το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με τη βοήθεια των διαγραμμάτων Kaplan-Meier. Στο διάγραμμα αυτό απεικονίζεται η καμπύλη συσχέτισης των επιπέδων του c-MYC mRNA με την επιβίωση των ασθενών, τόσο για ασθενείς με υψηλά επίπεδα (High) όσο και για ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης (Low) έκφρασης c-MYC. (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Απεικόνιση των ποσοστών επιβίωσης ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του *c-MYC* mRNA. Για τους ασθενείς με υψηλή έκφραση το ποσοστό της 5ετούς επιβίωσης είναι 17%, ενώ για τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση είναι 44%.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136997-MYC/pathology>

Τα ευρήματά μας σχετικά με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *c-MYC* έρχονται, επίσης, σε συμφωνία με μελέτες στις οποίες αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης *c-MYC* με Western-Blot ανάλυση και έδειξαν υπερέκφρασή της και στα επτά ζεύγη παγκρεατικών ιστών ασθενών σε σύγκριση με το γειτονικό φυσιολογικό ιστό (Wang et al. 2018). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτες ανοσοφθορισμού σε 65 δείγματα πρωτογενών όγκων PDAC όπου το 38% αυτών παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση του *c-MYC* σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό.

Στο πλαίσιο του ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του *c-MYC* μελετήθηκαν, επίσης, τα επίπεδα των φωσφορυλιώσεων που ελέγχουν την πρωτεϊνική σταθερότητα του *c-MYC* προκειμένου να διασαφηνιστεί εάν υπάρχει απορρύθμιση του μηχανισμού που ελέγχει την αποικοδόμηση του *c-MYC*. Πρόκειται για ένα γονίδιο με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, 20-30', το οποίο συντίθεται και αποικοδομείται πολύ γρήγορα με πολύ αυστηρό μετα-μεταφραστικό έλεγχο.

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο θέσεις φωσφορυλίωσης στην αμινοτελική περιοχή του c-MYC, στη σερίνη 62 η οποία σταθεροποιεί το c-MYC και στη θρεονίνη 58 όπου αποσταθεροποιεί το c-MYC. Η σερίνη 62 αποτελεί στόχο της κινάσης ERK και η θρεονίνη 58 της κινάσης GSK3-b. Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 62 προηγείται και είναι προϋπόθεση της φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 58.

Ένας από τους τρόπους με τους οποίους το c-MYC συμβάλλει στην καρκινογένεση περιλαμβάνει διαταραχές στο μηχανισμό ρύθμισης της πρωτεϊνικής σταθερότητάς του. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε 65 ασθενείς με PDAC έδειξαν αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής του c-MYC στη σερίνη 62 και μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής του c-MYC στη θρεονίνη 58. Στην παρούσα διπλωματική εργασία τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής του c-MYC στο κατάλοιπο της σερίνης 62 ως προς τα συνολικά επίπεδα έκφρασης του c-MYC μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών (γράφημα 2). Ομοίως, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής του c-MYC στο κατάλοιπο της θρεονίνης 58 ως προς τα συνολικά επίπεδα έκφρασης του c-MYC με εξαίρεση τους ασθενείς 2 και 4 οι οποίοι φάνηκε να έχουν αυξημένα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής του c-MYC στο κατάλοιπο της θρεονίνης 58 κάτι το οποίο όμως δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικό (γράφημα 3).

Όπως προαναφέρθηκε ένα από τα μόρια που ρυθμίζουν το ρυθμό αποικοδόμησης του c-MYC αποτελεί η κινάση GSK3-b η οποία φωσφορυλιώνει το c-MYC και το οδηγεί προς αποικοδόμηση. Όσον αφορά τα αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση της GSK3-b δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της phospho-GSK3-b/total GSK3-b μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού. Ο μικρός αριθμός δειγμάτων αποτέλεσε πρόβλημα στη στατιστική επεξεργασία και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων (γράφημα 4,5).

