



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Εφαρμοσμένη Βιοχημεία: Κλινική Χημεία, Βιοτεχνολογία και
Αξιολόγηση Φαρμακευτικών Προϊόντων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Χαρακτηρισμός των εξωκυττάρων κυστιδίων από κύτταρα
αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου και έκφραση της
υαλουρονιδάσης σε καρκινικούς ιστούς λάρυγγα και σίελο
ασθενών*

ΚΑΤΕΛΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Επιβλέπων: Καθηγητής Δημήτριος Βύνιος
Συνεπιβλέπων: Ερευνητής Stéphane Brézillon

Πάτρα, 2017

Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημείας,
[Μαρία Κάτελα]
© [2017] – Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

UNIVERSITY OF PATRAS

SCHOOL OF NATURAL SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

«Applied Biochemistry: Clinical chemistry, Biotechnology and
Evaluation of Pharmaceutical Products»

MASTER THESIS

*Characterization of extracellular vesicles from colon
adenocarcinoma cells and expression of hyaluronidase in
human laryngeal cancer and saliva*

CATELA MARIA

Chemist

Supervisor: Professor Demitrios Vynios

Co-Supervisor: Stéphane Brézillon

Patras, 2017

University of Patras, Department of Chemistry,
[Catela Maria]
© [2017] – All rights reserved

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. Δημήτριος Βύνιος, Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών (Επιβλέπων)
2. Stéphane Brézillon, Ερευνητής,
Université de Reims Champagne Ardenne (Συνεπιβλέπων)
3. Αχιλλέας Θεοχάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Three-member inquiry committee

1. Demitrios Vynios, Professor
Department of Chemistry, University of Patras (Supervisor)
2. Stéphane Brézillon, Researcher-Team Leader,
Université de Reims Champagne Ardenne (Co-supervisor)
3. Achilleas Theocharis, Associate professor
Department of Chemistry, University of Patras

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ήμισυ στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Βύνιου και πραγματοποιήθηκε κυρίως την έκφραση της υαλουρονιδάσης σε καρκινικούς ιστούς λάρυγγα και σίελο ασθενών. Κατά το έτερον ήμισυ δε, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατρικής Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Champagne-Ardenne (URCA) στην πόλη Reims της Γαλλίας, υπό την επίβλεψη του ερευνητή κ. Stéphane Brezillon και είχε ως κύριο θέμα τον χαρακτηρισμό των εξωκυττάρων κυστιδίων από κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. Συνολικά είχε διάρκεια 18 μηνών.

Θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω αρχικά τον καθηγητή μου κο Δημήτριο Βύνιο που με την στηριξή του και την αμέριστη καθοδήγηση και πίστη του εξαρχής στις δυνατότητές μου με βοήθησε να αναπτυχθώ σε επιστημονικό αλλά και σε ανθρωπιστικό επίπεδο τα τελευταία πέντε χρόνια κατά τα οποία συνεργαζόμαστε και ήταν πραγματικά σημαντικά για τον καθορισμό της επιστημονικής μου ταυτότητας. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή κο Αχιλλέα Θεοχάρη, που εκτός απ' το να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής, μου έδωσε την ευκαιρία και τώρα αλλά και στο παρελθόν να λάβω μέρος μέσω κινητικότητας Erasmus+ σε αξιόλογα projects αναγνωρισμένων εργαστηρίων του εξωτερικού, εμπειρία ανεκτίμητης αξίας που με εφοδίασε με ευρύ φάσμα εξελιγμένων τεχνικών και γενικότερη επιστημονική κατάρτιση. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου κο Νικόλαο Καραμάνο, κο Αλέξιο Αλετρά, κο Σπύρο Σκανδάλη και κο Αλέξιο Βλάμη για την συμβολή τους στην απόκτηση εξειδικευμένης γνώσης στο πεδίο της Βιοχημείας, η οποία κρίθηκε απαραίτητη για τον επιτυχή σχεδιασμό, την πλήρη κατανόηση και εκπόνηση της παρούσας διατριβής και της γενικότερης επιστημονικής μου εξέλιξης.

Θα ήταν φυσικά τεράστια παράλειψη να μην ευχαριστήσω αρχικά τον Καθηγητή κ. Francois Xavier Maquart για την πρόσκληση και τη φιλοξενία στο εργαστήριο της Σχολής Ιατρικής του πανεπιστημίου URCA στη Reims, όπου η εκπαίδευσή μου σε άρτιες επιστημονικές τεχνικές βιοχημείας και μοριακής βιολογίας συνέβαλλε ανεκτίμητα στην επιστημονική και πειραματική μου κατάρτιση. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στον ερευνητή Dr. Stephane Brezillon, συνεπιβλέποντα της παρούσας εργασίας, ο οποίος μου ανέθεσε πολύ αξιόλογα projects και εμπιστεύτηκε τις δυνατότητές μου, δίνοντας μου την ευκαιρία να εξελιχθώ πολύ γρήγορα υπό την απλόχερη καθοδήγησή του, καθώς και να συμμετέχω με κάποια αποτελέσματα υπό την χρηματοδότηση του πανεπιστημίου URCA στο 6^ο FEBS Advanced Lecture Course.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ευρύτερη επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου και κυρίως τις Μαρία-Ελπίδα Χριστοπούλου, Νίκη Γεωργακοπούλου, Βασιλική Αδαμοπούλου και Κωνσταντίνα Κακάτσου για το ομαδικό πνεύμα και την ευχάριστη ατμόσφαιρα, καθώς χάρη σε αυτούς διασφαλίστηκε η όμορφη παραμονή μου αλλά και η επιτυχής διεξαγωγή των πειραμάτων μου στο Πανεπιστήμιο τις Πάτρας.

Τέλος, μα σε καμία περίπτωση μικρότερης σημασίας προσθήκη, αποτελούν οι ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, αρχικά στους γονείς μου, Κωνσταντίνο Κάτελα και Δέσποινα Παπαδήμου που εξαρχής πίστεψαν στην επιμονή μου να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο και στήριξαν αυτή μου την απόφαση αδιάκοπα και αβίαστα, καθώς και τα αδέρφια μου, Αναστασία και Ανδρέα, για την πλήρη στήριξή τους σε όλα τα επίπεδα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω έναν πολύ σημαντικό άνθρωπο που χωρίς την έμπρακτη συμβολή και την απεριόριστη ενθάρρυνσή του δεν θα είχε ακολουθηθεί η ταχύτατη και επιτυχής διεκπεραίωση του επιστημονικού αυτού έργου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του λάρυγγα (2-5% περιστατικών ετησίως-παγκοσμίως) υπάγεται σε μια ευρύτερη κατηγορία καρκινικής κατάστασης, χαρακτηριζόμενη ως καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, η οποία παρουσιάζει εντυπωσιακή ετερογένεια όσον αφορά στην επιδημιολογία, την αιτιολογία και την αντιμετώπιση. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα (SCC) διότι εντοπίζεται στο επιθήλιο του λάρυγγα που στην πλειοψηφία του σχηματίζεται από πλακώδη κύτταρα, μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε σημείο του λάρυγγα (γλωττίδα: 50-60% των περιστατικών, επιγλωττίδα: 30-40% και υπογλωττίδα: 5% αντίστοιχα) και ο ρυθμός θεραπείας του επηρεάζεται από την ανατομική του θέση. Τέλος, παράδοξο αποτελεί το γεγονός του ότι παρά τον μειούμενο αριθμό κρουσμάτων λόγω βελτίωσης του βιοτικού επιπέδου με την πάροδο των ετών, τη βελτιωμένη χειρουργική και φαρμακευτική αντιμετώπιση, το 5ετές προσδόκιμο ζωής ακολουθεί κι αυτό φθίνουσα πορεία.

Οι Υαλουρονιδάσες (HAases) είναι μια οικογένεια ενζύμων που είναι καθοριστικά για τη διάδοση βακτηριακών λοιμώξεων, τις τοξίνες που είναι παρούσες σε ποικίλα δηλητήρια και πιθανώς στην προαγωγή του καρκίνου. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί έξι γονίδια υαλουρονιδάσης (HYAL1, HYAL2, RH20, HYAL3, HYAL4, HYALP1) που προκύπτουν σε συμπλέγματα των τριών σε δύο χρωμοσωμικές περιοχές. Όλες υδρολύουν το HA με πιθανή εξαίρεση τις HYAL4 και HYALP1 ενώ, μεταξύ όλων, οι HYAL1, HYAL2 και RH20 είναι καλώς χαρακτηρισμένες. Η HYAL1 είναι η κύρια ογκο-προερχόμενη HAase που υπάρχει στο ανθρώπινο πλάσμα και ούρα και εκφράζεται σε διάφορες καρκινικές καταστάσεις. Οι ισομορφές της HYAL1 (HYAL1v1, HYAL1v2, HYAL1v3, HYAL1v4, HYAL1v5) και της HYAL3 (HYAL3v1, HYAL3v2, HYAL3v3) προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα τριών και τεσσάρων -αντίστοιχα- διαφορετικών εξωνίων.

Στόχος αυτού του μέρους της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι ο έλεγχος της συμμετοχής όλων των ισομορφών των υαλουρονιδάσων στον καρκίνο του λάρυγγα και η διευκρίνιση της ύπαρξης σταδιο-εξαρτώμενης έκφρασης (ενζυμικής δραστηριότητας) συγκεκριμένων γονιδίων - ισομορφών. Τα ανωτέρω αποσκοπούν στην έγκαιρη διάγνωση με χρήση αυτών ως μοριακούς ανιχνευτές, όσο και την πιθανή θεσμοθέτησή τους ως θεραπευτικούς στόχους για την επιτυχή αντιμετώπιση του πραγματευόμενου καρκίνου.

Κατά την πειραματική πορεία και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε αύξηση των Hyal1wt, Hyal2wt, Hyal3wt, στα καρκινικά δείγματα μέχρι το στάδιο III και μετά πτώση. Δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο στην RH-20, γεγονός που ίσως υποδεικνύει την μικρότερη εμπλοκή της στην πρόοδο του καρκίνου. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου οι ισομορφές v2 και v3 της Hyal3. Συγκριτικά με την υποβολή ή όχι σε προεγχειρητική ακτινοθεραπεία, οι ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε RT παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα Hyal1wt, Hyal1v5 και RH20 και μειωμένα επίπεδα Hyal3 wt.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος δειγμάτων σιέλου των υπό ανάλυση ασθενών με τη μέθοδο του ζυμογραφήματος για τη μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας, ώστε να διευκρινιστεί η δυνατότητα χρήσης του σιέλου ως βιολογικού υλικού για την ανάλυση υαλουρονολυτικής δραστηριότητας και την πιθανή συμβολή του στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του λάρυγγα.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μια απ' τις κυριότερες αιτίες των καρκινο-εξαρτώμενων θανάτων μεταξύ ανδρών και γυναικών παγκοσμίως. Προέρχεται από την κακοήγη μεταλλαγή των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και εμφανίζει υψηλή τάση μετάστασης στους πνεύμονες και το ήπαρ.

Ο πιο σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για την μεταλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT), είναι ο SNAIL καθώς αυξάνεται σε καρκινικούς ιστούς και συσχετίζεται με την πρόοδο και μετάσταση του όγκου.

Τα εξωσώματα είναι κυστίδια τα οποία απελευθερώνονται κατά την εξωκύττωση των πολυκυστιδικών σωμάτων (MVBs) και περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1980. Τα εκτοσώματα (ή αλλιώς μικροκυστίδια) είναι κυστίδια που σχηματίζονται στην πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνονται από αυτή ενώ ο όρος της εξωκύττωσης είχε εισαχθεί το 1991. Τα εξωκυττάρια κυστίδια (EVs) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για τις δύο τάξεις κυστιδίων όταν αναφέρονται μαζί. Τα EVs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην φυσιολογία και παθολογία μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων και της μεταφοράς βιολογικής πληροφορίας από κύτταρο σε κύτταρο. Η πιθανή συμβολή τους στην ιατρική είναι η δυνατότητα ταυτοποίησης καινοτόμων βιοδεικτών, η βελτίωση της διάγνωσης και η στοχευμένη παράδοση φαρμάκων και ανθρώπινης γονιδιακής θεραπείας.

Η Γλυπικάνη-1 (GPC1) είναι μια πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαράνης, αγκυροβολημένη με GPI στη μεμβράνη και υπερεκφράζεται σε ποικίλους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων αυτών του μαστού και του παγκρέατος. Εν αντιθέσει με τα εξωσώματα που προέρχονται από μη-καρκινικές κυτταρικές σειρές, η πρωτεΐνη GPC1 ανιχνεύθηκε μόνο σε εξωσώματα από καρκινικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου.

Στόχος αυτού του μέρους της μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός της κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου MC38 και των σταθερών κλώνων SNAIL, καθώς και η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των MC38 εξωκυττάρων κυστιδίων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο SNAIL ενίσχυσε την EMT, όπως φάνηκε από την τροποποιημένη μορφολογία των κυττάρων και την μείωση της έκφρασης της E-καντχερίνης και του CDX2. Επιπρόσθετα, η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση της MMP-14 ήταν αυξημένη στα MC38 κύτταρα που υπερεκφράζουν τον SNAIL. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της MMP-9 και της pro-MMP2 στα προαναφερθέντα κύτταρα. In vitro μελέτες έδειξαν ότι ο SNAIL αύξησε την κυτταρική κινητικότητα των MC38. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε έκφραση της GPC1 στα EVs καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου για πρώτη φορά, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμία επίδραση του SNAIL στην έκφραση της GPC1 στα EVs.

Λέξεις κλειδιά: EMT, SNAIL, καρκίνος του παχέος εντέρου, καρκίνος του λάρυγγα, εξωκυττάρια κυστίδια, εξωσώματα, εκτοσώματα, σίελος, υαλουρονιδάση

ABSTRACT

Laryngeal cancer (2-5% of incidents per year-worldwide) belongs to a broader category of cancerous state, characterized as head and neck cancer, which demonstrates impressive heterogeneity concerning epidemiology, etiology and treatment. More specifically, about 98% of cases belong to squamous cell carcinoma (SCC) because cancer is detected on the larynx epithelium which is mainly formed by squamous cells, it can be developed at any part of the larynx (glottis: 50-60%, supraglottis: 30-40% and subglottis: 5% of incidents respectively) and the rate of its treatment is affected by its anatomic site. Finally, there is a paradox that, despite the lower number of incidents due to the improved standards of living, as years go by, the improved surgical and pharmaceutical treatment, the five-year life expectancy follows a declining trend.

Hyaluronidases belong to a family of hyaluronan-degrading enzymes which are crucial for the spreading of bacterial infections and toxins that are present in various poisons, as well as the promotion of cancer. Six genes have been identified in human genome so far (HYAL1, HYAL2, PH20, HYAL3, HYAL4, HYALP1) which occur in complexes of three, at two chromosomal regions. All of them hydrolyse HA, with HYAL4 and HYALP1 as possible exceptions, while only HYAL1, HYAL2 and PH20 are well characterized. HYAL1 is the main onco-derived HAase that exists in human plasma and urine and is expressed in various cancerous states. The isoforms of HYAL1 (HYAL1v1, HYAL1v2, HYAL1v3, HYAL1v4, HYAL1v5) and HYAL3 (HYAL3v1, HYAL3v2, HYAL3v3) occur with alternative splicing of three and four different exons respectively.

The objective of this part of the present work was the examination of the participation of all of the Hyal isoforms in laryngeal cancer and the clarification of the existence of stage-related expression (enzymatic activity) of specific genes – isoforms. All the above aim at early diagnosis with the use of HAs as molecular probes, as well as their possible exploitation as therapeutical targets for the effective treatment of the studied cancer.

During the experimental procedure and the processing of results, an increase of Hyal1wt, Hyal2wt, Hyal3wt was observed in cancer samples until stage III and then a decrease. Something similar was not observed for PH20, which might imply its smaller involvement in cancer progress. Additionally, isoforms v2 and v3 of Hyal3 were not detected. Moreover, the patients that were subjected to preoperative radiation showed increased levels of Hyal1wt, Hyal1v5 and PH20 and decreased levels of Hyal3 wt.

Finally, a test of saliva samples of the studied patients was performed using the method of zymography for measuring of the enzymatic activity. In samples of healthy donors there was almost no detection of HYAL-1, whereas in the samples of cancer patients there was a higher enzymatic activity which suggests the possible use of saliva as biological material for laryngeal cancer diagnosis.

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-associated death among men and women worldwide. It originates from malignant transformation of intestinal epithelial cells and it demonstrates a high tendency to spread metastases to the lung and liver.

The most important transcription factor for the conversion of epithelial cells to mesenchymal (EMT) is SNAIL, as it is increased in tumor tissues and correlates to progression and metastasis of the tumor.

Exosomes are vesicles which are released on the exo-cytosis of multivesicular bodies (MVBs) and were first described in the 1980s. Ectosomes (or microvesicles) are vesicles assembled at and released from the plasma membrane while the term of ectocytosis had been initiated in 1991. Extracellular Vesicles (EVs) is a term used for the two classes of vesicles when they are taken together. EVs play a key role in physiology & pathology through receptor activation and cell-to-cell transfer of biological information. Their possible role in advanced medicine is the identification of novel biomarkers, the improvement of diagnosis and targeted delivery of drug and human gene therapies.

Glypican-1 (GPC1) is an heparan sulfate proteoglycan, GPI-anchored to the membrane and overexpressed in a variety of cancers, including breast and pancreas cancer. In contrast to exosomes derived from non-tumorigenic cell lines, GPC1 protein was only detected in cancer cell-derived exosomes of pancreas cancer.

The aim of this part of the study was the characterization of murine colon adenocarcinoma MC38 cell line and Snail stable MC38 clones as well as the isolation and characterization of MC38 extracellular vesicles.

The obtained results showed that SNAIL induced epithelial-to-mesenchymal transition, as it was demonstrated by modified cell morphology and down-regulation of E-cadherin and CDX2 expression. Moreover, gene and protein expression of MMP-14 was upregulated in SNAIL overexpressing MC38 cells. Induction of MMP-9 and pro-MMP2 expression was also observed. Functional assays showed that SNAIL increased MC38 cell migration. Additionally, expression of GPC1 in EVs of colon cancer cells was detected for the first time, while no effect of SNAIL on the expression of GPC1 in the EVs was observed.

Keywords: Laryngeal cancer, Colon cancer, EMT, SNAIL, Extracellular vesicles, exosomes, ectosomes, saliva, hyaluronidase

Συντμήσεις & Όροι

APS υπερθειϊκό αμμώνιο
BSA βόεια αλβουμίνη ορού
cDNA συμπληρωματικό DNA
DAPI 4,6-διάμινο-2-φαινυλινδόλη
DMEM θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων
DMSO διμεθυλ-σουλφοξείδιο
DNA δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNase δεοξυριβονουκλεάση
dNTPs τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
ECL αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας
ECM εξωκυττάριος χώρος
EDTA αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ
EMT μεσεγχυματικός μετασχηματισμός επιθηλιακών κυττάρων
EVs εξωκυττάρια κυστίδια
F-actin νηματοειδής ακτίνη
FBS βόειος εμβρυϊκός ορός
GAPDH δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης
G418 γενιτισίνη, αντιβιοτικό επιλογής
kDa 10³ x 1/12 της μάζας του ατόμου του ισότοπου ¹²C
MC38 κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου προερχόμενα από ποντίκι
MET μετάβαση μεσεγχύματος-επιθηλίου
MMPs μεταλλοπρωτεϊνάσες του εξωκυτταρίου χώρου
MMP2, MMP9 ζελατινάσες
mRNA μηνυματοφόρο RNA
Oligo dT αλληλουχίες ολιγο-δεοξυ-θυμιδίνης
PBS ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNA ριβονουκλεϊκό οξύ
RNase ριβονουκλεάση
RPMI θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων
RT θερμοκρασία δωματίου
Rtase αντίστροφη μεταγραφάση
SDS θειικό δωδεκυλικό νάτριο
SNAIL μεταγραφικός παράγοντας
TEMED N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη
Tris τρις-υδροξυμεθυλαμινο μεθάνιο
Triton X-100 ισοοκτυλ-φαινοξυ-πολυαιθοξυ-αιθανόλη

Περιεχόμενα

ΜΕΡΟΣ Α'	5
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	7
1.1 Γενικά περί καρκίνου	7
1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου	8
2. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ	10
2.1 Συστατικά του ECM	122
2.1.1 Πρωτεογλυκάνες (PGs)	122
2.1.2 Εξωκυττάρια πρωτεΐνες	133
2.1.2.1 Εξωκυττάρια Μεταλλοπρωτεΐνες	13
2.1.2.2 Ζελατινικές	14
3. EMT: EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION	15
3.1 ΓΕΝΙΚΑ	15
3.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ EMT	16
3.3 Βιοδείκτες της μετάβασης επιθηλίου-μεσεγχύματος	17
3.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ SNAIL	18
3.4.1 ΓΕΝΙΚΑ	18
3.4.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας SNAIL στον καρκίνο	18
4. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ	19
4.1 Γενικά	19
4.2 Τα EVs στην φυσιολογία, παθολογία και την προηγμένη ιατρική	20
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	23
1.1 Κυτταρικές καλλιέργειες και μετασχηματισμός των κυττάρων του παχέος εντέρου	23
1.2 Συνθήκες καλλιέργειας και χημικά αντιδραστήρια	24
1.3. Μικροσκόπια αντίστροφης φάσης	24
1.4. Απομόνωση εξωκυττάρων κυστιδίων – EVs ISOLATION	24
1.5. In vitro μελέτη της κυτταρικής κινητικότητας - MIGRATION ASSAY	25
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ	25
2.1 Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές καλλιέργειες	25
2.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	26
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (REAL TIME-PCR)	26
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	27

3.1 Συλλογή κυτταρικών εκχυλισμάτων και μέσων καλλιέργειας-συμπύκνωση υπερκείμενων	27
3.2 Μέθοδος Bradford για υπολογισμό ολικής πρωτεΐνης	27
3.3 Μέθοδος Ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting)	27
4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (IMMUNOCYTOCHEMISTRY), ICC	30
5. ΖΕΛΑΤΙΝΟΓΡΑΦΗΜΑ	31
6. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ MMP-14	31
7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΚΛΩΝΩΝ SNAIL1-MC38	33
1.1 Μορφολογία των MC38-WT, Mock-MC38 και των κλώνων που υπερεκφράζουν τον SNAIL1	33
1.2 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του SNAIL1	33
1.3 Μελέτη της κατανομής της E-CADH σε κυτταρικό επίπεδο	34
1.4 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της E-CADH	35
1.5 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της β-Catenin (β-CTN)	36
1.6 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της β1 υπομονάδας ιντεγκρίνης	36
1.7 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της ενδογενούς Λουμικάνης (Lum)	37
1.8 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του CDX2	37
1.9 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP-14	38
1.10 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της MMP-14	39
1.11 Μελέτη της ενεργότητας της μεμβρανοσύνδετης MMP-14 στην καρκινική σειρά MC38	39
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΖΕΛΑΤΙΝΑΣΩΝ MMP-2, MMP-9	40
3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ SNAIL1 ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MC-3840	
4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ (EVS)	42
4.1 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της HSP90	42
4.2 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της Γλυπικάνης 1 (GPC1)	42
4.3 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της Γλυπικάνης 1 στα εξωκυττάρια κυστίδια και στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την απομόνωσή τους	43
4.4 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της Λουμικάνης στα εξωκυττάρια κυστίδια και στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την απομόνωσή τους	44
4.5 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της υπομονάδας ιντεγκρίνης β1 στα εξωκυττάρια κυστίδια και στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την απομόνωσή τους	45
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
ΜΕΡΟΣ Β'	51
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΛΑΡΥΓΓΑ	53

1.1 Γενική εισαγωγή.....	53
1.2 Ταξινόμηση	54
1.3 Επιδημιολογία.....	55
1.4 Αιτιολογία.....	56
1.5 Συμπτώματα.....	56
1.6 Πρόγνωση - Σταδιοποίηση	56
1.7 Βιοδείκτες	59
2. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΕΣ (HYALs).....	60
2.1. Ιδιότητες των ανθρώπινων υαλουρονιδασών.....	61
2.2 Δομές και μηχανισμοί δράσης της ανθρώπινης υαλουρονιδάσης.....	64
2.3 Καταβολικό σχήμα του HA	68
2.4 Γονιδιακή έκφραση υαλουρονιδασών και καρκίνος	69
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	71
1.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	71
1.1 Απομόνωση RNA από ιστό λάρυγγα.....	72
1.2 Κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφική (RT-PCR)	72
1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	74
1.4 Ζυμογράφημα για την ανίχνευση υαλουρονιδασών.....	74
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL-1	77
1.1 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 736bp	77
1.2 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 208bp	80
1.3 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 977bp	80
1.4 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 79bp	81
2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ V4 ΚΑΙ V5 ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ HYAL-1 (361BP ΚΑΙ 211BP	
ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ).....	82
3. Γονιδιακή έκφραση της RH20 (204bp).....	83
4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL2WT (510BP)	84
5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL3WT/V1 (512/422BP)	85
6. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL3V2/V3 (286BP/193BP)	86
7. ΣΤΑΔΙΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ – ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΘΕΣΗ	87
8. ΕΠΙΠΕΔΑ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΩΝ – ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ (RT)	89
9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΣΙΕΛΟ.....	90
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΩΝ	94
ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΣΙΕΛΟ.....	96

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99
--------------------	----

ΜΕΡΟΣ Α΄

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

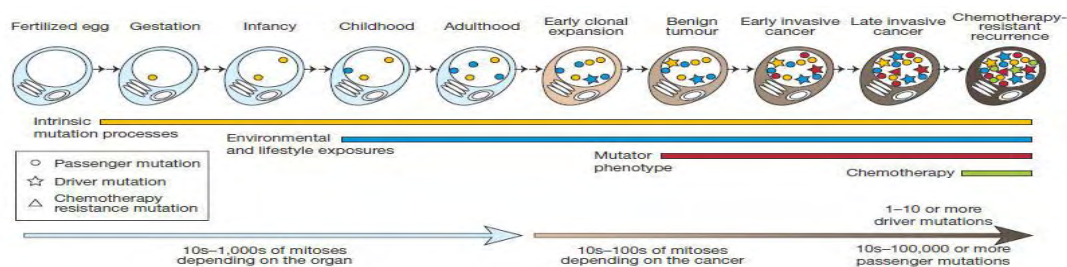
1.ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1 Γενικά περί καρκίνου

Ο όρος «καρκίνος» αναφέρεται σε μία ετερογενή ομάδα νοσημάτων που ποικίλουν ως προς τους παράγοντες κινδύνου, την επιδημιολογία, τις κλινικές εκδηλώσεις, την πορεία, την αντιμετώπιση και την πρόγνωση. Κοινός παρονομαστής των νοσημάτων αυτών είναι η αλλοίωση του γονιδιώματος, η οποία προκύπτει από την άθροιση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές ωθούν το καρκινικό κύτταρο σε μία κατάσταση ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και αλλαγής της μορφολογίας (Kim and Hahn 2007).

Η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή εξελικτική διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα περνούν από την «κανονικότητα» σε μία κατάσταση υψηλής κακοήθειας μέσω μίας σειράς προκαρκινωματοδών μορφών (Foulds, 1954). Το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων υφίσταται μόνιμες μεταβολές σε πολλαπλά σημεία, υπό την επίδραση ενδογενών και/ή εξωγενών παραγόντων.

Οι μεταβολές αυτές, γνωστές ως σωματικές μεταλλάξεις, ποικίλουν από σημειακές μεταλλάξεις (μεταπτώσεις, αντικαταστάσεις, ελλείψεις, προσθήκες) έως αλλαγές στη μορφολογία και τον αριθμό των χρωμοσωμάτων (δομικές και αριθμητικές ατυπίες). Επιπροσθέτως, νέες αλληλουχίες DNA είναι δυνατόν να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα ενός κυττάρου από εξωγενείς πηγές όπως είναι οι ιοί HPV, EBV, HBV, HTLV 1 και HHV 8, οι οποίοι συμβάλλουν στη γένεση διαφόρων τύπων καρκίνου (Talbot and Crawford 2004). Οι επιγενετικές μεταβολές τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης και τη γονιδιακή έκφραση μεταβάλλοντας την κατάσταση μεθυλίωσης υπολειμμάτων κυτοσίνης. Τέλος, σωματικές μεταλλάξεις περιγράφονται στο μιτοχονδριακό κυκλικό γονιδίωμα ορισμένων τύπων καρκίνου, η σημασία των οποίων ωστόσο στην καρκινογένεση δεν έχει διευκρινιστεί (Chatterjee et al., 2006).



Εικόνα 1. Εκδήλωση του καρκινικού φαινότυπου υπό την επίδραση νέων μεταλλάξεων κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Η παθογένεση του καρκίνου φαίνεται ότι ακολουθεί το Δαρβινικό μοντέλο εξέλιξης κατά το οποίο η προερχόμενη από τυχαίες μεταλλάξεις κληρονομήσιμη γενετική παραλλαγή υφίσταται την πίεση της φυσικής επιλογής. Οι σωματικές μεταλλάξεις στο καρκινικό κύτταρο συσσωρεύονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ασθενούς. Κάποιες από αυτές συμβαίνουν στα αρχικά εκείνα στάδια κατά τα οποία τα κύτταρα δεν εκδηλώνουν καρκινικό φαινότυπο. Καθώς εξελίσσεται η καρκινογένεση ο καρκινικός φαινότυπος εκδηλώνεται υπό την επίδραση νέων μεταλλάξεων (**Εικόνα 1**).

Για την εξήγηση του φαινομένου της καρκινογένεσης οι Hanahan και Weinberg πρότειναν ένα μοντέλο βασισμένο σε έξι απαραίτητες μεταβολές της φυσιολογίας του κυττάρου (**Εικόνα 2**), κοινές σε πολλούς και ίσως σε κάθε τύπο καρκίνου, οι οποίες συνοψίζονται στα εξής (Hanahan and Weinberg, 2000).



Εικόνα 2. Επίκτητες ιδιότητες καρκίνου

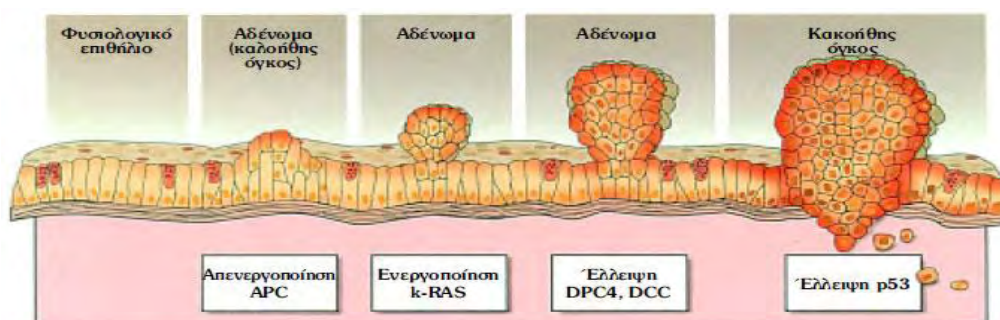
1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Με τον όρο καρκίνος παχέος εντέρου εννοούμε το κακοήθες εκείνο νεόπλασμα το οποίο αναπτύσσεται στο παχύ έντερο ή στο ορθό. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ένας από τους συχνότερους καρκίνους στον κόσμο. Υπολογίζεται ότι πλέον άνω των 400.000 νέων περιπτώσεων διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο στην Ευρώπη από τους οποίους οι μισοί θα πεθάνουν εξ αιτίας του καρκίνου.

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου αρχικά δημιουργείται ένα μικρό καλοήθες νεόπλασμα (αδένωμα ή πολύποδας) το οποίο σταδιακά εξελίσσεται σε όλο και μεγαλύτερο, για να καταλήξει, αν δεν αφαιρεθεί, σε κακοήθες μεταστατικό καρκίνωμα. Η προδιάθεση για καρκινογένεση μπορεί να οφείλεται σε κληρονομικά αίτια. Μερικοί τύποι καρκίνου εμφανίζονται πολύ νωρίς (μέσα στα πρώτα 10-20 χρόνια) ενώ συνήθως η πλήρης ανάπτυξη του καρκίνου διαρκεί 30-40 χρόνια. Σε πολλές περιπτώσεις αυτό οφείλεται στο ότι το άτομο κληρονομεί από κάποιον από τους γονείς του ένα γονίδιο που επάγει την καρκινογένεση. Επειδή μεταλλαγμένα γονίδια στα γεννητικά κύτταρα περνούν από γενιά σε γενιά, πολλά μέλη της οικογένειας εμφανίζουν υψηλό βαθμό πρώιμης ανάπτυξης καρκίνου. Παραδείγματα αποτελούν η οικογενής πολυποδίαση του παχέος εντέρου που οφείλεται στην κληρονόμηση του μεταλλαγμένου ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC.

Διάφοροι τέτοιοι καρκίνοι εμφανίζονται και σποραδικά. Στην κληρονομούμενη όμως μορφή έχουμε συνήθως πολλαπλούς πρωτογενείς όγκους, πράγμα σπάνιο για τους σποραδικούς. Π.χ. τα μέλη των οικογενειών με οικογενή πολυποδίαση του παχέος εντέρου, αναπτύσσουν μερικές χιλιάδες πολύποδες μέσα στα πρώτα χρόνια της ηλικίας τους, μερικοί από τους οποίους θα εξελιχθούν σε καρκινώματα.

Ο Bert Vogelstein και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι στη δημιουργία καρκινωμάτων του παχέος εντέρου επιτελούνται οι ακόλουθες γενετικές μεταλλαγές. Το ογκογονίδιο RASK μεταλλάσσεται και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια APC, DCC και p53 απενεργοποιούνται ή χάνονται. Η διαπίστωση αυτή σε συνδυασμό με την εξέταση δειγμάτων από χειρουργική επέμβαση από τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, έδειξαν μια σταθερή αλληλουχία γεγονότων. Στα αρχικά στάδια του καρκίνου απενεργοποιείται το γονίδιο APC, οπότε επιτρέπεται ο πολλαπλασιασμός ενός πληθυσμού κυττάρων. Κατόπιν, διαπιστώνεται συχνά μεταλλαγή στο γονίδιο RASK (αρχή αδενώματος) και ακολουθούν στη σειρά μεταλλαγές στα γονίδια DCC και p53, που χαρακτηρίζουν το τελικό στάδιο του αδενώματος και την αρχή του καρκινώματος αντίστοιχα.



Εικόνα 3: Γονιδιακές μεταλλάξεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου (RASK: ογκογονίδιο. APC, DCC, p53: ογκοκατασταλτικά γονίδια)

2. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ

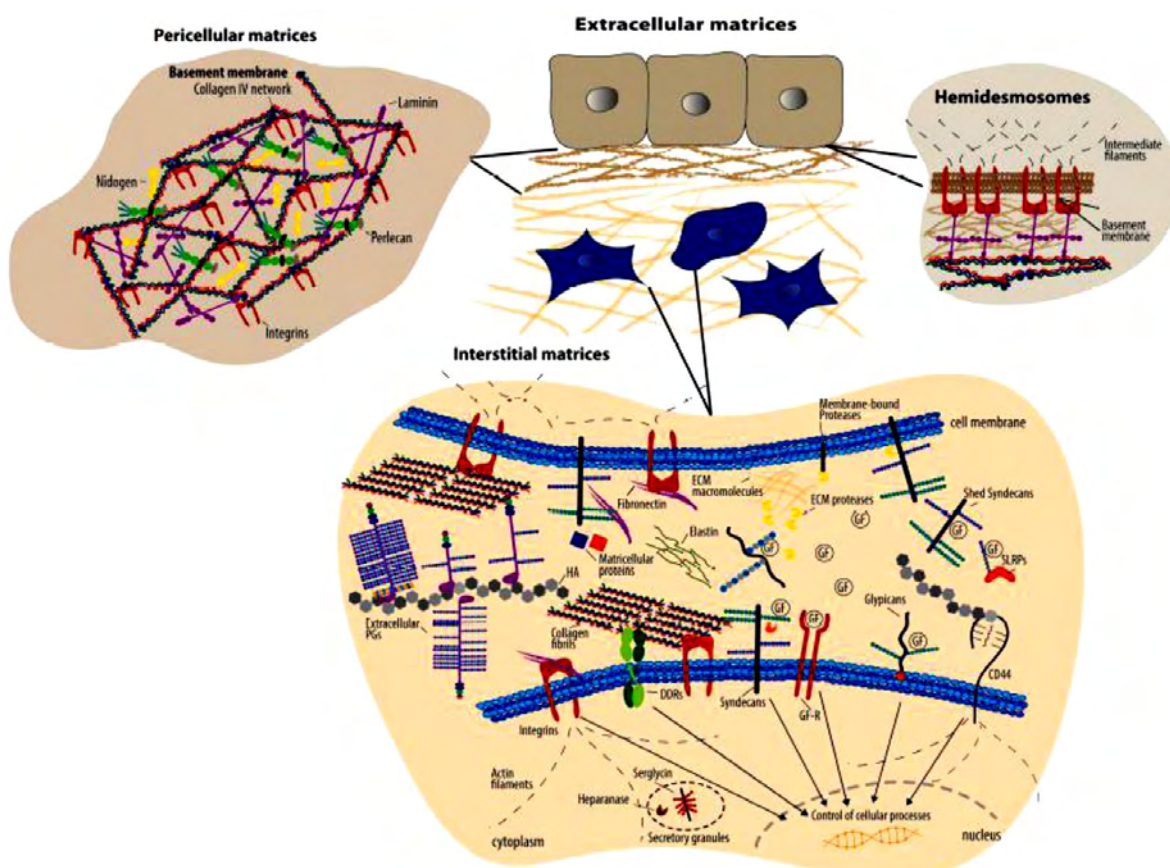
Ο εξωκυττάριος χώρος (ECM) είναι ένα μη-κυτταρικό τρισδιάστατο μακρομοριακό δίκτυο που αποτελείται από κολλαγόνα, πρωτεογλυκάνες / γλυκοζαμινογλυκάνες, ελασίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνες, και αρκετές άλλες γλυκοπρωτεΐνες. Τα συστατικά του δεσμεύονται μεταξύ τους όπως επίσης και με υποδοχείς κυτταρικής προσκόλλησης, σχηματίζοντας ένα πολύπλοκο δίκτυο εντός του οποίου τα κύτταρα κατοικούν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα. Οι υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας μεταγούν σήματα σε κύτταρα από τον ECM, τα οποία ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως την επιβίωση, την ανάπτυξη, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση, και είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση φυσιολογικής ομοιοστασίας. Ο ECM είναι ένα ιδιαίτερα δυναμικό δομικό δίκτυο που υφίσταται συνεχώς αναδιαμόρφωση, η οποία διαμεσολαβείται από αρκετά ένζυμα αποδόμησης κατά κανονικές και παθολογικές συνθήκες. Απορρύθμιση της σύνθεσης και δομής του ECM σχετίζεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη πολλών παθολογικών καταστάσεων (Theocharis et al., 2015).

Οι διαφορετικοί τύποι εξωκυττάριου χώρου αποτελούνται από ποικιλία μακρομορίων, των οποίων η ακριβής σύνθεση και δομή διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Στους περισσότερους ιστούς, το κολλαγόνο τύπου I και το κολλαγόνο τύπου II, που σχηματίζουν ινίδια, είναι τα κύρια συστατικά των ECMs. Συνδεδεμένα με άλλα κολλαγόνα, καθώς και πρωτεΐνες του ECM και PGs σχηματίζουν μεγάλες ινώδεις δομές. Αυτές οι πολυμοριακές δομές διασυνδέονται και μεταξύ τους, συνθέτοντας αυτό το πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο (Theocharis et al., 2012). Ο ECM ταξινομείται σε 2 βασικούς τύπους, οι οποίοι διαφέρουν σε δομή και σύνθεση, τον διάμεσο και τον περικυτταρικό (Εικόνα 3). Ο διάμεσος περιβάλλει τα κύτταρα, ενώ ο περικυτταρικός είναι σε στενή επαφή με τα κύτταρα. Η βασική μεμβράνη, που είναι ένας περικυτταρικός τύπος ECM, βρίσκεται μεταξύ παρεγχύματος και συνδετικού ιστού και σχηματίζεται από ένα δίκτυο κολλαγόνου τύπου IV, λαμινίνες, φιβρονεκτίνη, εντακτίνη 1 και 2 και πρωτεογλυκάνες (περλεκάνη, αγκρίνη, κολλαγόνο τύπου XV και κολλαγόνο τύπου XV) (LeBleu et al., 2007). Πιο γενικευμένα, αποτελείται από ένα πολυμερές λαμινίνης που κυρίως παρέχει σημεία επιθηλιακής κυτταρικής προσκόλλησης και ένα δίκτυο κολλαγόνου τύπου IV που σταθεροποιεί την όλη δομή. Και τα δύο δίκτυα αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά της βασικής μεμβράνης που δρουν σαν κυτταρικές διασυνδέσεις διασυνδέοντας τα δύο δίκτυα (Halfter et al., 2015).

Κύτταρα τα οποία είναι ενσωματωμένα στον ECM αλληλεπιδρούν με αυτό το μακρομοριακό δίκτυο μέσω των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειάς τους, όπως είναι ιντεγκρίνες, PGs της κυτταρικής επιφάνειας, και τον υποδοχέα του υαλουρονικού, CD44. Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα αφομοιώνουν σήματα από τους ECMs που καθορίζουν τις λειτουργίες και τη συμπεριφορά τους (Εικόνα 4).

Οι ECMs είναι καθοριστικοί για την φυσιολογική ομοιόσταση, αλλά επίσης πολλά σύνδρομα και παθολογικές/θανατηφόρες καταστάσεις προκύπτουν από ανωμαλίες στα συστατικά του ECM που αναδεικνύουν τα μόρια του ECM ως πιθανούς στόχους για στοχευμένη φαρμακολογική θεραπεία (Jarvelainen et al., 2009). Η αναδιαμόρφωση του ECM μπορεί να συμβεί μέσω ενζύμων όπως είναι οι εξωκυττάριες μεταλλοπρωτεάσες (MMPs), οι αδαμαλυσίνες (ADAMs), οι αδαμαλυσίνες με μοτίβα θρομβοσπονδίνης (ADAMTSs), οι ενεργοποιητές πλασμινογόνου κ.α. (Vlodavsky et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης λαμβάνουν χώρα σημαντικές μεταβολές στους ECMs, οι οποίες οδηγούν στον σχηματισμό ινώδους στρώματος με αυξημένη ακαμψία, υπέρμετρη εναπόθεση συστατικών του ECM και απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων που -υπό ενεργοποίηση- οδηγούν σε έναν μη ομαλό ανασχηματισμό του ECM (Lu et al., 2012).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών εξωκυττάρων χώρων, των βασικών συστατικών που τα συνθέτουν και των κύριων υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας (Theocharis et al., 2015)

2.1 Συστατικά του ECM

2.1.1 Πρωτεογλυκάνες (PGs)

Οι πρωτεογλυκάνες είναι δομικώς και λειτουργικώς σημαντικά βιομόρια στους ιστούς. Αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό κορμό, υποκατεστημένο με ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs), όπως θειική χονδροϊτίνη (CS), θειική δερματάνη (DS), θειική κερατάνη, ηπαρίνη (Hep) και θειική ηπαράνη (HS). Το υαλουρονικό είναι η μόνη GAG που συντίθενται σε ελεύθερη μορφή και όχι πάνω σε πρωτεϊνικό κορμό. Οι GAGs είναι γραμμικοί, αρνητικά φορτισμένοι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δισακχαρτικές μονάδες ακετυλιωμένων εξοζαμινών (N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη ή N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη) και ουρονικών οξέων (D-γλυκουρονικό οξύ ή L-ιδουρονικού οξύ) και είναι θειωμένες σε διάφορες θέσεις. Η θειική κερατάνη είναι η μόνη GAG που αποτελείται από επαναλαμβανόμενους δισακχαρίτες που περιέχουν N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη και γαλακτόζη (Theocharis et al., 2010).

Όπως προτάθηκε πρόσφατα, οι PGs μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριες οικογένειες: ενδοκυτταρικές, κυτταρικής επιφάνειας, περικυτταρικές-βασικής μεμβράνης και εξωκυτταρικές, ανάλογα με τον κυτταρικό και υποκυτταρικό εντοπισμό, την ομολογία πρωτεϊνικής αλληλουχίας και την παρουσία μοναδικών πρωτεϊνικών μονάδων.

- ✓ Εξωκυττάρειες πρωτεογλυκάνες:
 - Υαλεκτάνες (hyalactans): Βερσικάνη (Versican), Αγγρικάνη (Aggrecan) Neurocan και Μπρεβικάνη (Brevican).
 - Μικρού μεγέθους πλούσιες σε λευκίνη (SLRPs): Διακοσμητίνη (Decorin), Διγλυκάνη (Biglycan), Ινομοντουλίνη (Fibromodulin) και **Λουμικάνη** (Lumican).
- ✓ PGs της βασικής μεμβράνης: Περλεκάνη (Perlecan), Agrin, κολλαγόνο τύπου XVIII (collagen XVIII).
- ✓ PGs της κυτταρικής επιφάνειας:
 - Συνδεκάνες (Syndecans), οι οποίες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου
 - **Γλυπικάνες** (Glypicans), οι οποίες συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη με μια άγκυρα γλυκοσυλ- φωσφατιδυλινοσιτόλης.
- ✓ Ενδοκυτταρικές PGs:
Σεργλυκίνη (serglycin): η μόνη ενδοκυτταρική πρωτεογλυκάνη που έχει χαρακτηριστεί έως σήμερα (Iozzo et al., 1998) (Schaefer et al., 2010).
- ✓ Υαλουρονικό (HA)

2.1.2 Εξωκυττάρια πρωτεΐνες

Είναι μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών μέσω της υδρόλυσης πεπτιδικών δεσμών σε πεπτίδια ή αμινοξέα στα τερματικά τους άκρα (εξωπεπτιδάσες) ή εντός της πεπτιδικής αλυσίδας (ενδοπεπτιδάσες) (Nagase et al., 2001). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως εφόσον αποτελούν περισσότερο από 2% των συνολικών γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος, η συμβολή τους σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες αφορά το ρόλο, τον εντοπισμό και τη δραστικότητα πλήθους πρωτεϊνών, διαμορφώνοντας τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και της δημιουργίας νέων βιοδραστικών μορίων. Παρόλα αυτά συμβάλλουν σε όλα τα στάδια της εξέλιξης του όγκου, συμπεριλαμβανομένων: ανάπτυξη και επιβίωση των όγκων, αγγειογένεση, κυτταρική διήθηση, κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, μετάβαση από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο. Παράγονται όχι μόνο από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και από το μικροπεριβάλλον του όγκου (Gialeli et al., 2011; Curran et al., 2000). Εντοπίζονται ενδοκυτταρικά, στην κυτταρική επιφάνεια και εξωκυττάρια, και περιλαμβάνουν:

- ✓ Μεταλλοπρωτεΐνες
- ✓ Πρωτεάσες σερίνης
- ✓ Πρωτεάσες κυστεΐνης
- ✓ Πρωτεάσες ασπαρτικού οξέος
- ✓ Πρωτεάσες θρεονίνης

2.1.2.1 Εξωκυττάρια Μεταλλοπρωτεΐνες

Οι εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεΐνες αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία πρωτεϊνών. Έχουν μια κοινή δομή, η οποία αποτελείται από το σηματοδοτικό πεπτίδιο στο άμινο τελικό άκρο μεγέθους 17-30 αμινοξέων, το προ-πεπτίδιο (ζυμογόνο), το οποίο μέσω ενός συντηρημένου καταλοίπου κυστεΐνης αλληλεπιδρώντας με τον ψευδάργυρο στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου καθιστά το ένζυμο σε μία αδρανή μορφή, την καταλυτική περιοχή, η οποία είναι εξαρτημένη από ψευδάργυρο και ασβέστιο.