Έτσι, από τα παραπάνω αποτελέσματα δε φάνηκε να διαταράσσεται ο ρυθμός αποικοδόμησης του c-MYC τουλάχιστον σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Ίσως τα υψηλά επίπεδα c-MYC να οφείλονται σε απορρύθμιση της έκφρασής του σε άλλα επίπεδα. Για παράδειγμα, ενδέχεται τα υψηλά επίπεδα του c-MYC να οφείλονται σε διαταραχές της ρύθμισης της έκφρασης του c-MYC σε μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα υψηλά επίπεδα c-MYC μπορεί να συνάδουν είτε με αυξημένα επίπεδα c-MYC mRNA είτε με μειωμένο ρυθμό αποικοδόμησης του

c-MYC mRNA, αφού τα επίπεδα έκφρασης των mRNA ρυθμίζονται από το ρυθμό μεταγραφής και το ρυθμό αποικοδόμησής τους.

Περαιτέρω έρευνα στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας θα μπορούσε να γίνει καταρχάς με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να αυξήσουμε τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων αφού τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν ακολουθούν τη στατιστική σημαντικότητα της t-test δοκιμασίας. Επιπλέον, στο πλαίσιο της μελέτης των επιπέδων του *c-MYC* θα ήταν χρήσιμο να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KRAS* το οποίο είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στον παγκρεατικό καρκίνο. Το *KRAS* βρίσκεται στον ανάρου του *c-MYC* και αποτελεί βασικό μόριο ρύθμισης της πρωτεϊνικής σταθερότητας του *c-MYC* μέσω των μονοπατιών RAF/MEK/ERK και PI3K/AKT (Vaseva et al. 2017). Θα μπορούσαν, επίσης, να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης και άλλων σηματοδοτικών μορίων που συμμετέχουν στα παραπάνω μονοπάτια, όπως για παράδειγμα οι PI3K και AKT κινάσες οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργότητα της GSK3, καθώς και οι κινάσες RAF/MEK/ERK οι οποίες οδηγούν στη φωσφορυλίωση και σταθεροποίηση του *c-MYC*. Σημαντικό θα ήταν, επίσης, να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης του *c-MYC* και σε επίπεδο mRNA προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί τη συσσώρευση της πρωτεΐνης MYC στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, στο πλαίσιο αυτό θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω η έκφραση μορίων – ρυθμιστών της μεταγραφής του γονιδίου *c-MYC*, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη IMP1 η οποία ανάλογα με τη φωσφορυλίωση που φέρει είτε επάγει τη μετάφραση του *c-MYC* mRNA όταν έχει φωσφορυλιωθεί από την κινάση SRC στο κατάλοιπο τυροσίνης 396 είτε διατηρεί τη μεταφρασιμότητά του σε χαμηλά επίπεδα όταν έχει φωσφορυλιωθεί στο κατάλοιπο σερίνης 181 από την mTORC2 κινάση (Ioannidis et al. 2001). Για μια πληρέστερη εικόνα του μηχανισμού αύξησης της πρωτεΐνης *c-MYC* θα μπορούσαν να ελεγχθούν, επίσης, ο αριθμός των αντιγράφων του *c-MYC*, αλλά και δομικές μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού οι οποίες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τη μετάθεσή σε περιοχή όπου υπόκειται στον έλεγχο μεταγραφικά ενεργών περιοχών.

Εν κατακλείδι, το *c-MYC* αποτελεί έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για πολλούς τύπους καρκίνου, αφού η έκφρασή του απορρυθμίζεται σε περισσότερο από το 50% των τύπων καρκίνου. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων μας δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, δεν μπορούμε να αγνοήσουμε τα επίπεδα του *c-MYC* στους μεταστατικούς ασθενείς κάτι το οποίο ίσως καθιστά το *c-MYC* δείκτη κακής πρόγνωσης για τον παγκρεατικό καρκίνο. Σε κάθε περίπτωση, όμως, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό που προκαλεί την