Ακολουθούν το μοτίβο HEXXHXXGXCH που περιέχει τρεις καλά συντηρημένες ιστιδίνες που συνεργάζονται με το ιόν Zn^{2+} καθώς και μια συντηρημένη μεθειονίνη, η οποία σχηματίζει “στροφή-μεθειονίνης” (Mettturn) 8 αμινοξέα μετά το μοτίβο που δένει ο Zn, στηρίζοντας κατ’ αυτόν τον τρόπο τη δομή γύρω από τον καταλυτικό Zn, την περιοχή σύζευξης (hinge ή linker) η οποία δεν έχει συγκεκριμένη δομή και την περιοχή όμοια με αιμοπηξίνη στο καρβόξυ τελικό άκρο.

Αρχικά συντίθενται ως ανενεργά ζυμογόνα, με μορφή προ-πεπτιδίου. Όταν το προ-

πεπτιδίο αφαιρεθεί από το μόριο, τότε προκύπτει η ενεργός μορφή του ενζύμου.

Παρόλα αυτά υπάρχουν εξαιρέσεις όσον αφορά την δομή όπως παραδείγματος χάριν οι MMP-7, MMP-26 και MMP-23 οι οποίες δεν διαθέτουν περιοχή αιμοπηξίνης.

Οι MMPs, οι ADAMs και ADAMTSs αποτελούν μερικά από τα μέλη αυτής της οικογένειας που έχουν μελετηθεί περισσότερο.

Οι MMPs ταξινομούνται σε έξι ομάδες: Κολλαγονάσες, ζελατινάσες, στρωμαλυσίνες, ματριλυσίνες, MT-MMPs και άλλες MMPs (Visse et al., 2003). Μια εξαρτώμενη από ψευδάργυρο οικογένεια πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις MMPs είναι και οι ADAMTSs.

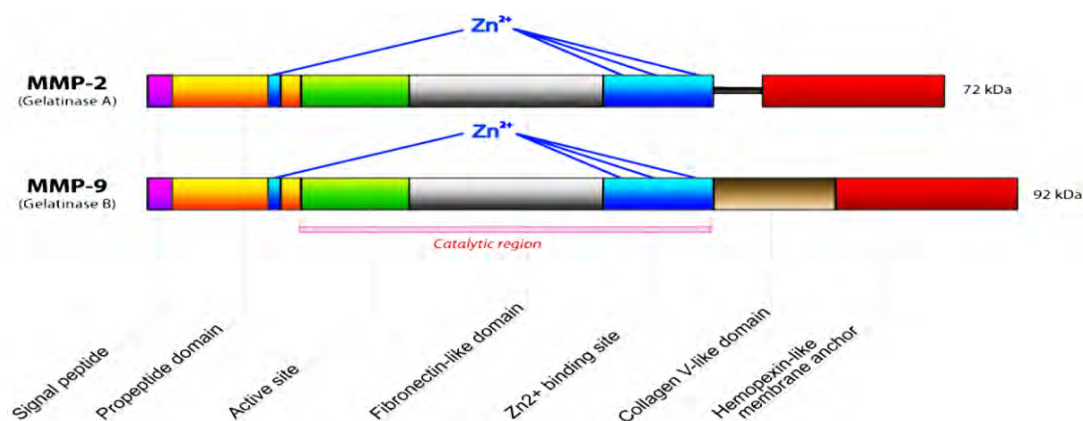
2.1.2.2 Ζελατινάσες

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι MMP-2 (ζελατινάση Α), και MMP-9 (ζελατινάση Β) οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα διάσπασης των μετουσιωμένων κολλαγόνων, των ζελατινών καθώς και πλήθος άλλων μορίων της εξωκυττάριας ουσίας συμπεριλαμβανομένων των κολλαγόνων τύπου IV, V και XI, της λαμινίνης και της αγγικάνης. Και τα δύο ένζυμα διαθέτουν τρεις επαναλήψεις ινονεκτίνης τύπου II στην καταλυτική περιοχή. Η προ-MMP-2 έχει μοριακή μάζα 72 kDa, και η προ-MMP-9 92 kDa.

Σε αντίθεση με την MMP-9, η MMP-2 δύναται να διασπάσει και τα κολλαγόνο τύπου I, II και III κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν των κλασικών κολλαγονασών (Aimes and Quigley 1995; Patterson et al., 2001) αν και η δράση αυτή εκδηλώνεται ασθενέστερα. Η ενεργοποιημένη από τις συνδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη MT-MMPs, MMP-2 συγκεντρώνεται περικυτταρικά και αναπτύσσει σημαντική κολλαγονολυτική δραστηριότητα. Επιπλέον δρα συνεργικά διασπώντας σε μικρότερα τμήματα ήδη διασπασμένα από τις κολλαγονάσες μόρια κολλαγόνου αφού αυτά μετουσιώνονται σε θερμοκρασία σώματος (Murphy, et al. 1985).

Πιο συγκεκριμένα, η MMP-2 αποικοδομεί το κολλαγόνο V, VII και X, την ελαστίνη, την ινονεκτίνη και τη λαμνίνη, ενώ ενεργοποιεί ταυτόχρονα την proMMP-1 και proMMP-9. Εκφράζεται από τους περισσότερους τύπους κυττάρων και είναι σημαντική για την κυτταρική μετανάστευση σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η μορφογένεση, αλλά και κατά τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια όπου προσδένεται με το καρβοξυτελικό της άκρο είτε στην ιντεγκρίνη ανβ3 είτε στο σύμπλοκο MMP-14/TIMP-2. Αφού προσδεθεί, το καταλυτικό της άκρο αποκαλύπτεται και ενεργοποιείται. Η MMP-9 περιέχει επιπλέον και μια περιοχή ομόλογη του κολλαγόνου V μεταξύ της καταλυτικής περιοχής και αυτής της αιμοπηξίνης. Καταλύει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου τύπου IV, V, XI και της ελαστίνης. Παράγεται και εκκρίνεται από πολλά κύτταρα, μεταξύ των οποίων και τα μονοκύτταρα και η παραγωγή της αυξάνεται όταν τα κύτταρα αυτά

διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα. Τα επίπεδα των MMP 2 και 9, οι οποίες αποτελούν βασικούς παράγοντες για την αναδιαμόρφωση του ECM ρυθμίζονται μέσω θρομβοσπονδίνης (Hirose et al., 2008). Η MMP-9 έχει βρεθεί ότι συνδέεται με πολυάριθμες παθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των αυτοάνοσων και των καρδιαγγειακών παθήσεων.



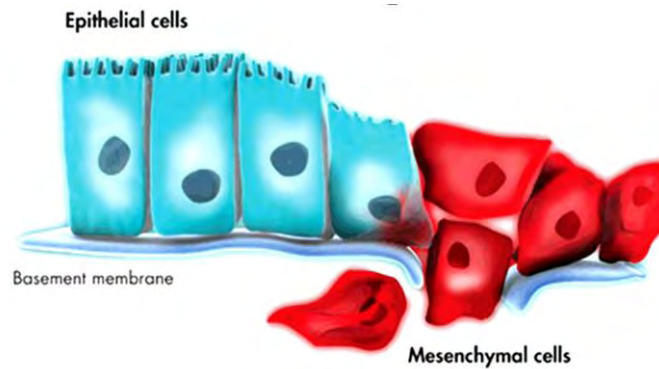
Εικόνα 5: Δομή των MMP-2, MMP-9.

3. EMT: EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο καρκίνος αποτελεί μια νόσο που χαρακτηρίζεται από απρόσκοπτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η πλειοψηφία των ανθρώπινων κακοηθειών είναι καρκινώματα, και η συχνότητα εμφάνισης των μεταστάσεων λόγω εξέλιξης του όγκου είναι ο λόγος που δόθηκε στη πλειονότητα της θνησιμότητας που σχετίζεται με τον καρκίνο (Ingber et al., 2002; Iwatsuki et al., 2010). Καθώς η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων η οποία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση των γενετικών ελαττωμάτων και μεταλλάξεων που ανακλώνται από αλλαγές εμφανείς σε μοριακό επίπεδο, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου και τις μετέπειτα μεταστάσεις είναι ζωτικής σημασίας ερωτήματα στην κατανόηση του καρκίνου.

Η μετάβαση επιθηλίου-μεσεγχύματος (EMT) είναι ένα τέτοιο πολύπλευρο μοριακό πρόγραμμα κατά τον κακοήγη μετασχηματισμό που προκαλεί την απώλεια των επιθηλιακών χαρακτηριστικών και απόκτηση μεσεγχυματικού φαινοτύπου (Kalluri et al., 2009). Η EMT πιστεύεται ότι είναι ένας ζωτικός μηχανισμός για την πρόοδο του καρκίνου και συσχετίζεται με την επιθετική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων (Kalluri et al., 2009; Lee et al., 2006). Επιπροσθέτως, εμπλέκεται στην μορφογένεση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και αποτελεί σημαντικό μηχανισμό για το αρχικό βήμα της μετάστασης.



Εικόνα 6: EMT μετάβαση (Angadi et al., 2016)

3.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ EMT

Οι EMT προκύπτουν σε τρεις διαφορετικές ρυθμίσεις με ανόμοιες λειτουργικές συνέπειες (Lee et al., 2012).

Τύπος 1

Η EMT που συσχετίζεται με την εμβρυογένεση παράγει πρωτογενή μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία μπορούν να περάσουν μέσα από επακόλουθη MET να προκαλέσουν δευτερεύοντα επιθήλια. Έχει αποδειχθεί κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης του εμβρύου, την ανάπτυξη του πλακούντα, κατά τη διάρκεια γαστριδίσωσης για τη δημιουργία των τριών βλαστικών στοιβάδων και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μεταναστευτικών κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (Kalluri et al., 2009; Lee et al., 2012).

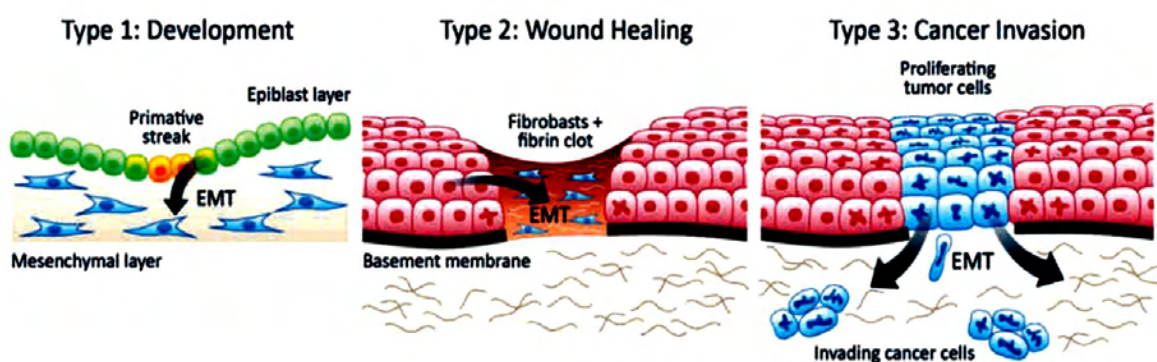
Τύπος 2

Πρόκειται για την EMT που συνδέεται με την επούλωση των πληγών. Εδώ, το πρόγραμμα EMT ξεκινά ως επισκευή συνδεδεμένη με διαδικασία δημιουργίας ινοβλαστών και άλλων κυττάρων για την ανασυγκρότηση των ιστών μετά από τραυματισμό και φλεγμονώδη βλάβη. Αυτό το πρόγραμμα τελειώνει γενικά μόλις η φλεγμονή υποχωρεί, αλλά στην ίνωση, η EMT τύπου 2 οδηγεί σε βλάβη οργάνων λόγω της ασταμάτητης απόκρισής της στην συνεχή φλεγμονή (Kalluri et al., 2009; Lee et al., 2012).

Τύπος 3

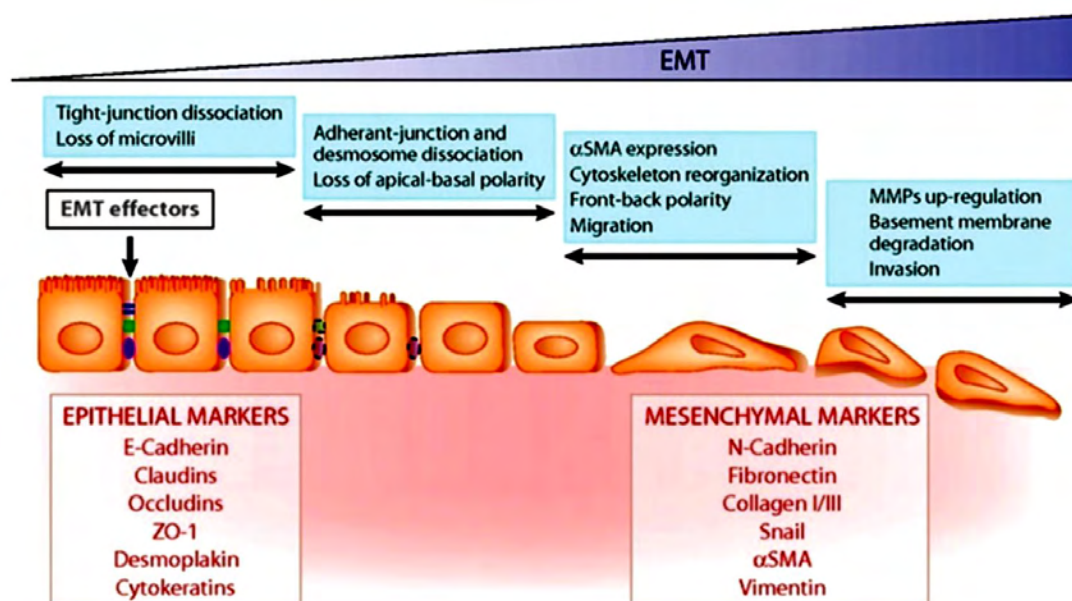
Η EMT σε νεοπλασματικά κύτταρα είναι συνδεδεμένη με γενετικά και επιγενετικά γεγονότα, τα οποία εμπεριέχουν γονίδια που υποστηρίζουν ιδιαίτερα τον κλωνικό πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό εντοπισμένων όγκων. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια που συμπράτουν με το ρυθμιστικό σύστημα της EMT, οδηγώντας σε εισβολή διαμέσου της βασικής μεμβράνης και επακόλουθη μετάσταση σε μακρινές τοποθεσίες σηματοδοτώντας την έναρξη των τερματικών σταδίων της πολυσταδιακή διαδικασία της

καρκινογένεσης. Η ενεργοποίηση της EMT τύπου 3 φαίνεται να είναι ο θεμελιώδης μηχανισμός για την επίτευξη κακοήθους φαινοτύπου από τα καρκινικά κύτταρα με συνέπειες απειλητικές για τη ζωή. Μία προφανής αντίφαση είναι η παρατήρηση ότι τα καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από EMT τυπικά δημιουργούν δευτερεύουσες αποικίες σε απομακρυσμένες θέσεις που μοιάζουν ιστοπαθολογικά με τον πρωτογενή όγκο από τον οποίο προήλθαν. Για παράδειγμα, δεν εμφανίζουν πλέον τον μεσεγχυματικό φαινότυπο που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα που μεθίστανται. Έτσι, η EMT διευκολύνει τη μεταστατική διάδοση αλλά απαιτεί ότι αυτά τα κύτταρα θα πρέπει να αποβάλλουν τον μεσεγχυματικό τους φαινότυπο μέσω MET για την παραγωγή των δευτερευουσών αποικιών όγκου σε απομακρυσμένες θέσεις (**Εικόνα 7**) (Kalluri et al., 2009; Lee et al., 2006; Lee et al., 2012).



Εικόνα 7: Τύποι EMT (Angadi et al., 2016)

3.3 Βιοδείκτες της μετάβασης επιθηλίου-μεσεγχύματος



Εικόνα 8: Βιοδείκτες EMT (Angadi et al., 2016)

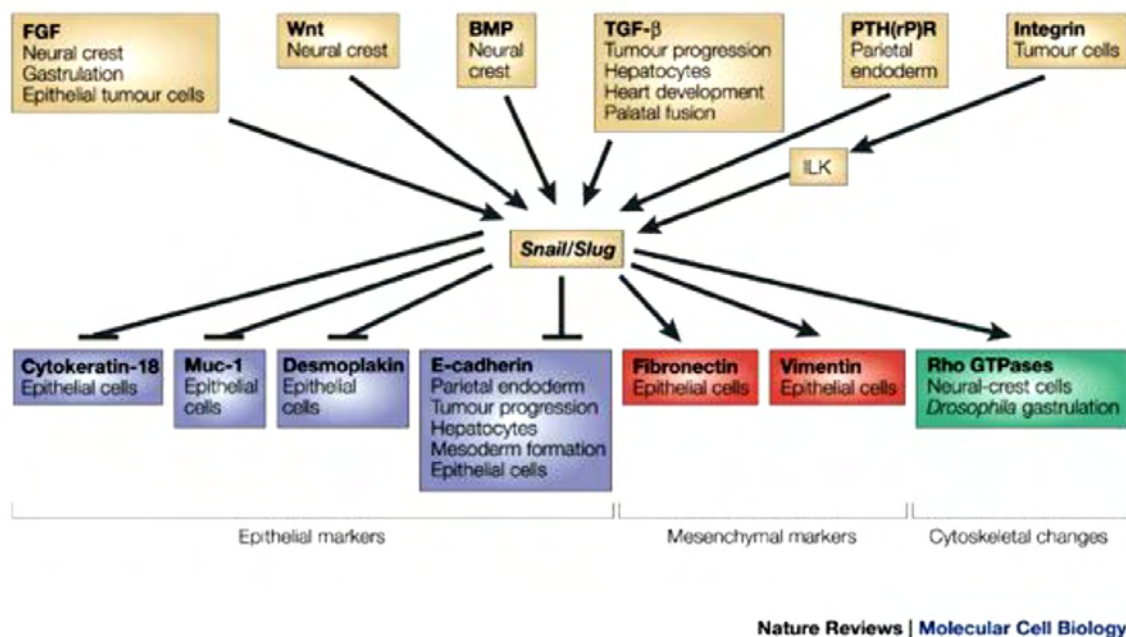
3.4 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ SNAIL

3.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η υπερ-οικογένεια των SNAIL, είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων δακτύλου-ψευδαργύρου, που εμπλέκεται σε διαδικασίες κίνησης των κυττάρων, τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης όσο και στην απόκτηση των διηθητικών και μεταναστευτικών ιδιοτήτων κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου.

Διαφορετικά μέλη της οικογένειας συμμετέχουν στην νευρική διαφοροποίηση, την κυτταρική διαίρεση και την κυτταρική επιβίωση. Έχει κεντρικό ρόλο στην μορφογένεση και τα μέλη της οικογένειας είναι απαραίτητα για το σχηματισμό μεσοδέρματος σε διάφορους οργανισμούς (Alberga et al., 1991; Carver et al., 2001).

Η E-cadherin είναι ο μόνος ευθύς στόχος του SNAIL που έχει περιγραφεί τόσο καλά.



Εικόνα 9: Σημαντικά μόρια που έχουν συνδεθεί με τον SNAIL (Nieto, 2002)

3.4.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας SNAIL στον καρκίνο

Πρόκειται για έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες μεταγραφής που διέπει την μετάβαση EMT διαφόρων καρκινικών κυττάρων. Η αύξησή του σε καρκινικούς ιστούς ασθενών έχει άμεσα συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου (μετάσταση και υποτροπή) σε διάφορους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος (Dissanayake et al., 2007; Moody et al., 2005), ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Sugimachi et al., 2003), καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (Yang et al., 2007) και καρκίνου του ενδομητρίου (Becker et al., 2007).

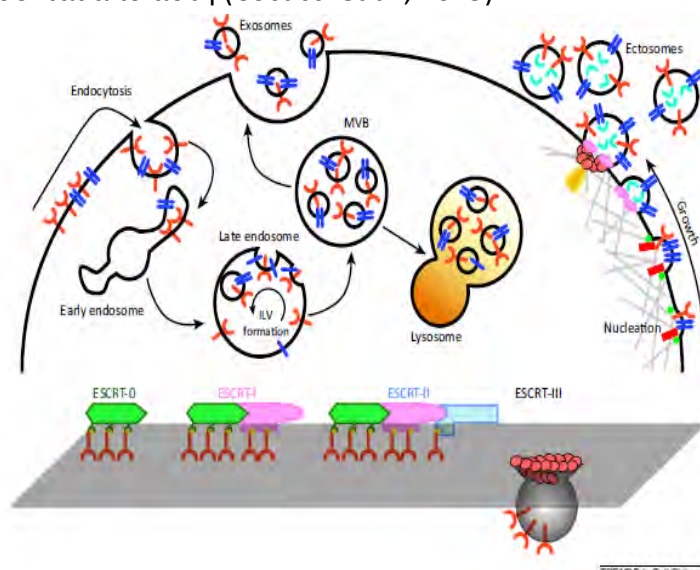
Κατά την διαδικασία EMT και την εξέλιξη του μελανώματος, ο υποκείμενος μηχανισμός είναι μια διαταραχή του ελέγχου της ανάπτυξης των κερατινοκυττάρων λόγω της εξαρτώμενης από SNAIL μείωσης της E-cadherin (Herlyn et al., 2000). Η απώλεια αυτού του επιθηλιακού δείκτη, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του EMT στον καρκίνο, παρατηρήθηκε σε μελάνωμα προχωρημένου σταδίου (Cavaillon et al., 2005; Caramel et al., 2013). Έχει δειχθεί πως το επαγόμενο από SNAIL EMT επιταχύνει την μετάσταση του μελανώματος όχι μόνο μέσω ενισχυμένης διήθησης αλλά και μέσω ανοσοκαταστολής (Kudo-Saito et al., 2009).

Δεδομένων των προαναφερθέντων, αποφασίστηκε ο χαρακτηρισμός των κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου και η διερεύνηση του ρόλου του SNAIL στην EMT.

4. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΥΣΤΙΔΙΑ

4.1 Γενικά

Η επικοινωνία σε μικρές και μεγάλες αποστάσεις μπορεί να πάρει πολλαπλές μορφές. Μεταξύ αυτών είναι εξωσώματα και τα εκτοσώματα, εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) που απελευθερώνονται από το κύτταρο για να μεταφέρουν σήματα σε κύτταρα στόχους. Ενώ η περισσότερη κατανόησή μας για το πώς αυτά τα κυστίδια συναρμολογούνται και λειτουργούν προέρχεται από μηχανιστικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε εξωσώματα, πρόσφατες μελέτες έχουν αρχίσει να στρέφουν την προσοχή τους στα εκτοσώματα. Σε αντίθεση με τα εξωσώματα, τα οποία απελευθερώνονται κατά την εξωκύτωση πολυκυστιδικών σωμάτων (MVBs), τα εκτοσώματα είναι άφθονα κυστίδια που συντίθενται στην μεμβράνη του πλάσματος και αποδεσμεύονται από αυτή (Cocucci et al., 2015).



Εικόνα 10: Βιογένεση εξωσωμάτων και εκτοσωμάτων (Cocucci et al., 2015)

Υπάρχουν ποικίλες διαφορετικές ονομασίες για καθεμία από τις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες, όμως για το μίγμα που προκύπτει όταν εξετάζονται και αναλύονται ταυτόχρονα χρησιμοποιείται ο όρος εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs). Παρά τις αξιοσημείωτες διαφορές τους, οι λειτουργίες των εκτοσωμάτων μπορεί να είναι σε μεγάλο βαθμό ανάλογες με εκείνες των εξωσωμάτων (**Πίνακας I**). Αμφότερα τα κυστίδια δείχνουν να είναι πολλά υποσχόμενοι στόχοι στη διάγνωση και θεραπεία των ασθενειών, ιδιαίτερα του καρκίνου (Cocucci et al., 2015).

Πίνακας I: Εξωσώματα και εκτοσώματα: Κύριες ομοιότητες και διαφορές (Cocucci et al., 2015)

Characteristic	Exosomes ^a	Ectosomes
<i>Assembly and release</i>		
Membrane of assembly	MVB	Plasma membrane
Diameter	50–100 nm	100–350 nm ^b
Ceramide	Large	+
ESCRT machinery	+ ^c	+
Protein/membrane anchorage	Small	Large
Piggyback of luminal proteins/RNAs	Small	+
ESCRT-III/Vps4 in pinch off	+	+
MVB exocytosis	Large	
Timing of release	Delayed	Seconds
<i>Interaction in extracellular space and with target cells</i>		
Rapid dissolution	+	+
Rolling and membrane fusion	+	+
Rolling and endocytosis	+	+
Navigation of EV mixtures	+	+
Markers ^d	CD63, CD61	TyA, C1q
Diagnosis and therapy	+	+

^aUnder 'Exosomes', vesicles both before (ILVs) and after MVB exocytosis are noted.

^bThe 350 nm given for the large diameter of ectosomes is a mean of the values in the literature, varying from 200 to 500 nm.

^c+, mechanism/response present; difference in size represents differential intensity.

^dHere only two markers are indicated. Uncertainty about others is due to the differences and changes known to occur between different cells and in the same cell under different conditions.

4.2 Τα EVs στην φυσιολογία, παθολογία και την προηγμένη ιατρική

Τα EVs αναγνωρίζεται πλέον ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο σε όλα σχεδόν τα φυσιολογικά γεγονότα που συμβαίνουν στους ιστούς και τα όργανα. Τα πιο εντόνως μελετημένα ζητήματα είναι οι ρόλοι τους στην ανοσολογία, συγκεκριμένα: η διαφοροποίησή τους στα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, στην καρδιά και τα αγγεία, με την διέγερση της πήξης, της αγγειογένεσης και της θρόμβωσης, καθώς και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με την ενσωμάτωση των νευρώνων και των διαφόρων τύπων των νευρογλοιακών κυττάρων (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, μικρογλοία), στον έλεγχο της συναπτικής λειτουργίας, την νευρωνική πλαστικότητα, την νευρωνική-νευρογλοιακή επικοινωνία, και τέλος στα οστά, με τις αλλαγές συγκεκριμένων ενζύμων. Ένας μηχανισμός που εμπλέκεται σε πολλές από αυτές τις διαδικασίες είναι η ανταλλαγή των RNAs που συμβαίνουν μεταξύ των κυττάρων μέσω της ροής των EV (Bobrie et al., 2013; Cocucci et al., 2009; Crescitelli et al., 2013).

Τα EVs έχουν διερευνηθεί σε πολυάριθμες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, του διαβήτη και των καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Επιπροσθέτως, παίζουν ένα ρόλο μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων και της μεταφοράς βιολογικής πληροφορίας κυττάρου-προς-κύτταρο (ένζυμα, δραστικά είδη

οξυγόνου, γενετική πληροφορία) (Muralidharan-Chari et al., 2010; Montecalvo et al., 2012; Li et al., 2013; Skinner et al., 2009; Hannafon et al., 2013; Raposo et al., 2013). Διάφορα ογκογονίδια έχουν εντοπιστεί μέσα στα EVs. Επιπλέον, RNAs έχει δειχθεί ότι προσδίδουν προνεοπλαστικές επιδράσεις (Soldevilla et al., 2014; Atay et al., 2014). Σημαντικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των EVs που παράγονται από φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Κυστίδια από καρκίνο του παχέος εντέρου και από άλλα καρκινικά κύτταρα έχει αναφερθεί ότι επάγουν ταχεία ανάπτυξη των ιστών. Επίσης, άλλα εξωκυττάρια κυστίδια μπορούν επίσης να μεταφέρουν καταστολείς των όγκων. Συμπερασματικά, αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι τα EVs μεταφέρουν παράγοντες ώστε να επάγουν τα κύτταρα-αποδέκτες είτε να προάγουν ή να καταστείλουν τον σχετιζόμενο με τον καρκίνο φαινότυπο. Εκτός από την έναρξη του καρκίνου, τα EVs θα μπορούσαν να προωθήσουν διαδικασίες ευνοϊκές για την πρόοδο του καρκίνου, όπως η αγγειογένεση. Δεδομένου ότι οι περισσότερες παθολογικές μελέτες έχουν διεξαχθεί σε μίγματα EVs, είναι άγνωστο αν, και σε ποιο βαθμό, εξωσώματα και εκτοσώματα είναι αμφότερα ενεργά στην παθογένεση του καρκίνου.

Τέλος, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τον πιθανό ρόλο των EVs στην προηγμένη ιατρική, όπου τα EVs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση νέων βιολογικών δεικτών, τη βελτίωση της διάγνωσης, και τη στοχευμένη παράδοση φαρμάκου και ανθρώπινης γονιδιακής θεραπείας. Επί του παρόντος, πολλές από αυτές τις μελέτες επικεντρώνονται αποκλειστικά στις λειτουργίες. Ωστόσο, μελλοντικά, το ενδιαφέρον θα μπορούσε να επεκταθεί ώστε να συμπεριλάβει τους μηχανισμούς με τους οποίους τα EVs δρουν στην παθολογία και την ιατρική, οι οποίοι θα μπορούσαν να συμβάλουν στην πρόοδο της βασικής επιστήμης σχετικά με τα εξωσώματα, τα εκτοσώματα και τα κύτταρα-στόχους τους (Cocucci et al., 2015).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

1.1 Κυτταρικές καλλιέργειες και μετασχηματισμός των κυττάρων του παχέος εντέρου

Η καρκινική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η: MC-38 (Antonio Nocito et al., 2008) κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου προερχόμενη από ποντικό, επιθηλιακής μορφολογίας.

Η υπερέκφραση του γονιδίου του SNAIL πραγματοποιήθηκε με την χρήση vector pcDNA3.1-human SNAIL, προερχόμενο από τον καθηγητή Muh-Hwa Yang (Taipei Veterans General Hospital, Taiwan). Αρχικά έγινε καλλιέργεια κυττάρων μέχρι να γίνει 85% επικάλυψη της επιφάνειας και επιμολύνθηκαν με 5 μ g DNA / 10^6 κύτταρα χρησιμοποιώντας nucleofector Amaxa® 4D® X Unit (Lonza, Basel, Switzerland) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ορισμένα κελία διαμολύνθηκαν με τα pcDNA3.1-human SNAIL πλασμίδια με σκοπό την δημιουργία κυττάρων στα οποία θα έχει γίνει υπερέκφραση του γονιδίου του SNAIL, ενώ άλλα κελία διαμολύνθηκαν με τα Mock pcDNA3.1 με σκοπό την δημιουργία κυττάρων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικό αρνητικό control. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε μέσο συμπληρωμένο με G418 / Geneticin (Gibco / Life Technologies, Waltham, MA, USA), 200 μ g/ml προκειμένου να γίνει επιλογή των κλώνων που υπερεκφράζουν τον SNAIL καθώς και τα Mock, μιας και τα τελευταία διαθέτουν στο γονιδίωμά τους μια περιοχή κωδικοποίησης αντίστασης στο αντιβιοτικό αυτό. Το μέσο επιλογής ανανεωνόταν κάθε 24 ώρες. Μετά από 2 εβδομάδες καλλιέργειας παρουσία του αντιβιοτικού επιβίωσαν μόνο τα κύτταρα στα οποία η διαμόλυνση είχε ολοκληρωθεί με επιτυχία και τα υπόλοιπα οδηγήθηκαν σε απόπτωση λόγω της δράσης του αντιβιοτικού. Μέσω αυτής της διαδικασίας, δημιουργήθηκαν σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές:

τα Mock-MC38 καρκινικά κύτταρα, στα οποία έχει γίνει εισαγωγή του πλασμιδίου, το οποίο όμως δεν περιέχει την πληροφορία για την υπερέκφραση του γονιδίου του SNAIL και χρησιμοποιούνται ως εσωτερικό αρνητικό control, και τα Snail2- MC38, Snail6-MC38 που είναι σταθεροί κλώνοι καρκινικών κυττάρων, στα οποία έχει γίνει υπερέκφραση του γονιδίου του SNAIL. Η υπερέκφραση του γονιδίου του SNAIL επαληθεύθηκε μέσω PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης ζώνης, Western blot (Stasiak et al., 2016) καθώς και από επαληθευτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

1.2 Συνθήκες καλλιέργειας και χημικά αντιδραστήρια

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ της εταιρίας *Gibco*®. Συμπληρώματα του θρεπτικού υλικού όπως: βόειος εμβρυϊκός ορός (FBS), καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, γενετισίνη, θρυψίνη, προμηθεύτηκαν από την ίδια εταιρία.

Οι καλλιέργειες των καρκινικών κυττάρων MC38 έγιναν κατά κύριο λόγο παρουσία 5% FBS. Για την προστασία των καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις των 100 µg/mL πενικιλίνη και 100 µg/mL στρεπτομυκίνη. Επίσης στο θρεπτικό υλικό προστίθεται πάντα το αντιβιοτικό επιλογής, δηλαδή γενετισίνη 200µg/ml. Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% (v/v) CO₂, με αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 24-48 ώρες. Η συλλογή των κυττάρων και του μέσου καλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε πλήρεις καλλιέργειες (~80%). Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιούνταν μετά από έκπλυση με DPBS και ενζυμική κατεργασία με διάλυμα θρυψίνης (0.05% (w/v) θρυψίνη και 0.02% (w/v) Na₂EDTA) και φυγοκέντρηση στα 1200rpm για 3-4 min. Όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούνταν για διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα ακολουθούνταν κάθε φορά η κατάλληλη διεργασία.

1.3. Μικροσκοπία αντίστροφης φάσης

Οι εικόνες των ζωντανών κυττάρων πάνω στην πλάκα καλλιέργειας, συλλέχθηκαν από μικροσκόπιο OLYMPUS CKX41 εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα CMOS color digital camera (SC30).

1.4. Απομόνωση εξωκυττάρων κυστιδίων – EVs ISOLATION

Αρχικά έγινε καλλιέργεια του κάθε κυτταρικού τύπου, σε 8 φλάσκες 150cm² για την κάθε απομόνωση, μέχρι ποσοστού κάλυψης 60-65% στην καθεμία (900.000 κύτταρα ανά φλάσκα, μετά από 72 ώρες ~60-65% confluency). Έπειτα, ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων αυτών σε 15ml θρεπτικού μέσου χωρίς ορό/flask για 24 ώρες ακριβώς, κατόπιν πλύσης των κυττάρων τουλάχιστον 3 φορές με DPBS. Αυτό το βήμα είναι πολύ σημαντικό, διότι σε περίπτωση ατελούς απομάκρυνσης του ορού, το δείγμα που θα απομονωθεί κινδυνεύει να εμπεριέχει μικροκυστίδια του ορού και να μην προέρχεται ξεκάθαρα από τα υπό μελέτη κύτταρα.

Ακολούθησε τριαντάλεπτη επώαση στους 4°C με χειροκίνητη ανάδευση ανά πέντε λεπτά, διάρκειας ενός λεπτού/flask. Έγινε συλλογή του θρεπτικού σε falcon tubes των 50ml, 10λεπτη φυγοκέντρηση στα 300g για την απομάκρυνση των εναπομείναντων κυττάρων και στη συνέχεια 15λεπτη φυγοκέντρηση στα 3000g για απομάκρυνση αποπτωτικών σωμάτων και άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων. Ακολούθησε 70λεπτη υπερφυγοκέντρηση στα 100.000g για τη συλλογή των εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs), στέγνωμα του ιζήματος και φύλαξη στους -20°C.

Για την παρασκευή δειγμάτων για Western Blot analysis έγινε επαναδιαλυτοποίηση των κυστιδίων σε 80µl RIPA που εμπεριείχε αναστολέα

πρωτεασών, λήψη του υπερκείμενου και βράσιμο για διάνοιξη των κυστιδίων (από κάθε αντίστοιχη διαδικασία απομονώθηκαν περίπου 100-120μg πρωτεΐνης. Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο Bradford). Για την παραγωγή κυτταρικού εκχυλίσματος, μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού έγινε πλύση των κυττάρων με PBS και αποθήκευση στους -80°C.

1.5. In vitro μελέτη της κυτταρικής κινητικότητας - MIGRATION ASSAY

Η κυτταρική μετανάστευση είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία για διάφορες βιολογικές διαδικασίες, όπως η εμβρυϊκή εξέλιξη, η μορφογένεση και ο καρκίνος. Τα κύτταρα μεταναστεύουν συνήθως σε απόκριση εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, και γενικά συστατικά του εξωκυττάρου χώρου.

Τα MC38 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες με 24 κελία, αφού πρώτα είχε εισαχθεί το σιλικονούχο δίκωρο chamber (Biovalley, Marne-la-Vallée, France), ibidi, που θα διαχωρίσει στη μέση το κελίο με απόλυτη ακρίβεια και θα προσομοιάσει μία πληγή. Το κάθε τμήμα του chamber περιείχε 70 λ θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε 30.000 κύτταρα. Έπειτα από 24-36 ώρες (όταν έχει δημιουργηθεί ένα ικανοποιητικό και συμπαγές μέτωπο σε κάθε πλευρά της πληγής), αφαιρείται το ibidi, γίνονται πλύσεις 2 φορές με PBS, ώστε να αφαιρεθούν τα αποκολλημένα κύτταρα και προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Τα κελία φωτογραφίζονται στις 0, 24 και 48 ώρες (καθώς και μετά από κάποιες μέρες αν κριθεί απαραίτητο) με ψηφιακή κάμερα, συνδεδεμένη με μικροσκόπιο. Η κινητικότητα ποσοτικοποιήθηκε στα διάφορα χρονικά διαστήματα με ανάλυση εικόνας με το πρόγραμμα του λογισμικού IMAGEJ 1.4.3.67- Launcher Symmetry Software.

Τα αποτελέσματα του πειράματος αναφέρονται σε κύτταρα τριών διαφορετικών πειραμάτων, με το κάθε δείγμα τοποθετημένο επαναληπτικά εις τριπλούν, και με φωτογραφίες σε 5 διαφορετικές πλευρές του κάθε κελίου.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

2.1 Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές καλλιέργειες

Το RNA βρίσκεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το κυτταροπλασματικό RNA αποτελείται από ριβοσωμικό RNA (rRNA), μεταφορικό RNA (tRNA), αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και άλλα μικρά τμήματα RNA. Μόνο το 1-2% του ολικού RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι mRNA. Η πλειοψηφία του ολικού RNA είναι rRNA.

Η επιτυχής απομόνωση ακέραιου RNA απαιτεί την πραγματοποίηση τεσσάρων βημάτων που περιλαμβάνουν αρχικά την επιτυχή διάσπαση των κυττάρων, τη μετουσίωση των συμπλόκων νουκλεοπρωτεϊνών, την απενεργοποίηση της δράσης των ενδογενών ριβονουκλεασών (RNase), και τον καθαρισμό του RNA από DNA και πρωτεΐνες.

Για την απομόνωση του ολικού mRNA στην παρούσα μελέτη, έγινε χρήση του RNeasy Mini kit (Qiagen) και ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τον κατασκευαστή. Η καθαρότητα του RNA και η απόδοση της απομόνωσης προσδιορίζονται με την χρήση RNA chip, Agilent RNA 6000 Nano Kit.

2.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) κάποιου γονιδίου, δηλαδή ένα μόριο DNA που αποτελεί αντίγραφο ενός mRNA, παράγεται με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA στην παρούσα μελέτη, έγινε χρήση του πρωτοκόλλου Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT- qPCR with dsDNase (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France).

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (REAL TIME-PCR)

Η μέθοδος στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA, που πραγματοποιείται με τη βοήθεια της δράσης μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Το ένζυμο χρησιμοποιεί ως εκμαγείο είτε γονιδιακό DNA είτε το συμπληρωματικό cDNA. Προκειμένου να ξεκινήσει η κλωνοποίηση του γονιδίου απαιτούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια, εκκινητές (primers), όπου ο ένας θα είναι συμπληρωματικός ως προς μία αλληλουχία που εντοπίζεται στο 3' άκρο της μίας αλυσίδας του γονιδίου-στόχου και ο άλλος ως προς μία αλληλουχία που εντοπίζεται στο 5' άκρο του γονιδίου-στόχου αντίστοιχα. Η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο 5' άκρο συμβολίζεται με F και ο εκκινητής ονομάζεται forward primer ή sense (S), ενώ αυτός που αντιστοιχεί στο 3' άκρο συμβολίζεται με R και ονομάζεται reverse primer ή antisense (AS). Η πολυμεράση προσδένεται στα δίκλωνα τμήματα τα οποία σχηματίζονται επιμηκύνοντας την κάθε αλυσίδα του γονιδίου-στόχου προσθέτοντας κάθε φορά από έναν δεοξυριβονουκλεοζίτη.

Τα βήματα της RT-PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου που κάνει χρήση του Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)

Τα στάδια ενίσχυσης του DNA στον θερμοκυκλοποιητή Mx3005P (Agilent Technologies, Massy, France) είναι τα εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου του DNA (95° C για 3 min).
2. Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA (95°C για 3 sec).
3. Υβριδοποίηση εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA και επιμήκυνση της αλληλουχίας στη θερμοκρασία υβριδοποίησης ανάλογα με τον εκκινητή του εκάστοτε μορίου που μελετάται).
4. Επανάληψη των βημάτων 2-3 για 40 κύκλους.

Ως γονίδιο αναφοράς στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη (Actin), η οποία είναι ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα ποικίλων ιστών (housekeeping gene). Η RT-PCR για το γονίδιο αναφοράς έγινε στις πειραματικές συνθήκες που όριζαν οι εκκινητές της MMP-14. Η ποσότητα του cDNA που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά υπολογίζεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης

(standard curve), όπου χρησιμοποιούνται διάφορες συγκεντρώσεις του cDNA για να βρεθεί η βέλτιστη αυτών.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

3.1 Συλλογή κυτταρικών εκχυλισμάτων και μέσων καλλιέργειας-συμπύκνωση υπερκείμενων

Δείγματα κυττάρων συλλέχθηκαν από τις κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό, έγινε έκπλυση με ψυχρό PBS και το δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε πάγο. Στο δοχείο καλλιέργειας μεταφέρθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer: 50mM Tris (pH 7,6), 5 mM EDTA, 0,5M NaCl, 0,02% NaN₃, 0,6% NP40, 1 nM Ιωδοακεταμίδιο, 1 nM PMSF, 1nM Na₃VO₄ (Sigma). Η λύση των κυττάρων υποβοηθήθηκε μηχανικά (scrapping).

Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων στις 1.200 rpm στους 4°C για 10min, προκειμένου να διαχωριστεί στο υπερκείμενο το κυτταρικό εκχύλισμα από το ίζημα των αδιάλυτων κυτταρικών υπολειμμάτων.

Το μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Τα κύτταρα επώαστηκαν ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος και το μέσο καλλιέργειας συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 3000rpm στους 4°C για 4min. Ίσος όγκος υπερκείμενου από κάθε κυτταρική σειρά συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε με τη βοήθεια των φίλτρων συμπύκνωσης Vivaspin 15 (Santorius Stedim Biotech), με MWCO (molecular weight cut-off) 10.000 Da. Η συμπύκνωση επετεύχθη με φυγοκέντρηση των φίλτρων στις 3000rpm, στους 4°C.

3.2 Μέθοδος Bradford για υπολογισμό ολικής πρωτεΐνης

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης έγινε φωτομετρικά (Infinite M200, TECAN) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford (Coomassie Plus (Bradford) Assay kit της εταιρείας Thermo Scientific) σε μήκος κύματος 595nm με τη χρήση πρότυπης καμπύλης κατασκευασμένης με BSA όπως ορίζει το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου.

3.3 Μέθοδος Ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting)

Προκειμένου να γίνει η μελέτη των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης.

Ο διαχωρισμός των φορτισμένων μορίων σε πήκτωμα ή στην επιφάνεια κάποιου υλικού επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο αναγκάζει τα φορτισμένα μόρια να κινηθούν προς τον αντίθετα φορτισμένο πόλο. Στην περίπτωση του πηκτώματος, το μέγεθος των πόρων του επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων λόγω του διαφορετικού συντελεστή τριβής που εμφανίζουν τα μόρια με διαφορετικό υδροδυναμικό μέγεθος.

Χρησιμοποιήθηκαν επίπεδα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, τα οποία αποτελούνται από δύο μέρη, το πηκτώμα επιστοιβάξης του δείγματος (stacking gel) και το πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel). Το πηκτώμα επιστοιβάξης ήταν περιεκτικότητας 4% σε πολυακρυλαμίδιο και περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις 0,125M Tris, pH 6,8 και 0,1% (w/v) θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS). Αντίστοιχα, το πηκτώμα διαχωρισμού περιείχε πολυακρυλαμίδιο τελικής συγκέντρωσης 7,5-12%, 0,375M Tris, pH 8,8 και 0,1% (w/v) SDS. Από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου διασταυρούμενο από N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο σε τελική συγκέντρωση 37:1, δημιουργείται το πηγμα πολυακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου διευκολύνεται με την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulphate, APS) σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED) σε αναλογία 1,5μl TEMED/ml διαλύματος. Το APS χρησιμοποιείται γιατί δημιουργεί ελεύθερες ρίζες σε μόρια ακρυλαμιδίου, οι οποίες στη συνέχεια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προς σχηματισμό πλέγματος ακρυλαμιδίου. Το TEMED δρα ως καταλύτης της παραπάνω αντίδρασης. Στα δείγματα αναμειχθηκε πριν την ηλεκτροφόρηση ρυθμιστικό διάλυμα 5X Laemmli που περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις 0,0625M Tris, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,001% (w/v) Bromophenol blue (Serva) ως δείκτη και β-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 3% (v/v) και έγινε επώαση στους 95°C για 5 min. Το SDS δεσμεύεται σε πρωτεΐνες προσδίδοντας έτσι σε όλες τις πρωτεΐνες την ίδια πυκνότητα φορτίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο διαχωρισμός των μορίων να πραγματοποιείται μόνο βάσει του μοριακού τους μεγέθους και όχι λόγω φορτίου, ενώ η επεξεργασία των δειγμάτων με β-μερκαπτοαιθανόλη οδηγεί στην αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και μετουσίωση των μορίων έτσι ώστε οι πρωτεΐνες με σφαιρικό σχήμα να αποκτήσουν γραμμική δομή και να κινηθούν στο πηκτώμα σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή της εταιρείας Bio Rad σε RT. Το ρυθμιστικό διάλυμα των δεξαμενών ανόδου και καθόδου περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις 25mM Tris, 192mM γλυκίνη pH 8,3 και 0,1% (w/v) SDS.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή σταθερού ρεύματος 100V. Καθώς εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, οι πρωτεΐνες εισέρχονται στο πηκτώμα επιστοιβάξης και μαζί με τα ιόντα γλυκίνης δημιουργούν μια διαβάθμιση συγκέντρωσης ανάμεσα στα ιόντα χλωρίου που προηγούνται και τα ιόντα γλυκίνης που έπονται στο πηκτώμα διαχωρισμού. Το γεγονός αυτό αναγκάζει τα σύμπλοκα SDS-πρωτεΐνης να σχηματίσουν μια λεπτή ζώνη και να κινούνται ανάμεσα στα άλλα ιόντα. Το πορώδες διαχωρίζει τα σύμπλοκα SDS-πρωτεϊνών βάσει της μοριακής τους μάζας, καθυστερώντας τη διέλευση μεγαλύτερων σε μάζα μορίων.