απορρύθμιση της έκφρασής του προκειμένου να σχεδιαστεί η κατάλληλη φαρμακευτική προσέγγιση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Borsig, L., M. J. Wolf, M. Roblek, A. Lorentzen, and M. Heikenwalder. 2014. “Inflammatory Chemokines and Metastasis—tracing the Accessory.” *Oncogene* 33(25):3217–24.
- Bretones, Gabriel, M. Dolores Delgado, and Javier León. 2015b. “Myc and Cell Cycle Control.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849(5):506–16.
- Brierley, James and National Cancer Institute of Canada Committee on Cancer Staging. 2006. “The Evolving TNM Cancer Staging System: An Essential Component of Cancer Care.” *CMAJ : Canadian Medical Association Journal = Journal de l’Association Medicale Canadienne* 174(2):155–56.
- Cantley, L. C. 2002. “The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway.” *Science* 296(5573):1655–57.
- Chen, Hui, Hudan Liu, and Guoliang Qing. 2018b. “Targeting Oncogenic Myc as a Strategy for Cancer Treatment.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3(1):5.
- Cooper, Geoffrey M. 2000. *The Cell : A Molecular Approach*. ASM Press.
- Cormier, Janice N. and Raphael E. Pollock. n.d. “Soft Tissue Sarcomas.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 54(2):94–109.
- Dang, Chi V. et al. 1999. “Function of the C-Myc Oncogenic Transcription Factor.” *Experimental Cell Research* 253(1):63–77.
- Dang, Chi V. 2012. “MYC on the Path to Cancer.” *Cell* 149(1):22–35.
- Deeb, Ayham, Sulsal-Ul Haque, and Olugbenga Olowokure. 2015. “Pulmonary Metastases in Pancreatic Cancer, Is There a Survival Influence?” *Journal of Gastrointestinal Oncology* 6(3):E48-51.
- Ell, Brian and Yibin Kang. 2013. “Transcriptional Control of Cancer Metastasis.” *Trends in Cell Biology* 23(12):603–11.
- Freelove, Robert and Anne D. Walling. 2006. “Pancreatic Cancer: Diagnosis and Management.” *American Family Physician* 73(3):485–92.

- Gabay, Meital, Yulin Li, and Dean W. Felsher. 2014. "MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4(6).
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti. 1999. "Integrin Signaling." *Science (New York, N.Y.)* 285(5430):1028–32.
- Goral, Vedat. 2015. "Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 16(14):5619–24.
- Grant, T. J., K. Hua, and A. Singh. 2016. "Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer." Pp. 241–75 in *Progress in molecular biology and translational science*. Vol. 144.
- Griffin, James F., Katherine E. Poruk, and Christopher L. Wolfgang. 2015. "Pancreatic Cancer Surgery: Past, Present, and Future." *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu* 27(4):332–48.
- Grisanzio, Chiara and Matthew L. Freedman. 2010. "Chromosome 8q24-Associated Cancers and MYC." *Genes & Cancer* 1(6):555–59.
- Gurzu, Simona et al. 2016. "Systematic Review of the Old and New Concepts in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 22(30):6764.
- Hanahan, Douglas and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144(5):646–74.
- Hessmann, E., G. Schneider, V. Ellenrieder, and J. T. Siveke. 2016. "MYC in Pancreatic Cancer: Novel Mechanistic Insights and Their Translation into Therapeutic Strategies." *Oncogene* 35(13):1609–18.
- Ilic, Milena and Irena Ilic. 2016. "Epidemiology of Pancreatic Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 22(44):9694–9705.
- Ioannidis, P. et al. 2001. "C-MYC and IGF-II MRNA-Binding Protein (CRD-BP/IMP-1) in Benign and Malignant Mesenchymal Tumors." *International Journal of Cancer* 94(4):480–84.
- Ischenko, Irene, Jizu Zhi, Michael J. Hayman, and Oleksi Petrenko. 2017. "KRAS-Dependent

- Suppression of MYC Enhances the Sensitivity of Cancer Cells to Cytotoxic Agents.” *Oncotarget* 8(11):17995–9.
- Jackstadt, Rene and Heiko Hermeking. 2015. “MicroRNAs as Regulators and Mediators of C-MYC Function.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849(5):544–53.
- Kalkat, Manpreet et al. 2017. “MYC Deregulation in Primary Human Cancers.” *Genes* 8(6).
- Kleeff, Jorg et al. 2016. “Pancreatic Cancer.” *Nature Reviews Disease Primers* 2:16022.
- Kopecky, Benjamin, Bernd Fritzsich, Benjamin Kopecky, and Bernd Fritzsich. 2012. “The Myc Road to Hearing Restoration.” *Cells* 1(4):667–98.
- Kortlever, Roderik M. et al. 2017. “Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression.” *Cell* 171(6):1301–1315.e14.
- Lang, J. C., B. Whitelaw, S. Talbot, and N. M. Wilkie. 1988. “Transcriptional Regulation of the Human C-Myc Gene.” *The British Journal of Cancer. Supplement* 9:62–66.
- Levens, David. 2013. “Cellular MYC Economics: Balancing MYC Function with MYC Expression.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(11).
- Lin, Juntang and Christoph Redies. 2012. “Histological Evidence: Housekeeping Genes Beta-Actin and GAPDH Are of Limited Value for Normalization of Gene Expression.” *Development Genes and Evolution* 222(6):369–76.
- Locker, Gershon Y. et al. 2006. “ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24(33):5313–27.
- Lukashev, M. E. and Z. Werb. 1998. “ECM Signalling: Orchestrating Cell Behaviour and Misbehaviour.” *Trends in Cell Biology* 8(11):437–41.
- Medema, R. H. and J. L. Bos. 1993. “The Role of P21ras in Receptor Tyrosine Kinase Signaling.” *Critical Reviews in Oncogenesis* 4(6):615–61.
- Murthy, Divya, Kuldeep S. Attri, and Pankaj K. Singh. 2018. “Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression, Pathogenesis, and