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη polyvinylidene difluoride (PVDF) (ImmobilonR-P Transfer membranes, Millipore) πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 0,025M Tris-HCl, 0,192M γλυκίνη pH 8,2-8,4 και καθαρή μεθανόλη στα 80V στους 4°C για 1h και 30 min με τη χρήση ανάλογου τροφοδοτικού. Η μεμβράνη εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (20mM Tris-HCl, 0,9% NaCl και 0,05% Tween-20) σε RT.

Προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων, η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα 5% (w/v) σκόνης γάλακτος ελεύθερης λιπαρών, είτε 5% BSA σε TBS-T (TBS με 0.5% Tween) σε RT για 2h (ανάλογα με το πρωτόκολλο του αντισώματος που εφαρμοζόταν στο επόμενο βήμα). Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με διάλυμα του ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης

ενδιαφέροντος (σε συνθήκες και συγκεντρώσεις αναγραφόμενες στο εκάστοτε datasheet, Πίνακας II), στους 4°C overnight.

Την επόμενη μέρα, η μεμβράνη εκπλύθηκε 3 φορές x5min με TBS-T σε RT και επώσθηκε για >1h με διάλυμα 1% (w/v) σκόνη γάλακτος ελεύθερης λιπαρών ή 1%BSA σε TBS-T που περιείχε το δεύτερο αντίσωμα (συζευγμένο με HRP) έναντι του ειδικού πρώτου αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε.

Έπειτα από πλύσεις με TBS-T και TBS, η μεμβράνη επώσθηκε με τα αντιδραστήρια ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, ECL Prime Chemiluminescence Detection (GE Health care, Orsay France) σε RT για 5 min στο σκοτάδι. Η ανίχνευση της χημειοφωταύγειας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ChemiDoc™ της εταιρείας BioRad. Οι αμαυρωμένες ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Image Lab Software.

ΠΙΝΑΚΑΣ II: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσολογική ταυτοποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ/ΚΩΔΙΚΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΗ /ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ (kDa)
GPC1	Rabbit	16700-1-AP	1:2000 in milk 1%	55 80
MMP-14	Rabbit	Ab38971	1:2000 in milk 1%	66
E-Cadherin	Mouse	BD Transductions610181	1:2000 in milk 5%	120
B-Catenin	Mouse	BD Transductions610153	1:2000 in milk 5%	92
CDX2	Rabbit	GTX113160	1:000 in milk 1%	Observed: 42
Lumican	Mouse	Lab's Ab	1:1000 in BSA 1%	57, 37 and various other bands
Integrin β1	Rabbit	AB1952	1:1000 in milk 1%	130
Actin	Goat	Sc-1616	1:1000 in milk 1%	42
Actin	Rabbit	Sigma A2066	1:1000 in milk 1%	42
Actin	Mouse	Ab8226	1:1000 in BSA 5%	42

Snail1	Rabbit	C15D3	1:2000 in BSA 1%	~37
Hsp90	Mouse	Ab13492	1:3000 in milk 1%	84.7 (alpha) 83.2 (beta)

Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μεμβρανών για επώαση με διαφορετικά αντισώματα. Με τη διαδικασία της αποδέσμευσης των αντισωμάτων (stripping) πραγματοποιείται αποκόλληση από τη μεμβράνη των συμπλόκων του πρώτου και του δεύτερου αντισώματος, ενώ παραμένουν προσκολλημένες στη μεμβράνη οι ισχυρά δεσμευμένες (με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) σε αυτήν πρωτεΐνες από την ηλεκτρομεταφορά. Αυτό έγινε με το ήδη έτοιμο Antibody Stripping Buffer της Gene Bio- Application, Ltd με το αντίστοιχο πρωτόκολλο. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρώτο και δεύτερο αντίσωμα για ακτίνη (β-actin) για τα κυτταρικά εκχυλίσματα και να ποσοτικοποιηθεί η πρώτη πρωτεΐνη σε σύγκριση με αυτήν. Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων που προέρχονται από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε η χρώση Coomassie Blue R-250 (15 min ανάδευση με την χρώση και στη συνέχεια 3 πεντάλεπτες πλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού).

4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (IMMUNOCYTOCHEMISTRY), ICC

Για τη μελέτη του εντοπισμού της E-cadherin πραγματοποιήθηκαν πειράματα ICC. Σε πλάκες 24 κελίων προστέθηκαν γυάλινες καλυπτρίδες (μία καλυπτρίδα/κελίο) και επιστρώθηκαν 50×10^3 κύτταρα σε κάθε κελίο. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 – 36 ώρες.

Το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και τα κύτταρα πλυθήκαν 3 φορές επί 5 λεπτά με PBS, μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση διαλύματος 4% (w/v) formaldehyde (PFA) σε PBS για 30 min και πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με διάλυμα 3% BSA σε PBS + 0.1% v/v Triton x100 για 30 λεπτά. Αφαιρέθηκε στην συνέχεια το υπερκείμενο και προστέθηκαν 200 μl διαλύματος αντισώματος με αραιώση 1/100 σε 3% BSA + 0,1% Triton x100 σε κάθε κελίο. Η πλάκα τοποθετήθηκε σε σταθερό σημείο στους 4°C όπου έγινε επώαση overnight.

Την επόμενη ημέρα, αφαιρέθηκε το διάλυμα του αντισώματος και αφού έγινε 2 φορές πλύση με PBS, ακολούθησε επώαση με το αντίσωμα anti-mouse IgG συζευγμένο με χρωστική Alexa FluorR 488 (Molecular Probes/Life Technologies) για > 1 ώρα σε σκοτεινό σημείο. Κατόπιν δύο πλύσεων με PBS, για τον χρωματισμό των ινιδίων ακτίνης, οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα επώαστηκαν με φαλλοϊδίνη (Alexa FluorR 568 Phalloidin, Invitrogen molecular probes), (ειδικά δεσμευμένη και σταθεροποιημένη νηματοειδή ακτίνη (F-actin) συζευγμένη με Tetramethylrhodamine (TRITC) για 1h και μετά ακολούθησαν δυο πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια έγινε τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες με την ταυτόχρονη προσθήκη DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole). Τα κύτταρα εγκλείστηκαν μεταξύ

των αντικειμενοφόρων πλακών και των καλυπτρίδων με τη χρήση Fluoromount-G mounting medium (Interchim) και παρατηρήθηκαν μέσω μικροσκοπίου συνεστιακής απεικόνισης (confocal microscope LSM 710, Carl Zeiss microimaging, GmbH, Germany; programme ZEN)). Όλες οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσία λαδιού εμβάπτισης. Η επεξεργασία τους έγινε μέσω προγράμματος Image J Software.

5. ΖΕΛΑΤΙΝΟΓΡΑΦΗΜΑ

Πρόκειται για μια SDS-PAGE ηλεκτοφόρηση, μέσω της οποίας πραγματοποιείται ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας των ζελατινασών MMP-2 και MMP-9 παράλληλα με το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η ενζυμική δραστηριότητα που ανιχνεύεται οφείλεται στην ικανότητα αποικοδόμησης της ζελατίνης που έχει συμπολυμεριστεί στο πήγμα διαχωρισμού, από τα ένζυμα του ηλεκτροφορούμενου δείγματος.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθούν δυο πλύσεις των 30 λεπτών των πηκτών υπό ανάδευση, σε διάλυμα Triton X-100, προκειμένου να αντικατασταθεί το SDS με το Triton και να επανενεργοποιηθούν τα ένζυμα. Στη συνέχεια ακολουθούν 2 πλύσεις των δέκα λεπτών με διάλυμα επώασης το οποίο περιέχει: 5mM CaCl₂, 0,1% Triton-X, με pH 7,5 και τέλος επώαση του πηκτώματος για τουλάχιστον 16 ώρες στους 37°C σε ρυθμιστικό διάλυμα επώασης, προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες και να αποικοδομήσουν το υπόστρωμα ζελατίνης. Μετά την επώαση των 16 ωρών το πηκτώμα χρωματίζεται με διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue R-250 (0,1% Coomassie Blue R-250 σε υδατικό διάλυμα 40% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος) για 30 λεπτά υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνεται ο αποχρωματισμός του πηκτώματος με επώαση υπό ανακίνηση για 30 λεπτά σε διάλυμα αποχρωματισμού, το οποίο περιέχει 50% MeOH και 10% CH₃COOH έως ότου γίνει διάφανο το πήγμα επιστοίβαξης.

Η δραστηριότητα των ζελατινασών εμφανίζεται με τη μορφή λευκών ζωνών σε ανοιχτό μπλε υπόβαθρο λόγω τοπικής αποικοδόμησης του υποστρώματος (ζελατίνης). Αντίθετα οι πρωτεϊνικές ζώνες εμφανίζονται μπλε. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη χρήση του ChemiDocTM της εταιρείας BioRad.

6. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ MMP-14

Η ενεργότητα της MMP-14 μετρήθηκε σε πλάκες 96 κελίων, χρησιμοποιώντας 1μM υπόστρωμα 5-FAM/QXLTM 520 FRET πεπτιδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, που χορηγήθηκε από την Sensolyte (AnaSpec, San Jose, USA) σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 485 nm και 535 nm, αντίστοιχα. Πρώτα από όλα, η MMP-14 ενεργοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 1 mM APMA (4-αμινο-φαινυλο-υδραργυρικό οξύ) για 2 ώρες στους 37 °C. Όλα τα δείγματα εισάχθηκαν εις τριπλούν στην πλάκα στους 37 °C. Ο φθορισμός μετρήθηκε με φασματοφθορισμόμετρο (Mithras LB940, Berthold Technologies, Thoiry, France). Για να προσδιοριστεί η επίδραση του SNAIL στην ενεργότητα της MMP-14 in vitro, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 24 και 48 ώρες και συλλέχθηκαν τα κυτταρικά σφαιρίδια μετά από

θρυψινόλυση και φυγοκέντρωση (καθώς και το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σε επόμενα πειράματα).

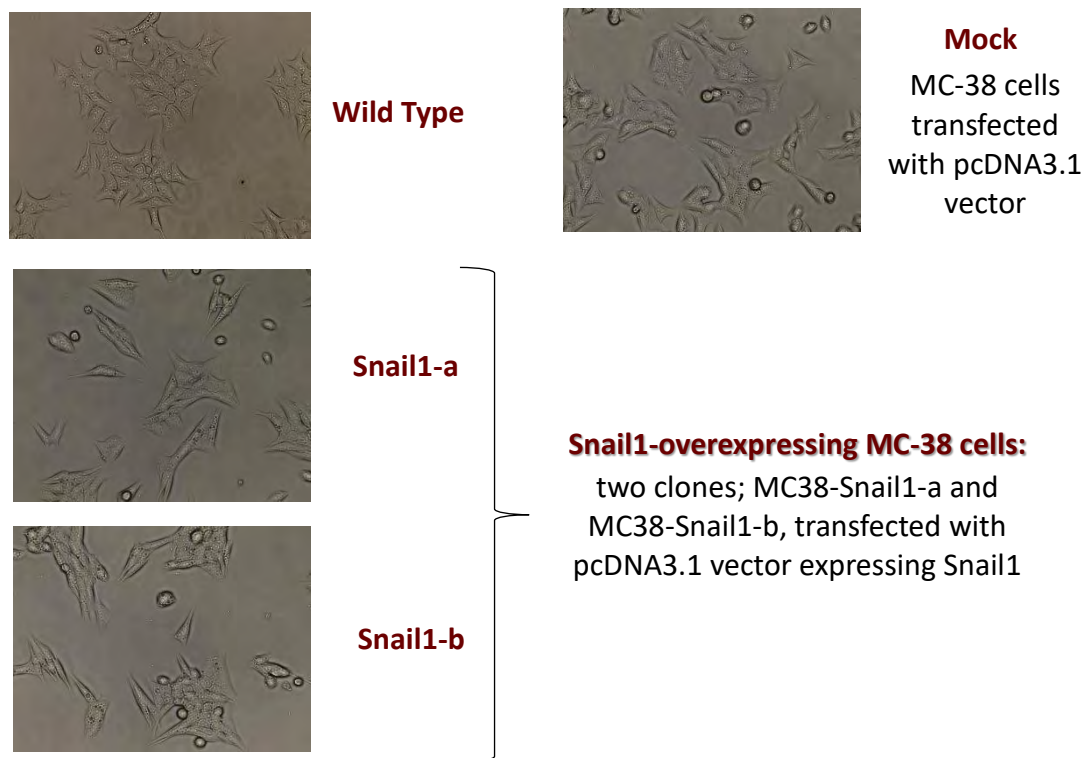
7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού στατιστικής “unpaired t-test” ή “test ANOVA” GraphPad Prism 5.03 καθώς και με το πρόγραμμα Microsoft Excel 2007. Οι συγκρίσεις (μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα) έγιναν μεταξύ της κάθε πειραματικής ομάδας και του αντίστοιχου πειράματος αναφοράς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΚΛΩΝΩΝ SNAIL1-MC38

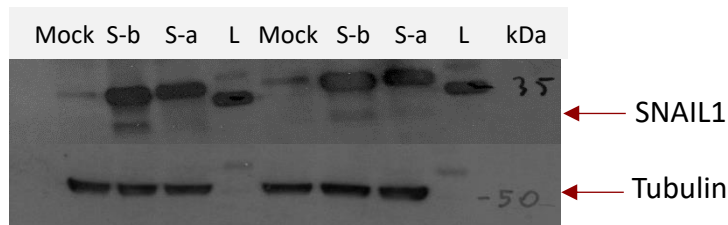
1.1 Μορφολογία των MC38-WT, Mock-MC38 και των κλώνων που υπερεκφράζουν τον SNAIL1



Εικόνα 11: Χαρακτηρισμός των σταθερών κλώνων Snail1-MC38. Μορφολογία των κυττάρων WTMC38, Mock-MC38 και των σταθερά διαμολυσμένων κλώνων μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου.

1.2 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του SNAIL1

Παρατηρήθηκε αλλαγή της έκφρασης του SNAIL1 στους κλώνους SNAIL1-a και b, με τον κλώνο b να παρουσιάζει την μεγαλύτερη πρωτεϊνική έκφραση.



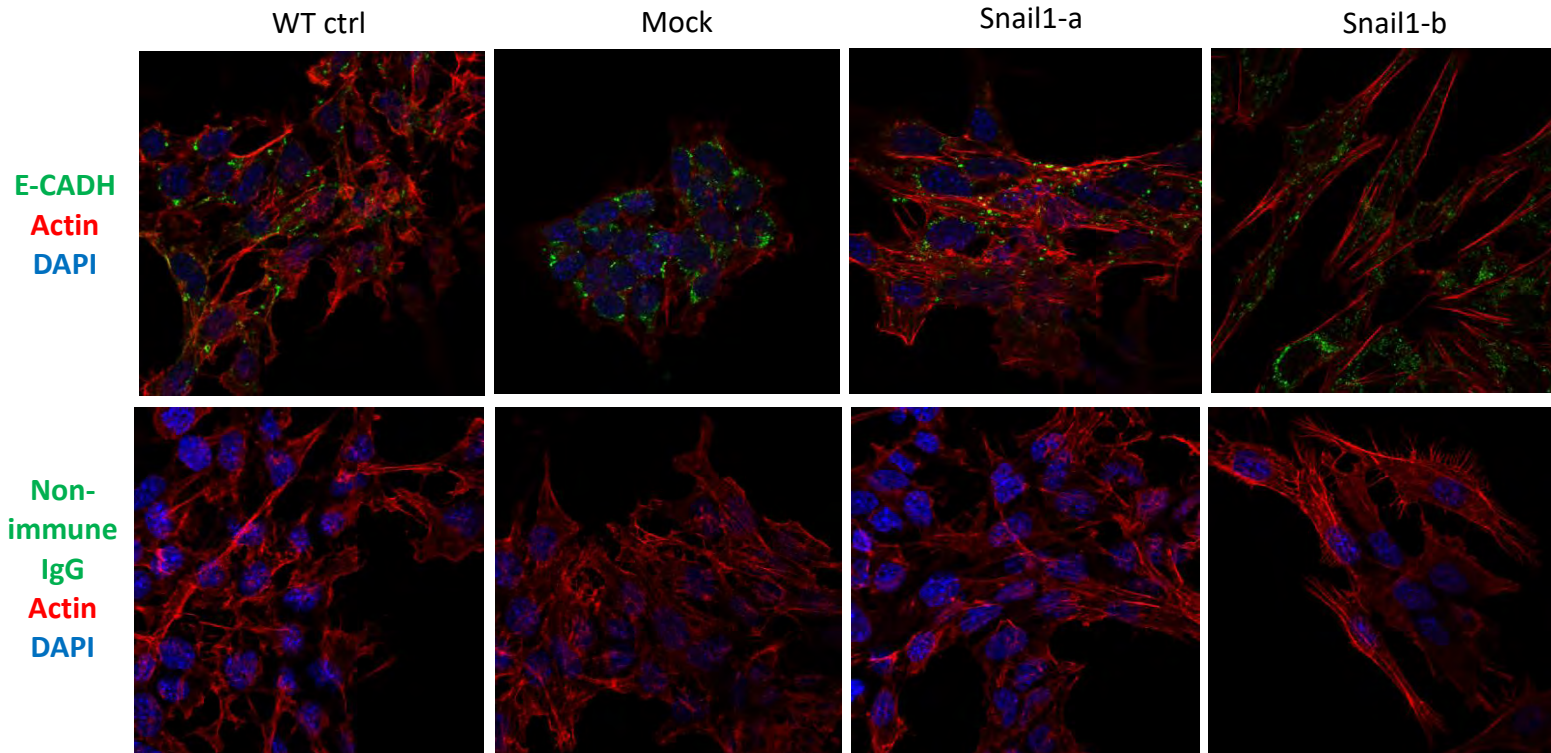
Εικόνα 12: Western blot ανάλυση του SNAIL1 στα άγριου τύπου MC38-WT, στα Mock-MC38 και των σταθερά διαμολυσμένων κλώνων (κλώνοι Snail1-a-MC38— έκφραση SNAIL1, ενώ οι κλώνοι Snail1-b-MC38— υψηλότερη έκφραση του SNAIL1).

1.3 Μελέτη της κατανομής της E-CADH σε κυτταρικό επίπεδο

Η E-cadherin είναι η πρωτότυπη τύπου I καντχερίνη. Οι καντχερίνες τύπου I διαμεσολαβούν ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις σχηματίζοντας συγκολλητικούς δεσμούς μεταξύ μιας ή περισσότερων ανοσοσφαιρινών (Ig) στην εξωκυττάρια περιοχή τους, συνδεόμενες στις μικροΐνες ακτίνης έμμεσα μέσω α -κατενίνης και β -κατενίνης στο κυτταρόπλασμα (Takeichi et al., 1995; Kemler et al., 1993; Terpass et al., 2000). Η E-cadherin απαιτείται για την διατήρηση των σταθερών δεσμών κυττάρου με κύτταρο.

In vitro, υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ έλλειψης της παραγωγής της E-cadherin και της απώλειας του επιθηλιακού φαινοτύπου (Behrens J., 1989). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αρνητική ρύθμιση κατά την πρόοδο του όγκου προκύπτει από επιγενετικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την καταστολή της μεταγραφής και την προαγωγή της υπερμεθυλίωσης. Περιστασιακά, το γονίδιο της E-cadherin αποσιωπάται, οδηγώντας στην απουσία ή την έκφραση μιας μη-λειτουργικής πρωτεΐνης.

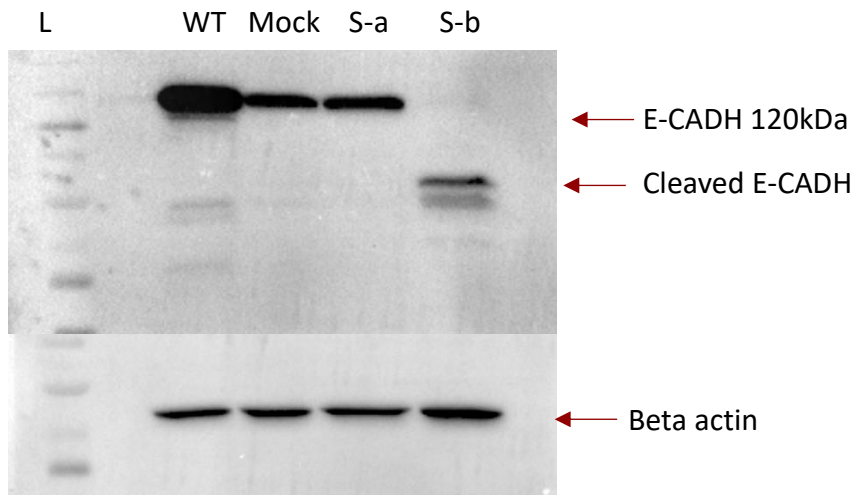
Στα MC-38 κύτταρα παρατηρείται ομοιόμορφη κατανομή κυρίως στις ενώσεις και στις προεκβολές υπό μορφή κοκκίων στα WT, στα Mock καθώς και στα Snail1-a, ενώ στα Snail1-b παρατηρείται κατανομή στο κυτταρόπλασμα και κυρίως κοντά στον πυρήνα, γεγονός που ενισχύει τον μεσεγχυματικό φαινότυπο. Η ακτίνη δεν παρουσιάζει μεγάλες αλλαγές. Επίσης, παρατηρείται οπτικά και επιβεβαιώνεται ο έντονα μεσεγχυματικός φαινότυπος του κλώνου SNAIL1-b, ο οποίος είχε ήδη παρατηρηθεί με ανάστροφο μικροσκόπιο (Εικόνα 13).



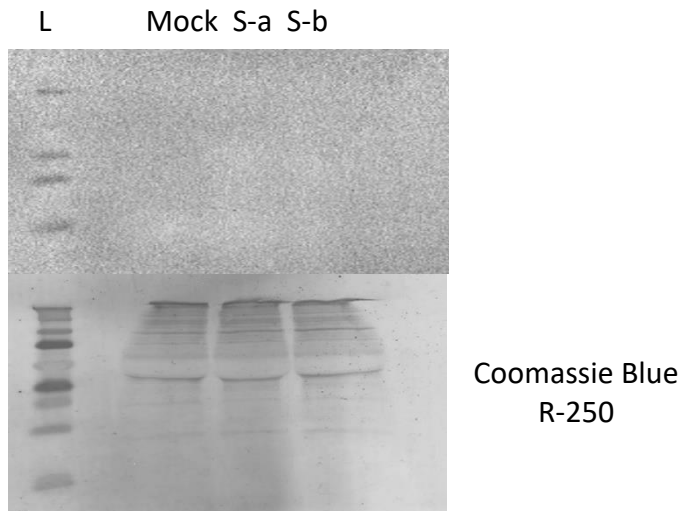
Εικόνα 13: Ενδοκυττάρια κατανομή της E-CADH με ανοσοφθορισμό (Πράσινο χρώμα: E-CADH, κόκκινο: ακτίνη και μπλε χρώμα: πυρήνας (DAPI), πράσινο, κόκκινο και μπλε: εικόνες merged).

1.4 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της E-CADH

Δεν παρατηρήθηκε μεγάλη αλλαγή της έκφρασης της E-CADH στα κυτταρικά εκχυλίσματα παρά μόνο στο κυτταρικό εκχύλισμα του Snail1-b όπου υπήρξε μείωση, σχετιζόμενη με την υπερέκφραση του SNAIL1 (Εικόνα 14). Στο υπερκείμενο δεν ανιχνεύθηκε ύπαρξή της, γεγονός που υποδεικνύει την μη έκκρισή της και απλώς την απώλεια έκφρασης της γνωστής σε εμάς μορφής, γεγονός που επιβεβαιώνει τον μεσεγχυματικό φαινότυπο που παρατηρήθηκε μέσω αντίστροφης μικροσκοπίας (Εικόνα 15).



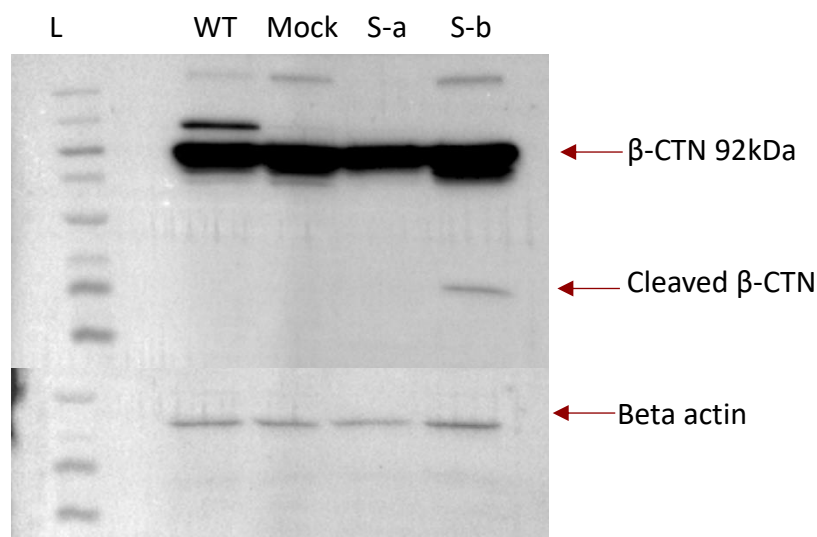
Εικόνα 14: Πρωτεϊνικά επίπεδα της E-CADH στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Όπου WT : MC38 WT, Mock : MC38 Mock, S-a : MC38 Snail1-a, S-b : MC38 Snail1-b



Εικόνα 15: Πρωτεϊνικά επίπεδα της E-CADH στο μέσο καλλιέργειας για την ανίχνευση της πιθανώς εκκρινόμενης πρωτεΐνης.

1.5 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της β -Catenin (β -CTN)

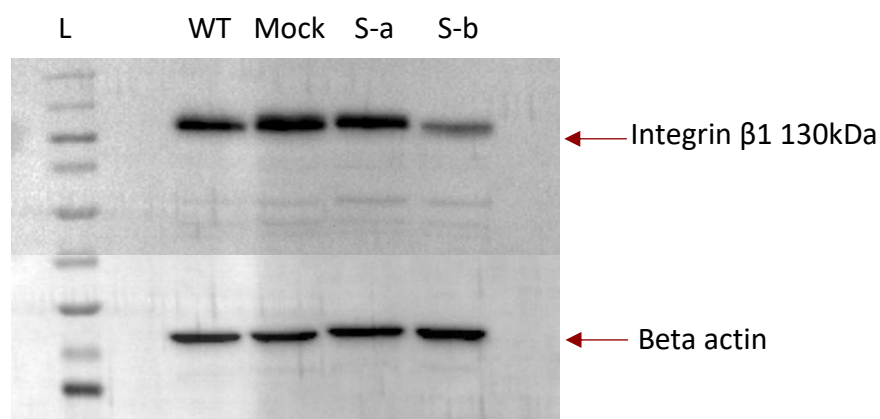
Η β -κατενίνη συνδέεται με την E-καντχερίνη και μεταφέρεται στον πυρήνα. Επιπροσθέτως, εμπλέκεται στη μεταγραφή μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του Wnt. Φαίνεται σταθερή η έκφρασή της στα κύτταρα.



Εικόνα 16: Πρωτεϊνικά επίπεδα της β -CTN στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

1.6 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της β 1 υπομονάδας ιντεγκρίνης

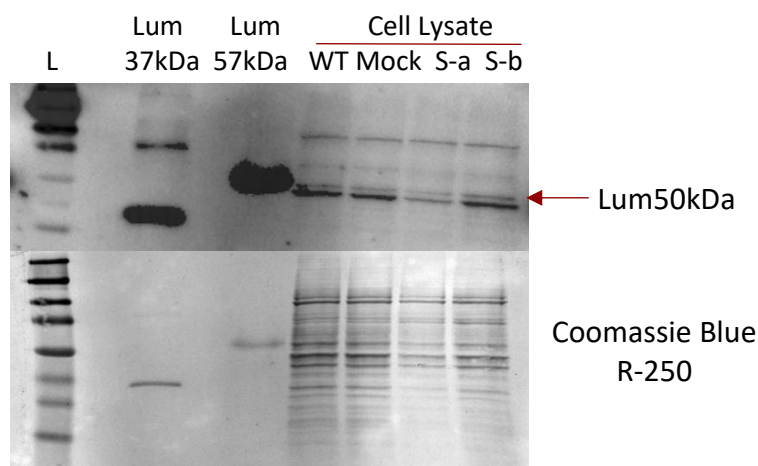
Παρατηρήθηκε πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας β 1 της ιντεγκρίνης και μείωσή της στον κλώνο Snail1-b ο οποίος υπερεκφράζει περισσότερο τον SNAIL1. Επομένως ίσως αυτό επηρεάζει τον σχηματισμό οποιουδήποτε διμερούς που μπορεί να υφίσταται ως υποδοχέας στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.



Εικόνα 17: Πρωτεϊνικά επίπεδα της integrin β 1 στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

1.7 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της ενδογενούς Λουμικάνης (Lum)

Στα MC38 κύτταρα παρατηρήθηκε έκφραση μιας όχι και τόσο γνωστής και διαδεδομένης μορφής της Λουμικάνης, αυτής των 50kDa, η οποία όμως έχει ανιχνευθεί και στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT29. Οι συνηθέστερες μορφές της είναι αυτή των 37kDa που είναι η core protein και αυτή των 57kDa που είναι και η πιο διαδεδομένη γλυκοζυλιωμένη μορφή (η παρουσία της έχει ανιχνευθεί και στα B16F1 κύτταρα του μελανώματος).



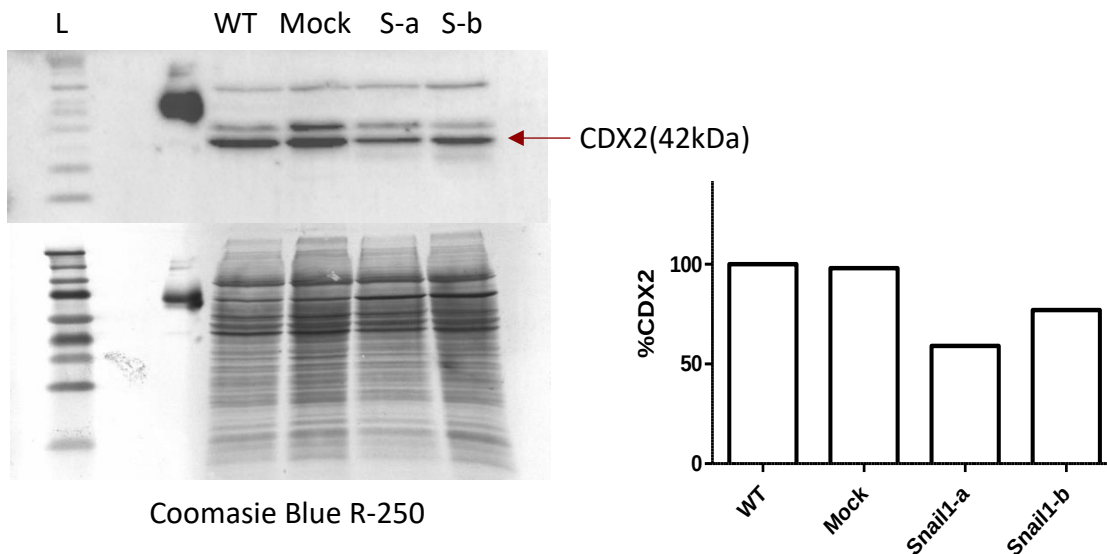
Εικόνα 18: Πρωτεϊνικά επίπεδα της Λουμικάνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Στην μεμβράνη έχουν προστεθεί ως πρότυπα λουμικάνη 37kDa (Lum 37kDa) και λουμικάνη 57kDa (Lum 57kDa)

1.8 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του CDX2

Η πρωτεΐνη CDX-2 είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο CDX2. Αυτό το γονίδιο εκφράζεται στους πυρήνες των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και χρησιμοποιείται επίσης στη διαγνωστική χειρουργική παθολογία ως δείκτης γαστρεντερικής διαφοροποίησης, ειδικά του ορθοκολικού. Δεν έχει καταγραφεί κάποιος άλλος ειδικός δείκτης κυττάρων του παχέος εντέρου, όπως είναι για παράδειγμα η έκκριση μελανίνης στην περίπτωση των B16F1 κυττάρων μελανώματος.

Επιπροσθέτως, έχειδειχθεί ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο EMT, όπως οι SNAIL1 και Slug, ρυθμίζονται θετικά κατά την διαδικασία του wound healing και είναι σε θέση να καταστείλουν τη μεταγραφή CDX2 (Gross, I. et al. 2008)

Λόγω σχεδίασης μελλοντικών *in vivo* πειραμάτων, εξετάστηκε η πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου αυτού στα MC38 κύτταρα. Ανιχνεύθηκε η έκφρασή του, και μάλιστα επιβεβαιώθηκε και η -αναφερόμενη στη βιβλιογραφία- μείωσή της κατά την υπερέκφραση του SNAIL1.

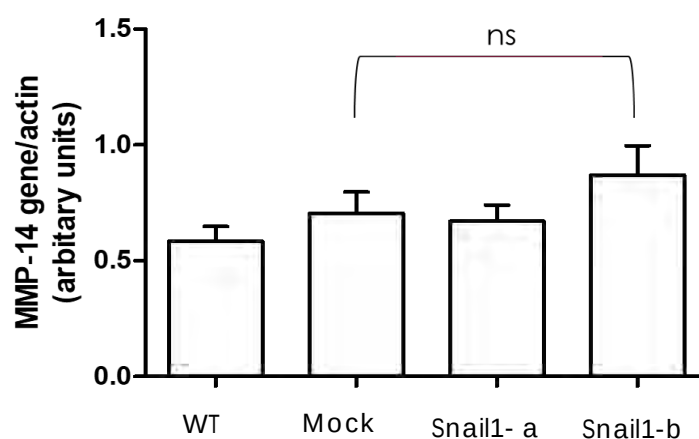


Εικόνα 19: Πρωτεϊνικά επίπεδα του CDX2 στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

1.9 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP-14

Η MMP-14 είναι από τις πιο καλά μελετημένες μεταλλοπρωτεϊνάσες, καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, όχι μόνο ρυθμίζοντας την ενεργότητα ή την έκφραση άλλων μεταλλοπρωτεϊνών, αλλά και μέσω της ρύθμισης μορίων που συσχετίζονται με την ενεργοποίηση της κυτταρικής μετανάστευσης.

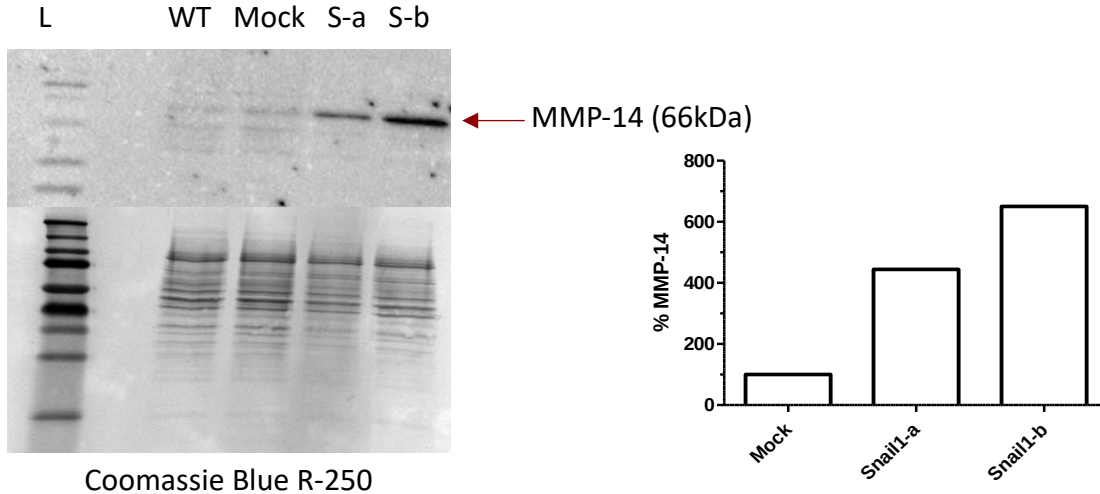
Στα κύτταρα που είναι διαμολυσμένα με τον SNAIL1 και τον εκφράζουν περισσότερο (MC38 Snail1-b) παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της MMP-14 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς.



Εικόνα 20: Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της MMP-14 σε επίπεδο mRNA. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της real time PCR. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

1.10 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της MMP-14

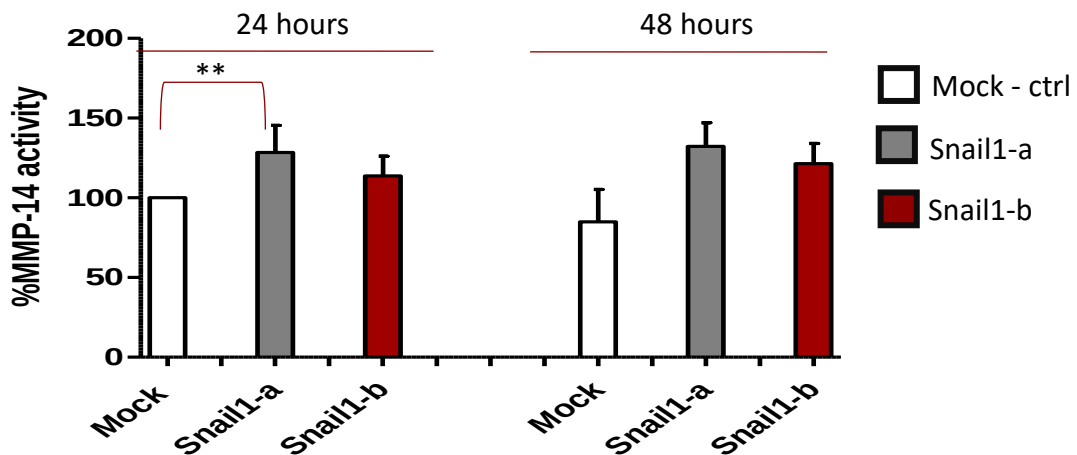
Την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της MMP-14 στους κλώνους που υπερεκφράζουν τον SNAIL1 έρχεται να επιβεβαιώσει η αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της MMP-14, και πάλι ιδιαίτερα στον κλώνο MC38 Snail1-b.



Εικόνα 21: Πρωτεϊνικά επίπεδα της MMP-14 στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

1.11 Μελέτη της ενεργότητας της μεμβρανοσύνδετης MMP-14 στην καρκινική σειρά MC38

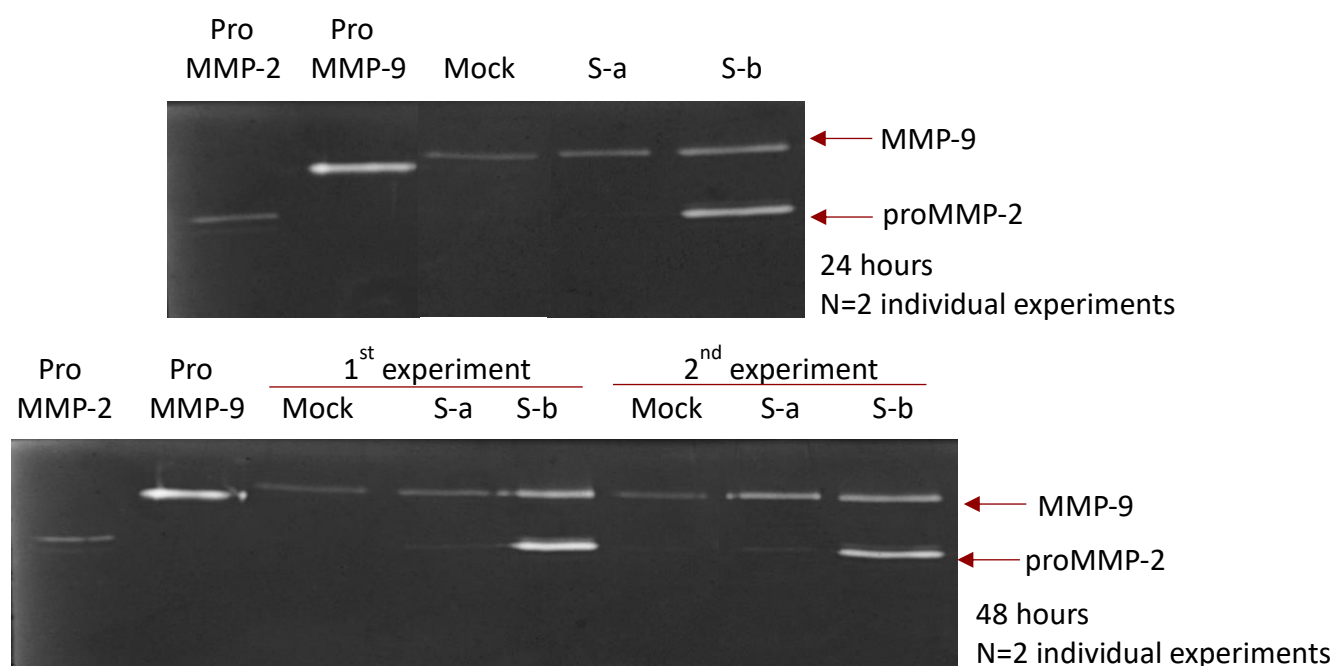
Με βάση τα αποτελέσματα (εικόνα 22), φαίνεται ότι η ενεργότητα της MMP-14 ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα διαμολυσμένα κύτταρα με SNAIL1 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.



Εικόνα 22: Επίδραση του SNAIL1 στην ενεργότητα της MT1-MMP (MMP-14) στα MC38 καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Η ενεργότητα προσδιορίστηκε με βάση τη φθορισμομετρική μέθοδο που αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος. (** $p < 0.01$)

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΖΕΛΑΤΙΝΑΣΩΝ MMP-2, MMP-9

Παρατηρήθηκε αύξηση της MMP-9 καθώς και της proMMP-2, άμεσα συνδεδεμένη με την υπερέκφραση του SNAIL1. Στον SNAIL1-b κλώνο όπου είχε ανιχνευθεί μεγαλύτερη έκφραση του SNAIL1, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη υπερέκφραση των MMP-9 και proMMP-2 κατόπιν 24 και 48 ωρών καλλιέργειας, αντίστοιχα.



Εικόνα 23: Μελέτη της δραστηριότητας των ζελατινασών κατόπιν 24 και 48 ωρών καλλιέργειας των κυττάρων με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (4μg πρωτεΐνης/δείγμα)

3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ SNAIL1 ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MC-38

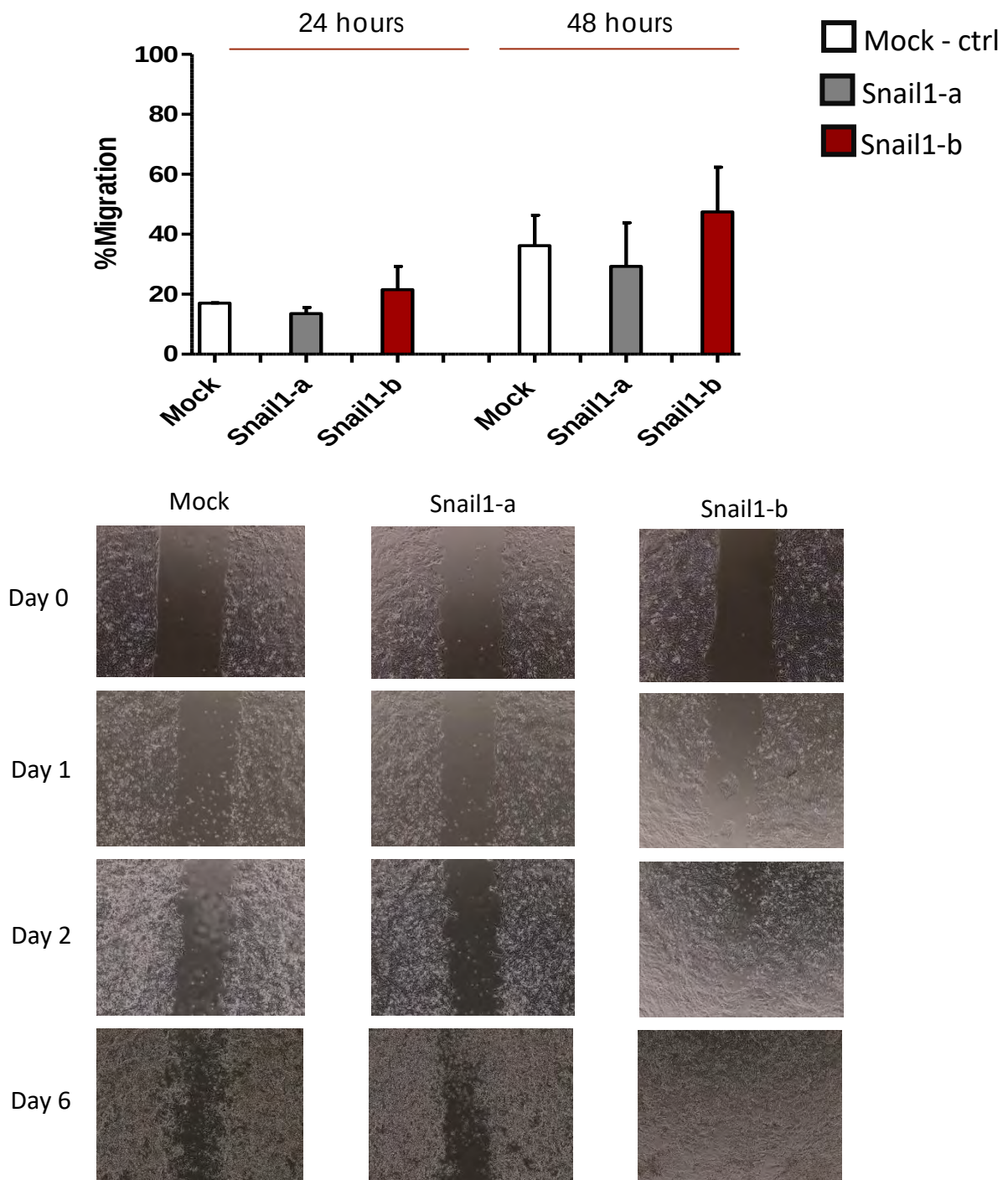
Για την αξιολόγηση της επίδρασης της υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα SNAIL1, έγιναν λειτουργικά πειράματα κινητικότητας σε όλες τις εξεταζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Η κυτταρική κινητικότητα (ή μετανάστευση), είναι η κεντρική διαδικασία εξέλιξης και εναρμονισμένης διατήρησης της ζωής των πολυκύτταρων οργανισμών. Δυσλειτουργία της μπορεί να σημαίνει ενεργοποίηση διηθητικής και μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων, και γι' αυτό το λόγο αξιολογείται.

Τα MC38 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 5×10^4 σε πλάκες καλλιέργειας 24 κελίων. Σε κάθε κελίο εισήχθη σιλικονούχο chamber, το οποίο λόγω δομής του, χώριζε το κάθε κελίο σε δύο ισόχωρες πλευρές, σχηματίζοντας μια υποτιθέμενη πληγή στο κέντρο του κελίου (διαδικασία wound healing).

Μετά από ένα 24ωρο, αφαιρέθηκε προσεκτικά το σιλικονούχο chamber, πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και προστέθηκε θρεπτικό υλικό απουσία ορού.

Φωτογραφίες λήφθηκαν αμέσως μετά την αφαίρεση του σιλικονούχου chamber (0 ώρες), μετά από 24 ώρες, στις 48 ώρες και στις 144 ώρες.



Εικόνα 24: Επίδραση της δράσης του SNAIL1 στην κυτταρική κινητικότητα των MC38 κυττάρων για 24 και 48 h, καθώς και με παρατεταμένο χρόνο 6 ημερών.