- Therapeutics.” *Frontiers in Physiology* 9:335.
- Oberstein, Paul E. and Kenneth P. Olive. 2013. “Pancreatic Cancer: Why Is It so Hard to Treat?” *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6(4):321–37.
- Pansky, B. n.d. “Anatomy of the Pancreas. Emphasis on Blood Supply and Lymphatic Drainage.” *International Journal of Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology* 7(1–3):101–8.
- Papachristou, Georgios I. and David C. Whitcomb. 2004. “Predictors of Severity and Necrosis in Acute Pancreatitis.” *Gastroenterology Clinics of North America* 33(4):871–90.
- Park, Ben Ho and Bert Vogelstein. 2003. “The P53 Gene.”
- Park, Moon-Taek and Su-Jae Lee. 2003. “Cell Cycle and Cancer.” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36(1):60–65.
- Pavlova, Natalya N. and Craig B. Thompson. 2016. “The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism.” *Cell Metabolism* 23(1):27–47.
- Pecorino, Lauren. n.d. *Molecular Biology of Cancer : Mechanisms, Targets, and Therapeutics*.
- Petitjean, Audrey et al. 2007. “Impact of Mutant P53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database.” *Human Mutation* 28(6):622–29.
- Poste, George and Isaiah J. Fidler. 1980. “The Pathogenesis of Cancer Metastasis.” *Nature* 283(5743):139–46.
- Rajbhandari, Nirakar, Wan-Chi Lin, Barbara L. Wehde, Aleata A. Triplett, and Kay-Uwe Wagner Correspondence. 2017. “Autocrine IGF1 Signaling Mediates Pancreatic Tumor Cell Dormancy in the Absence of Oncogenic Drivers Graphical Abstract Highlights d Tumor Cells That Remain Dormant Following Oncogene Ablation Can Cause Cancer Recurrence d Tumor Dormancy Is Associated with a Cancer Cell-Intrinsic Increase in IGF1/AKT Signaling d Overexpression of IGF-1R Increases Residual Disease d Inhibition of IGF-1R Reduces the Survival of Dormant Cancer Cells and Cancer Recurrence.”
- Ramos, David et al. 2015. “Deregulation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