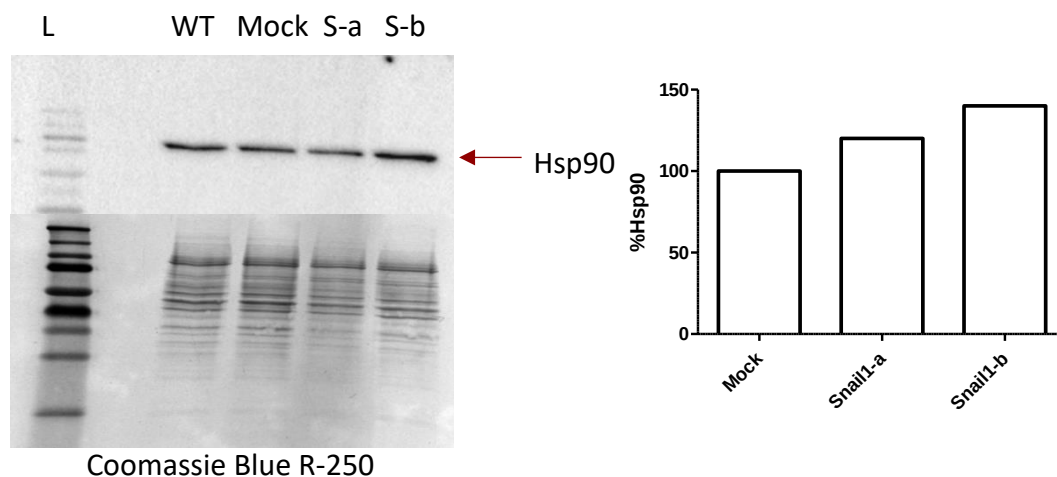
4.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ (EVS)

4.1 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της HSP90

Κατά την απομόνωση των εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs), προκύπτει ένα μίγμα εξωσωμάτων (exosomes) και εκτοσωμάτων (microvesicles) το οποίο διαφέρει στη σύσταση και την ποιότητα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο αλλά και το κατά πόσο βέλτιστο είναι γι' αυτόν το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε. Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας αλλά και της σύστασης του μίγματος αυτού λοιπόν, είναι απαραίτητος ο έλεγχος κάποιων δεικτών για την κάθε κατηγορία EVs.

Η Hsp90 είναι ένας ειδικός δείκτης για τα εξωσώματα κι έτσι, πριν την απομόνωση των κυστιδίων, ελέγχθηκε η πρωτεϊνική του έκφραση στα MC38 κύτταρα.

Η Hsp90 ήταν ανιχνεύσιμη, και συνεπώς θα είναι ο δείκτης που θα χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση παρουσίας εξωσωμάτων στα δείγματα μελλοντικά.

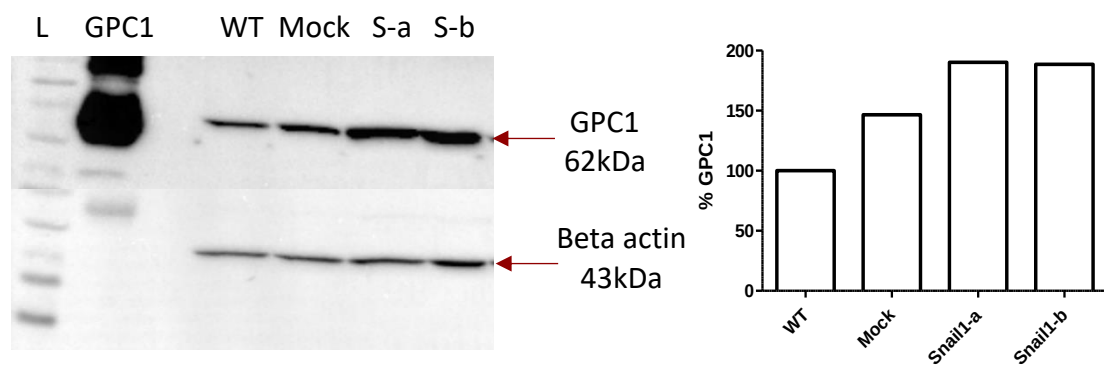


Εικόνα 25: Πρωτεϊνικά επίπεδα της HSP90 στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

4.2 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της Γλυπικάνης 1 (GPC1)

Η Γλυπικάνη-1 (GPC1) είναι μια πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαράνης, αγκυροβολημένη με GPI στη μεμβράνη και υπερεκφράζεται σε ποικίλους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων αυτών του μαστού και του παγκρέατος. Εν αντιθέσει με τα εξωσώματα που προέρχονται από μη-καρκινικές κυτταρικές σειρές, η πρωτεΐνη GPC1 ανιχνεύθηκε μόνο σε εξωσώματα από καρκινικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου.

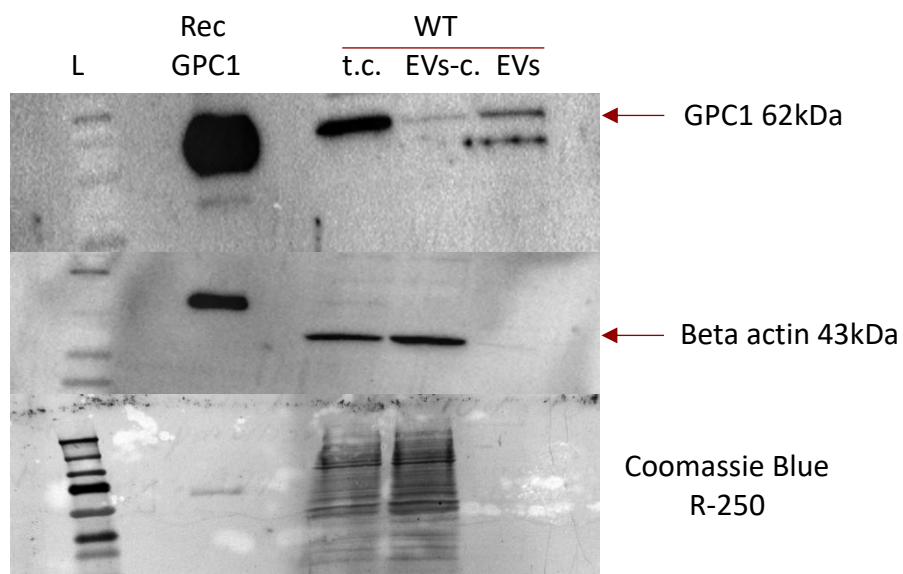
Στα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των MC-38, ανιχνεύθηκε Γλυπικάνη 1 και μάλιστα παρατηρήθηκε αύξησή της, αυξανόμενης της έκφρασης του SNAIL1 (Εικόνα 26). Έτσι, αποφασίστηκε η απομόνωση εξωκυττάρων κυστιδίων και ο έλεγχος πρωτεϊνικής έκφρασης της Γλυπικάνης 1 σε αυτά καθώς και στα εναπομείναντα -μετά την απομόνωση- κυτταρικά εκχυλίσματα.

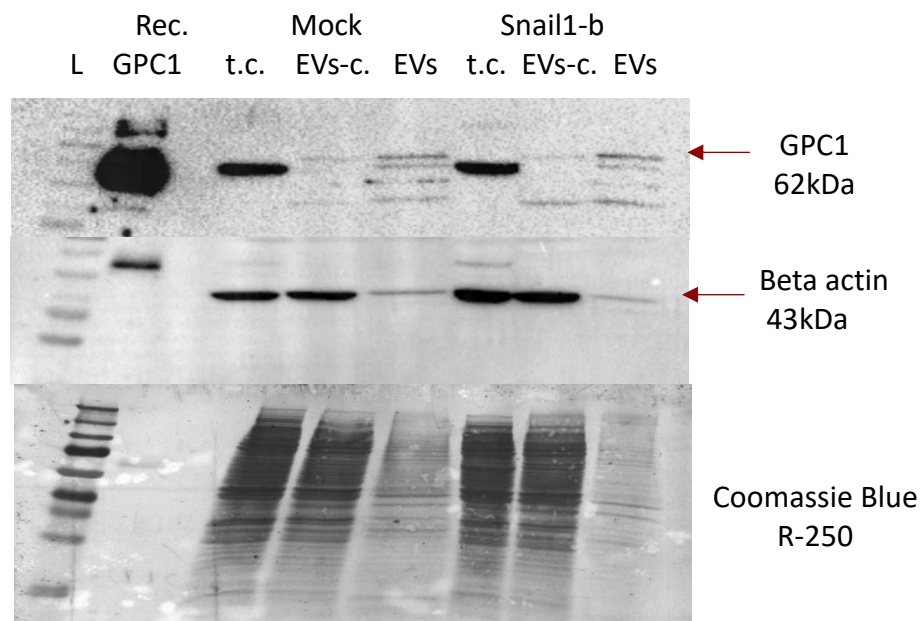


Εικόνα 26: Πρωτεϊνικά επίπεδα της GPC1 στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

4.3 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της Γλυπικάνης 1 στα εξωκυττάρια κυστίδια και στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την απομόνωσή τους

Ανιχνεύθηκε έκφραση της GPC1 στα EVs καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου για πρώτη φορά, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμία επίδραση του SNAIL1 στην έκφραση της GPC1 στα EVs

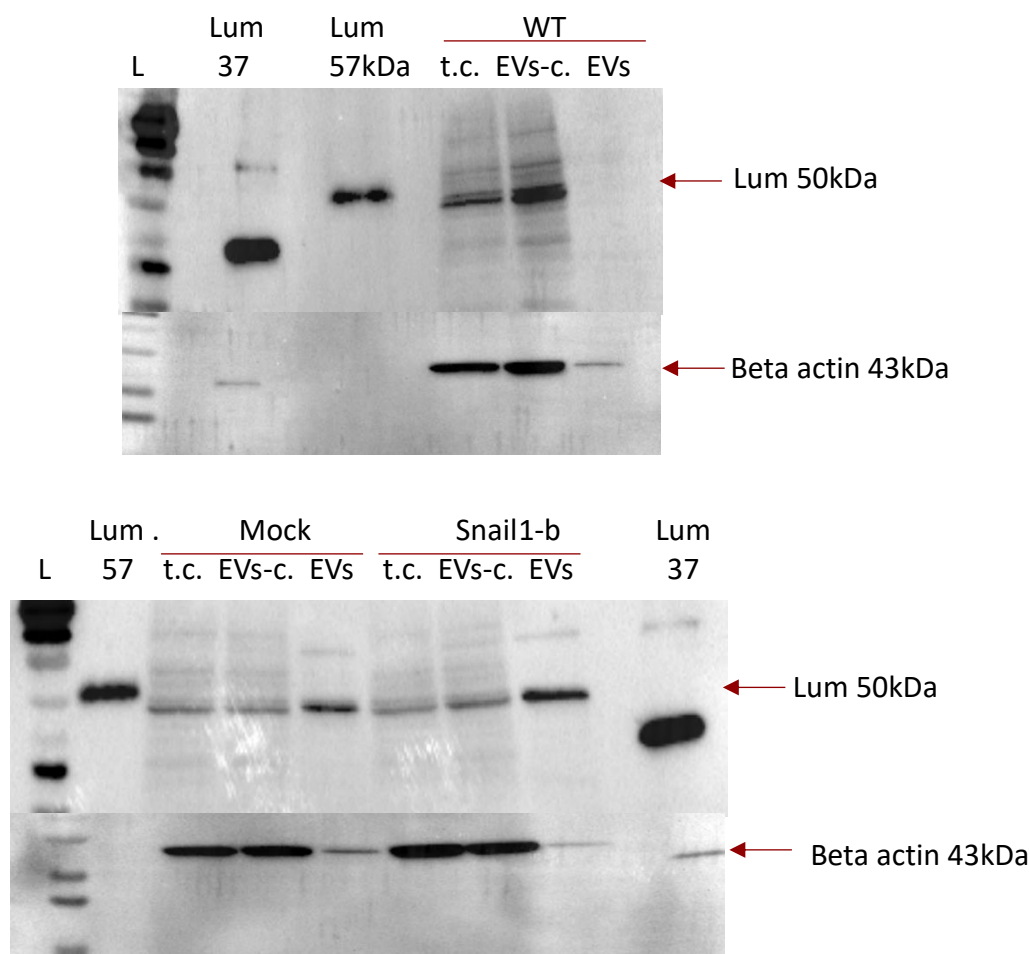




Εικόνα 27: Πρωτεϊνικά επίπεδα της GPC1 στα παρασκευάσματα κατά την απομόνωση των εξωκυττάρων κυστιδίων για τα MC38 WT, Mock και Snail1-b. Όπου t.c.= total cells – κυτταρικό εκχύλισμα συνολικών κυττάρων (κατόπιν κανονικής καλλιέργειας με θρεπτικό που περιείχε ορό), EVs-c.= cells after EVs extraction – κυτταρικά εκχυλίσματα από εναπομείναντα κύτταρα μετά την απομόνωση των εξωκυττάρων κυστιδίων (έχουν υποστεί 24ώρες καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό) και EVs= εξωκυττάρια κυστίδια που απομονώθηκαν με τη μέθοδο απομόνωσης που περιγράφηκε ανωτέρω.

4.4 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της Λουμικάνης στα εξωκυττάρια κυστίδια και στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την απομόνωσή τους

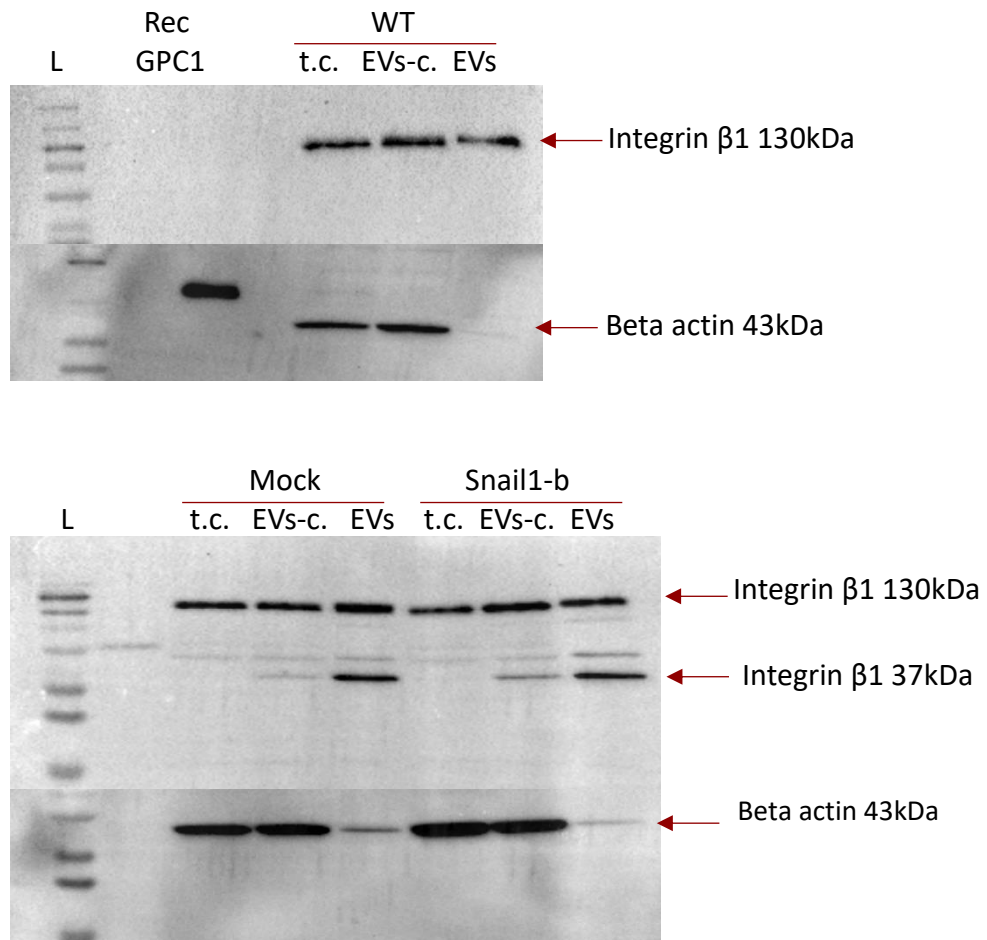
Η λουμικάνη φαίνεται ότι ανευρίσκεται στο μίγμα κυστιδίων μόνο στα μετασχηματισμένα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί είτε με το άδαιο όχημα (Mock) είτε με όχημα που περιείχε γονίδιο υπερέκφρασης του SNAIL1 (SNAIL1-b). Θα μπορούσε σαν πρώτη εκδοχή να δοθεί ότι ίσως η έκφραση που τελικά παρατηρείται οφείλεται στο όχημα μεταφοράς και όχι στο ίδιο το μίγμα κυστιδίων που απομονώνεται από τα υπό ανάλυση κύτταρα (Εικόνα 28). Ωστόσο επανάληψη του πειράματος και περαιτέρω μελέτη κρίνονται απαραίτητα για την επιβεβαίωση της ανωτέρω παρατήρησης.



Εικόνα 28: Πρωτεϊνικά επίπεδα της Λουμικάνης στα παρασκευάσματα κατά την απομόνωση των εξωκυττάρων κυστιδίων για τα MC38 WT, Mock και Snail1-b.

4.5 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της υπομονάδας ιντεγκρίνης β1 στα εξωκυττάρια κυστίδια και στα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την απομόνωσή τους

Κατά την διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος 3 φορές, επαναλήφθηκε η ανίχνευση μιας επιπρόσθετης ζώνης της β1 ιντεγκρινικής υπομονάδας, 37kDa, μόνο στα μίγματα κυστιδίων, γεγονός που επιβεβαιώνει την διαφορετικότητα της φύσης των EVs και την αναγκαιότητα περαιτέρω ανάλυσής τους για τον καλύτερο χαρακτηρισμό των κυττάρων αλλά και του μηχανισμού διεπικοινωνίας μεταξύ τους. Τέλος, δεν ανιχνεύθηκε καμία επίδραση του SNAIL1 στην έκφραση της integrin β1 στα EVs.



Εικόνα 29: Πρωτεϊνικά επίπεδα της β1 ιντεγκρινικής υπομονάδας στα παρασκευάσματα κατά την απομόνωση των εξωκυττάρων κυστιδίων για τα MC38 WT, Mock και Snail1-b (Οι υπόλοιπες μπάρες που ανιχνεύονται ελαφρώς αποτελούν ίχνη λουμικάνης, για την οποία είχε χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μεμβρανή πριν το stripping και την επαναχρησιμοποίησή της εκ νέου με το αντίσωμα για την integrin β1).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος αυτού του μέρους της μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός της κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου MC38 και των σταθερών κλώνων SNAIL1, καθώς και η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των MC38 εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs).

Ο SNAIL1 είναι ο σημαντικότερος μεταγραφικός παράγοντας για την μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT), καθώς αυξάνεται σε καρκινικούς ιστούς και σχετίζεται με την εξέλιξη και την μετάσταση του όγκου. Αρχικός στόχος λοιπόν ήταν να μελετηθούν τα κύτταρα control με τα αντίστοιχα διαμολυσμένα με SNAIL1 κύτταρα, ως προς το επίπεδο των μορφολογικών διαφορών (φαινότυπος), των αλλαγών στη διάταξη του κυτταροσκελετού, των διαφορών σε λειτουργικές κυτταρικές ιδιότητες, όπως η κινητικότητα, καθώς και ο γενικότερος χαρακτηρισμός των κυττάρων μέσω της ανάλυσης διαφόρων δεικτών του EMT. Επί πλέον, σε μοριακό επίπεδο, μελετήθηκε η ενεργότητα σημαντικών μεταλλοπρωτεϊνών, των MMP-14, -9 και -2.

Σαν πρώτο βήμα του χαρακτηρισμού αυτής της κυτταρικής σειράς και των διαμολυσμένων με SNAIL1 κλώνων, εξετάστηκε κατόπιν καλλιέργειάς τους, με αντίστροφη μικροσκοπία ο φαινότυπός τους, αφού πρώτα είχε ελεγχθεί η πρωτεϊνική έκφραση SNAIL1 σε όλους τους κλώνους και είχε παρατηρηθεί αλλαγή της έκφρασης του SNAIL1 στους κλώνους SNAIL1-a και b, με τον κλώνο b να παρουσιάζει την μεγαλύτερη πρωτεϊνική έκφραση. Γενικά, οι διαμολυσμένοι με SNAIL1 κλώνοι, όπως ήταν αναμενόμενο βιβλιογραφικά αλλά και πειραματικά, εμφάνισαν μεσεγχυματικό φαινότυπο, με τον κλώνο SNAIL1-b να εμφανίζει ιδιαίτερα πιο έντονο τον φαινότυπο αυτόν. Κατόπιν, παρατηρήθηκε ομοιόμορφη κατανομή της E-καντχερίνης σε κυτταρικό επίπεδο κυρίως στις ενώσεις και στις προεκβολές υπό μορφή κοκκίων στα WT, στα Mock καθώς και στα Snail1-a, ενώ στα Snail1-b παρατηρήθηκε κατανομή στο κυτταρόπλασμα και κυρίως κοντά στον πυρήνα, γεγονός που ενισχύει τον μεσεγχυματικό φαινότυπο που επιβεβαιώνεται οπτικά και σε αυτή την πειραματική διαδικασία, λόγω του έντονου φαινοτύπου του κλώνου Snail1-b. Τα ανωτέρω ήρθε να επιβεβαιώσει η μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης της E-cadherin όπου αλλαγή παρατηρήθηκε μόνο στο κυτταρικό εκχύλισμα του Snail1-b όπου υπήρξε μείωση, σχετιζόμενη με την υπερέκφραση του SNAIL1. Στο υπερκείμενο δεν ανιχνεύθηκε ύπαρξή της, γεγονός που υποδεικνύει την μη έκκρισή της και απλώς την απώλεια έκφρασης της γνωστής σε εμάς μορφής η οποία αποτελεί δείκτη επιθηλιακού φαινοτύπου. Επιπροσθέτως, ελέγχθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της β-κατενίνης και της β1 ιντεγκρινικής υπομονάδας, όπου παρατηρήθηκε μείωσή της στον κλώνο Snail1-b ο οποίος υπερεκφράζει περισσότερο τον SNAIL1. Επομένως ίσως αυτό

επηρεάζει τον σχηματισμό οποιουδήποτε διμερούς που μπορεί να υφίσταται ως υποδοχέας στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.

Μελετήθηκε επίσης η πρωτεϊνική έκφραση της ενδογενούς Λουμικάνης, ώστε να γίνει γνωστή για τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και να μπορέσουν μελλοντικά να πραγματοποιηθούν πειράματα για την επίδραση της εξωγενούς λουμικάνης στον συγκεκριμένο καρκίνο, ανάλογα με αυτά που είχαν πραγματοποιηθεί για το μελάνωμα (Stasiak et al., 2016). Στα MC38 κύτταρα παρατηρήθηκε έκφραση μιας -όχι και τόσο γνωστής και διαδεδομένης- μορφής της Λουμικάνης, αυτής των 50kDa, η οποία όμως έχει ανιχνευθεί και στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT29.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μια απ' τις κυριότερες αιτίες των καρκινο-εξαρτώμενων θανάτων μεταξύ ανδρών και γυναικών παγκοσμίως και προέρχεται από την κακοήγη μεταλλαγή των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, εμφανίζοντας παράλληλα υψηλή τάση μετάστασης στους πνεύμονες και το ήπαρ. Καθώς λοιπόν έχουν σχεδιαστεί μελλοντικά πειράματα *in vivo*, εξετάστηκε η πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου CDX2 στα MC38 κύτταρα. Αυτό το γονίδιο εκφράζεται στους πυρήνες των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και χρησιμοποιείται επίσης στη διαγνωστική χειρουργική παθολογία ως δείκτης γαστρεντερικής διαφοροποίησης, ειδικά του ορθοκολικού. Δεν έχει καταγραφεί κάποιος άλλος ειδικός δείκτης κυττάρων του παχέος εντέρου, όπως είναι για παράδειγμα η έκκριση μελανίνης στην περίπτωση των B16F1 κυττάρων μελανώματος. Επιπροσθέτως, έχειδειχθεί ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο EMT, όπως οι SNAIL1 και Slug, ρυθμίζονται θετικά κατά την διαδικασία του wound healing και είναι σε θέση να καταστείλουν τη μεταγραφή του CDX2 (Gross, I. et al. 2008). Στα MC38 κύτταρα ανιχνεύθηκε η έκφρασή του, και μάλιστα επιβεβαιώθηκε και η -προαναφερθείσα στη βιβλιογραφία- μείωσή της κατά την υπερέκφραση του SNAIL1, επομένως μπορεί να αποτελέσει πιθανό δείκτη μετάστασης των συγκεκριμένων κυττάρων σε μελλοντικά πειράματα.