- Expression during Tumor Progression of Human Cutaneous Melanoma.” *Anticancer Research* 35(1):439–44.
- Ramsay, G., G. I. Evan, and J. M. Bishop. 1984. “The Protein Encoded by the Human Proto-Oncogene c-Myc.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(24):7742–46.
- Rg Vervoorts, Jö, Juliane Lü Scher-Firzloff, and Bernhard Lü Scher. 2006. “The Ins and Outs of MYC Regulation by Posttranslational Mechanisms * □ S.”
- Roberts, G. D. and A. M. Porter. 1989. “Medical Student Selection--Time for Change: Discussion Paper.” *Journal of the Royal Society of Medicine* 82(5):288–91.
- Scarton, Lisa et al. 2018. “Pancreatic Cancer Related Health Disparities: A Commentary.” *Cancers* 10(7):235.
- Schneeweis, Christian, Matthias Wirth, Dieter Saur, Maximilian Reichert, and Günter Schneider. 2016. “Small GTPases Oncogenic KRAS and the EGFR Loop in Pancreatic Carcinogenesis-A Connection to Licensing Nodes.”
- Sethi, Nilay and Yibin Kang. 2011. “Unravelling the Complexity of Metastasis — Molecular Understanding and Targeted Therapies.” *Nature Reviews Cancer* 11(10):735–48.
- Shi, J. et al. 2013. “Role of SWI/SNF in Acute Leukemia Maintenance and Enhancer-Mediated Myc Regulation.” *Genes & Development* 27(24):2648–62.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2018. “Cancer Statistics, 2018.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(1):7–30.
- Skandalakis, L. J., J. S. Rowe, S. W. Gray, and J. E. Skandalakis. 1993. “Surgical Embryology and Anatomy of the Pancreas.” *The Surgical Clinics of North America* 73(4):661–97.
- Talmadge, J. E. and I. J. Fidler. 2010. “AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective.” *Cancer Research* 70(14):5649–69.
- Tanos, B. and E. Rodriguez-Boulan. 2008. “The Epithelial Polarity Program: Machineries Involved and Their Hijacking by Cancer.” *Oncogene* 27(55):6939–57.
- Torre, Lindsey A. et al. 2015. “Global Cancer Statistics, 2012.” *CA: A Cancer Journal for*

Clinicians 65(2):87–108.

Vanhaesebroeck, Bart, Julie Guillermet-Guibert, Mariona Graupera, and Benoit Bilanges. 2010.

“The Emerging Mechanisms of Isoform-Specific PI3K Signalling.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(5):329–41.

Vaseva, Angelina V. et al. 2017. “Abstract 4458: Regulation of MYC Protein Stability by

Mutant KRAS in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer Research* 77(13 Supplement):4458–4458.

Vincent, Audrey, Joseph Herman, Rich Schulick, Ralph H. Hruban, and Michael Goggins. 2011.

“Pancreatic Cancer.” *Lancet (London, England)* 378(9791):607–20.

Wang, Bo et al. 2018. “FBP1 Loss Contributes to BET Inhibitors Resistance by Undermining C-

Myc Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 37(1):224.

Weinberg, Robert A. 1983. “Oncogenes.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 33(5):300–306.

Winter, Jordan M., Anirban Maitra, and Charles J. Yeo. 2006. “Genetics and Pathology of

Pancreatic Cancer.” *HPB : The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 8(5):324–36.

Wirth, M., S. Mahboobi, O. H. Kramer, and G. Schneider. 2016. “Concepts to Target MYC in

Pancreatic Cancer.” *Molecular Cancer Therapeutics* 15(8):1792–98.

Wiśniewski, Jacek R. and Matthias Mann. 2016. “A Proteomics Approach to the Protein

Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting.” *Journal of Proteome Research* 15(7):2321–26.

Xu, Xiuling, Florent Martin, and Jeffrey S. Friedman. 2010. “The Familial Parkinson’s Disease

Gene DJ-1 (PARK7) Is Expressed in Red Cells and Plays a Role in Protection against Oxidative Damage.” *Blood Cells, Molecules & Diseases* 45(3):227–32.

Yamada, Tadataka., David H. Alpers, and 山田忠孝. 2003. *Textbook of Gastroenterology*.

Lippincott Williams & Wilkins.

Yuan, T. L. and L. C. Cantley. 2008. “PI3K Pathway Alterations in Cancer: Variations on a

Theme.” *Oncogene* 27(41):5497–5510.

Zeitouni, Daniel, Yuliya Pylayeva-Gupta, Channing J. Der, and Kirsten L. Bryant. 2016. “KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment.” *Cancers* 8(4).

Ιστοσελίδες

<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>

<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>

<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>

<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

<https://idmprogram.com/emerging-hallmarks-of-cancer-cancer-13/>

<https://medium.com/@drjasonfung/the-hallmarks-of-cancer-f7a106361d6c>

<http://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions>

<http://teachmephysiology.com/gastrointestinal-system/pancreas/exocrine-pancreas/>

<https://www.slideshare.net/yezzajiharish/determining-resectability-in-pancreatic-cancer>

<http://pathology.jhu.edu/pc/BasicOverview1.php?area=ba>

<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-andstatistics/annual-cancer-facts-and-figures/2015/cancer-facts-and-figures-2015.pdf>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187493991400073X>

<https://www.cancer.gov/research/key-initiatives/ras/ras-central/blog/2017/myc-ras>

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136997-MYC/pathology>