Επιπλέον, ελέγχθηκε η ενεργότητα των MMP -2 και -9, όπου διαπιστώθηκε αύξηση της δραστηριότητας της MMP-9 καθώς και της proMMP-2 σε πλήρη αναλογία με την υπερέκφραση του SNAIL1, κατόπιν καλλιέργειας 24 αλλά και 48 ωρών. Αφού μετέπειτα μελετήθηκε η έκφραση της MMP-14 σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο καθώς και η ενεργότητα αυτής, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξησή της στα διαμολυσμένα με SNAIL1 κύτταρα (σε επίπεδο έκφρασης κυρίως στον κλώνο Snail1-b ενώ στα επίπεδα ενεργότητας κυρίως στον κλώνο Snail1-a) σε σύγκριση με τα ελέγχου, γεγονός που συμφωνεί με τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς η MMP-14 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, ρυθμίζοντας την ενεργότητα άλλων πρωτεϊνών ή/και ρυθμίζοντας μόρια που σχετίζονται με την κυτταρική μετανάστευση.

Τέλος, παρατηρήθηκε αυξημένη κυτταρική κινητικότητα του κλώνου Snail1-b σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, καθώς και τον κλώνο Snail1-a, γεγονός που συμφωνεί με τον φαινότυπο αλλά και την πρωτεϊνική έκφραση των δεικτών EMT που μελετήθηκαν ανωτέρω.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε εξωσώματα από καρκινικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου (Melo et al., 2016), η πρωτεΐνη γλυπικάνη 1 (GPC1) ανιχνεύθηκε μόνο σε αυτά, εν αντιθέσει με τα εξωσώματα που προέρχονταν από μη-καρκινικές κυτταρικές σειρές, γεγονός που καθιστά την GPC1 πιθανό ειδικό βιοδείκτη του παγκρεατικού καρκίνου. Με βάση τη συγκεκριμένη έρευνα, έγινε αρχικά έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης της GPC1 σε συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα των MC-38, όπου και παρατηρήθηκε αύξησή της, αυξανόμενης της έκφρασης του SNAIL1. Καθώς αυτό το αποτέλεσμα παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αποφασίστηκε η απομόνωση εξωκυττάρων κυστιδίων και πραγματοποιήθηκε έλεγχος πρωτεϊνικής έκφρασης της Γλυπικάνης 1 σε αυτά καθώς και στα εναπομείναντα -μετά την απομόνωση- κυτταρικά εκχυλίσματα. Μετά τον αρκετά επιτυχή χαρακτηρισμό των συνολικών κυττάρων ανωτέρω, επιλέχθηκε ο κλώνος Snail1-b ως ο πιο ενδιαφέρων εκ των δύο διαμολυσμένων με SNAIL1 κλώνων και επιχειρήθηκε απομόνωση αλλά και χαρακτηρισμός των εξωκυττάρων κυστιδίων που προκύπτουν απ' τα MC38WT, Mock αλλά και Snail1-b. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων αυτών, ανιχνεύθηκε έκφραση της GPC1 στα EVs καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου για πρώτη φορά, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμία επίδραση του SNAIL1 στην έκφραση της GPC1 στα EVs.

Τα εξωκυττάρια κυστίδια (EVs) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για τις δύο τάξεις κυστιδίων (εξωσώματα και εκτοσώματα) όταν αναφέρονται μαζί. Τα εξωσώματα είναι κυστίδια τα οποία απελευθερώνονται κατά την εξωκύττωση των πολυκυστιδικών σωμάτων (MVBs) και ενώ τα εκτοσώματα (ή αλλιώς μικροκυστίδια) είναι κυστίδια που σχηματίζονται στην πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνονται από αυτή. Παρόλη τη διαφορά στον τρόπο σχηματισμού των δύο, δείχνουν να έχουν αρκετά ίδια λειτουργία μετά την απελευθέρωσή τους και αμφότερα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην φυσιολογία και παθολογία μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων και της μεταφοράς βιολογικής πληροφορίας από κύτταρο σε κύτταρο (Cocucci et al., 2015). Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο έγινε απομόνωση μίγματος κυστιδίων και όχι κάποιας εκ των κατηγοριών ή ακόμα και των δύο ξεχωριστά.

Καθώς κατά την απομόνωση των εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs), προκύπτει μίγμα το οποίο διαφέρει στη σύσταση και την ποιότητα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο αλλά και το πρωτόκολλο, κρίθηκε απαραίτητος έλεγχος κάποιων δεικτών για την ταυτοποίηση κάθε κατηγορίας EVs. Η Hsp90 η οποία αποτελεί ειδικό δείκτη των εξωσωμάτων ήταν ανιχνεύσιμη στο συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα, και συνεπώς θα είναι ένας απ' τους δείκτες που θα χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση παρουσίας εξωσωμάτων στα δείγματα μελλοντικά.

Επιπροσθέτως, ελέγχθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της ιντεγκρινικής υπομονάδας $\beta 1$ και της λουμικάνης στα εξωκυττάρια κυστίδια καθώς και στα εναπομείναντα -μετά την απομόνωση- κυτταρικά εκχυλίσματα όπου και ανιχνεύθηκαν επιπρόσθετες και διαφορετικές ζώνες κατόπιν σύγκρισης με τα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, χωρίς καμία επίδραση του SNAIL1 στην έκφραση στα δείγματα EVs, γεγονός που κάνει το δείγμα κυστιδίων να διαφέρει σημαντικά και, ακόμη και ελλείψει του πλήρους χαρακτηρισμού του, να επιβεβαιώνεται η διαφορετική φύση του.

Η σύγκριση της πρωτεϊνικής έκφρασης κάθε στόχου έγινε μόνο βάσει της έκφρασης μεταξύ των κλώνων, χωρίς να διαμεσολαβείται από ποσοτικοποίηση με χρήση της ακτίνης ή της Coomassie blue, καθώς πρόκειται για διαφορετικού τύπου πρωτεϊνική περιεκτικότητα στο κάθε δείγμα, ανάλογα αν αυτό είναι κυτταρικό ή κυστιδίων, αλλά ακόμα και μεταξύ των κυστιδίων, εξαρτάται απ' τη σύσταση που προκύπτει απ' τον κάθε κυτταρικό τύπο. Για περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν, απαιτείται ο καθορισμός της σύστασης, μέσω electron microscopy αλλά και πρωτεϊνικής έκφρασης ειδικών δεικτών εξωσωμάτων και εκτοσωμάτων, καθώς και η επιβεβαίωση της καθαρότητας με χρήση ειδικών αποπτωτικών σωμάτων.

ΜΕΡΟΣ Β΄

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΛΑΡΥΓΓΑ

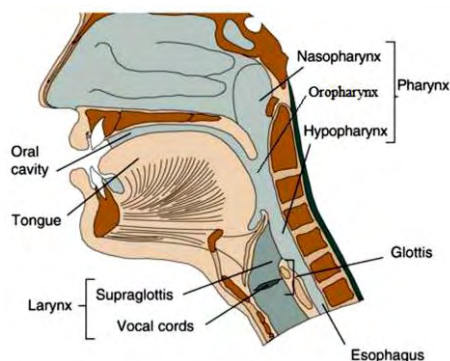
1.1 Γενική εισαγωγή

Ο λάρυγγας αποτελεί την πιο περίπλοκη δομή της ανώτερης αναπνευστικής και γαστρεντερικής οδού. Εξαιτίας του ρόλου του στην ομιλία, στην αναπνοή και στην προστασία της αναπνευστικής οδού, καθιστά την ακολουθούμενη θεραπευτική αγωγή ποικίλη και αμφιλεγόμενη.

Ο λάρυγγας ανήκει στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Βρίσκεται στο πρόσθιο τμήμα της μέσης γραμμής του τραχήλου και στο ανώτερο άκρο της τραχείας και έχει πλάτος από δυο ως πέντε εκατοστά. Ο σκελετός του λάρυγγα αποτελείται από χόνδρους, οι οποίοι συνδεόμενοι με υμένες και συνδέσμους, κινούνται με την ενέργεια μυών. Συγκεκριμένα, αποτελείται από εννέα χόνδρους: τρεις μονοφυείς (τον θυρεοειδή, τον κρικοειδή και την επιγλωττίδα) και τρεις διφυείς (τους αρυταινοειδείς, τους κερατοειδείς και τους σφηνοειδείς). Ο θυρεοειδής είναι ο μεγαλύτερος χόνδρος του λάρυγγα, ο οποίος βρίσκεται στο μπροστινό τμήμα του τραχήλου και σχηματίζει το μήλο του Αδάμ.

Ανατομικά αποτελείται από 3 τμήματα:

- την **υπεργλωττιδική μοίρα** που αποτελεί το ανώτερο τμήμα και βρίσκεται πάνω από τις γνήσιες φωνητικές χορδές. Η μοίρα αυτή περιλαμβάνει την επιγλωττίδα, τα επάρματα των αρυταινοειδών χόνδρων, τις αρυεπιγλωττιδικές πτυχές, και τις νόθες φωνητικές χορδές.
- τη **γλωττίδα** που βρίσκεται στο ενδιάμεσο και αποτελεί το χώρο μεταξύ των γνήσιων φωνητικών χορδών. Άξιο αναφοράς είναι η σπανιότητα των λεμφαγγείων στη γλωττίδα, καθώς και στις φωνητικές χορδές, γεγονός που ερμηνεύει τη φτωχή λεμφαγγειακή μετάσταση των καρκίνων που δημιουργούνται σε αυτό το ανατομικό σημείο.
- την **υπογλωττιδική μοίρα** που βρίσκεται κάτω από τις γνήσιες φωνητικές χορδές. Αυτή η μοίρα συνδέεται με την τραχεία



Εικόνα 30: Ανατομία της ανώτερης αναπνευστικής και γαστρεντερικής οδού.

1.2 Ταξινόμηση

Ο καρκίνος του λάρυγγα αποτελείται κυρίως από συμβατικά καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (SCC) . Άλλες λαρυγγικές κακοήθειες περιλαμβάνουν:

- Καρκίνωμα in situ όπου ο καρκίνος περιορίζεται στο πλακώδες επιθήλιο
- Μη διαφοροποιημένο καρκίνωμα
- Αδενοκαρκίνωμα
- Διάφορα καρκινώματα (αδενοκυστικά, νευροενδοκρινικά καρκινώματα κλπ) όπου ο καρκίνος ξεκινά στους σιελογόνους αδένες.
- Σαρκώματα

Το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων διαιρείται περαιτέρω ανάλογα με τη θέση εμφάνισής του σε τέσσερις υποτύπους:

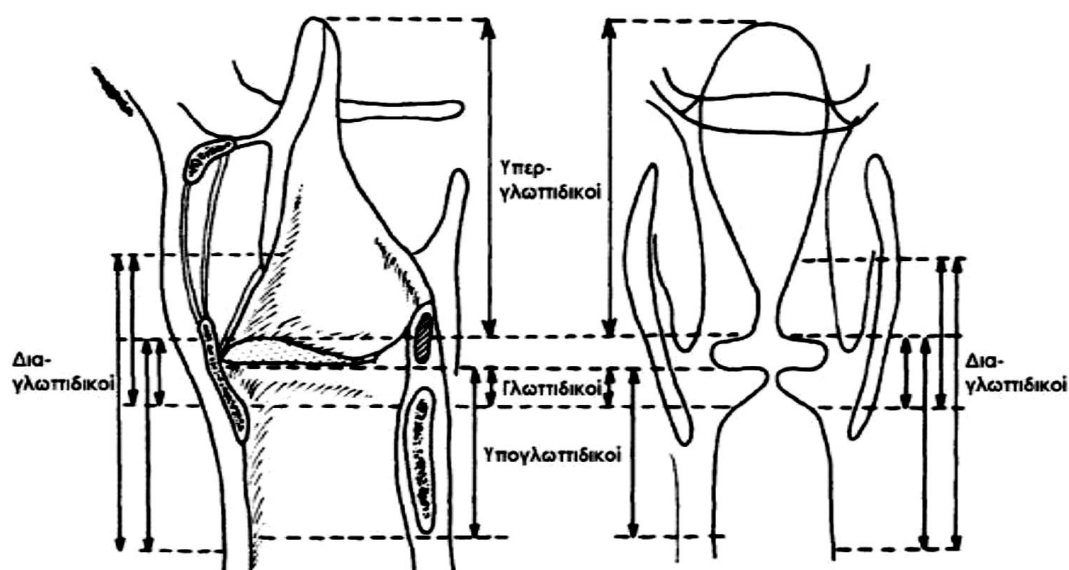
I. **Γλωττιδικοί όγκοι** : Περιλαμβάνουν τις γνήσιες φωνητικές χορδές. Η γλωττίδα εκτείνεται από την κορυφή της λαρυγγικής κοιλίας έως 1cm χαμηλότερα. Οι όγκοι αυτοί συνιστούν 60-65% όλων των περιπτώσεων. Συχνότερα αναπτύσσονται στο πρόσθιο τριτημόριο των φωνητικών χορδών. Παραμένουν εντοπισμένοι για μακρές περιόδους, εξαιτίας των χόνδρινων τοιχωμάτων που τους περιβάλλουν και της έλλειψης λεμφαγγείων. Σταδιακά μπορεί να επεκταθούν στη πρόσθια γωνία και την ετερόπλευρη φωνητική χορδή και τελικά να διηθήσουν το θυρεοειδή χόνδρο ως τα μαλακά μόρια του πρόσθιου τραχήλου. Η κάθετη επέκτασή τους πάνω και κάτω από τη γλωττίδα είναι συχνότερη από την πλάγια εξάπλωση. Καθήλωση της φωνητικής χορδής αποτελεί σημείο βαθιάς διήθησης, τουλάχιστον έως το φωνητικό μυ. Μετάσταση σε τραχηλικούς λεμφαδένες συμβαίνει σπάνια, σε ποσοστό έως 4- 6% .

II. **Υπεργλωττιδικοί όγκοι** : Αναπτύσσονται στην περιοχή που εκτείνεται από το ανώτερο όριο της επιγλωττίδας, έως το ανώτερο όριο της γλωττίδας. Οι όγκοι των αρυταινοεπιγλωττιδικών πτυχών παρουσιάζουν βιολογική συμπεριφορά παρόμοια με εκείνη των όγκων του υποφάρυγγα και ταξινομούνται ως οριακοί. Οι όγκοι αυτοί αποτελούν 30-35% των καρκινωμάτων. Το 1/3 των υπεργλωττιδικών όγκων εξορμάται από την επιγλωττίδα. Διήθηση του προ-επιγλωττιδικού χώρου είναι συχνό γνώρισμα του υπεργλωττιδικού καρκινώματος. Επίσης ο όγκος είναι δυνατό να επεκταθεί κρανικά έως τη βάση της γλώσσας. Διήθηση της γλωττίδας συμβαίνει μόλις σε 1% των περιπτώσεων. Η συχνότητα μετάστασης στους τραχηλικούς λεμφαδένες είναι 40% .

III. **Υπογλωττιδικοί όγκοι** : Αναπτύσσονται ή επεκτείνονται κάτω από την περιοχή της γλωττίδας, έως το κατώτερο όριο του κρικοειδούς χόνδρου. Είναι αρκετά σπάνιοι (<5% των περιπτώσεων). Έχουν την τάση να εξαπλώνονται κυκλοτερώς. Η διήθηση του κρικοειδούς χόνδρου αποτελεί τον κανόνα. Συχνή είναι επίσης η επέκταση προς τον προλαρυγγικό χώρο και το θυρεοειδή αδέν. Οι όγκοι μεθίστανται σε ποσοστό 15-20% στους τραχηλικούς λεμφαδένες και 50% στους παρατραχειακούς.

IV. **Διαγλωττιδικοί όγκοι** : Πρόκειται για όγκους που διέρχονται από τη λαρυγγική κοιλία, προσβάλλοντας τις κοιλιαίες πτυχές και τις γνήσιες φωνητικές χορδές.

Αποτελούν λιγότερο από 5% των καρκινωμάτων. Επεκτείνονται κυρίως παραγλωττιδικά. Εξαιτίας της πλούσιας λεμφικής αγγείωσης της περιοχής, σε 52% των περιπτώσεων παρατηρούνται μεταστάσεις σε τραχηλικούς λεμφαδένες.



Εικόνα 31:Θέσεις ανάπτυξης όγκων του λάρυγγα.

1.3 Επιδημιολογία

Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του λάρυγγα είναι σχετικά χαμηλή σε σύγκριση με εκείνη των καρκινωμάτων όλων των οργάνων. Ο καρκίνος του λάρυγγα περιλαμβάνει 2 έως 5% όλων των κακοήθων νόσων που διαγιγνώσκονται ετησίως, παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης είναι συγκρίσιμη με εκείνη του καρκίνου του στόματος και του θυρεοειδούς, αλλά μόνο το ένα δέκατο τόσο υψηλή όσο εκείνη του καρκίνου του πνεύμονα.

Υπάρχουν περιοχές όπου η συχνότητα είναι μεγαλύτερη (περισσότερο από το 10 τοις 10.000) όπως η Ισπανία, η Ιταλία, η Γαλλία, η Βραζιλία, η Ινδία και πληθυσμοί από Αφρική και Καραϊβική σε μέρη των ΗΠΑ. Περιοχές με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης (λιγότερο από 2 ανά 100.000) περιλαμβάνουν την Ιαπωνία, τη Νορβηγία και τη Σουηδία. Παγκοσμίως, η μέγιστη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του λάρυγγα είναι υψηλότερη στους άνδρες ηλικίας μεταξύ 55 έως 65 ετών. Η αναλογία ανδρών προς γυναίκες κυμαίνεται από 5 έως 20: 1, ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχει μια μείωση σε αυτή την αναλογία, λόγω της αύξησης των λαρυγγικού καρκίνου στις γυναίκες. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη διαφορά κοινωνικής τάξης, καθώς ο καρκίνος του λάρυγγα είναι δύο φορές πιο συχνός στους άνδρες με χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση. Επίσης, είναι πιο συχνός σε άτομα που κατοικούν στις πόλεις από ότι στις αγροτικές περιοχές. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι οι κάτοικοι από τις πιο βιομηχανοποιημένες πόλεις έχουν μια συχνότητα καρκίνου του λάρυγγα 2 έως 3 φορές υψηλότερη από εκείνη των κατοίκων της υπαίθρου. Αυτές οι

φυλετικές, κοινωνικές και αστικές διαφορές ίσως να ανακλούν διαφορετικό τρόπο ζωής και συνήθειες και επίσης επιβεβαιώνουν τις ήδη αναγνωρισμένες επιβλαβείς συνέπειες του καπνού και του αλκοόλ.

1.4 Αιτιολογία

Η ακριβής αιτία του καρκίνου του λάρυγγα είναι ακόμα άγνωστη. Ωστόσο, αρκετοί αλληλένδετοι συν-παράγοντες (κυρίως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ), είναι σαφώς σχετιζόμενοι με μία αυξημένη συχνότητα στον καρκίνο αυτό. Τα ανωτέρω αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου κατά έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Φαίνεται ότι η νικοτίνη δεν είναι υπεύθυνη για τον ίδιο τον καρκίνο, αλλά οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και νιτροζαμίνες είναι καρκινογόνα. Η κακή διατροφή και στοματική υγιεινή, η ανεπάρκεια βιταμινών, η κίρρωση και το καταβεβλημένο ανοσοποιητικό σύστημα που συχνά εντοπίζονται σε αλκοολικούς μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην καρκινική διαδικασία. Μολύνσεις από απλό έρπητα και HPV, γαστροοισοφαγική αντανάκλαστική ασθένεια, ανατομικές δυσμορφίες, σύνδρομο Plummer-Vinson, εισπνοή ατμού και θερμότητας, θερμικά εγκαύματα και έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, αμianto, νικέλιο, υφαντικές ίνες και διάφορες χημικές ουσίες, όπως η φορμαλδεΰδη, το χλωριούχο βινύλιο και βενζοπυρένια, έχουν επίσης θεωρηθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες.

Πολλές μελέτες υπό εξέλιξη αναμένεται να εντοπίσουν γενετικούς παράγοντες και ογκογονίδια που μπορεί να έχουν κάποιο αιτιολογικό ενδιαφέρον (Mastronikolis et al., 2009)

1.5 Συμπτώματα

Οι υπεργλωττιδικοί όγκοι συχνά προκαλούν δυσφαγία, αλλαγή στην φωνή, αίσθηση ξένου σώματος στο λαιμό, αιμόπτυση και πόνο κατά την κατάποση. Στις περιπτώσεις γλωττιδικών καρκίνων συχνά παρουσιάζεται βραχνάδα και τέλος, στις περιπτώσεις των υπογλωττιδικών καρκίνων παρουσιάζεται δύσπνοια και συριγμός. [42,43,44].

1.6 Πρόγνωση – Σταδιοποίηση

Μόλις η διάγνωση του καρκίνου του λάρυγγα έχει τεκμηριωθεί, η ασθένεια σταδιοποιείται σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης TNM (στάδια I-IV), χρησιμοποιώντας τα κριτήρια UICC / AJCC. Αυτό το σύστημα λαμβάνει υπόψη το μέγεθος του όγκου και τη θέση (T), εμπλοκή λεμφαδένων (N) και την παρουσία μακρινής μετάστασης (M).

Σε γενικές γραμμές, όσο υψηλότερο είναι το στάδιο (τόσο συνολικά όσο και στο εσωτερικό κάθε κατηγορίας), τόσο πιο κακή είναι η πρόγνωση. Μικροί γλωττιδικοί καρκίνοι έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους υπεργλωττιδικούς. Η συνολική 5-ετής επιβίωση μετά από αγωγή είναι 80% για τους γλωττιδικούς και 50% για τους υπεργλωττιδικούς όγκους, κυρίως επειδή οι τελευταίοι έχουν παρουσιάσει μια αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μεταστάσεων στους λεμφαδένες. Σχεδόν τα δύο τρίτα των ασθενών με υπεργλωττιδικό καρκίνο έχουν μεταστάσεις στο λαιμό κατά το χρόνο της αρχικής θεραπείας. Η επιβίωση μειώνεται κατά περισσότερο από το ένα τρίτο όταν κλινικά θετικοί λεμφαδένες είναι παρόντες. Η πενταετής χωρίς νόσο επιβίωση των ασθενών με υπεργλωττιδικό καρκίνο είναι 80% για τα στάδια III, 70% για το στάδιο III και 40% για το στάδιο IV. Οι ασθενείς με καρκίνους της γλωττίδας έχουν μια καλύτερη μακροπρόθεσμη πρόγνωση. Η πενταετής χωρίς νόσο επιβίωση ασθενεία για τα στάδια I-II είναι 85% -90%, για το στάδιο III 75% και για το στάδιο IV 45% -50%. Ωστόσο, σε περιπτώσεις με εξαιρετικά προηγμένη τοπική και περιφερειακή ασθένεια η συνολική 5ετής επιβίωση είναι λιγότερο από 5% (Mastronikolis et al.,2009).

Υπεργλωττιδική μοίρα

TX	Δεν υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης της έκτασης του όγκου
T0	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ
T1	Ο όγκος περιορίζεται σε μια θέση της υπεργλωττιδικής μοίρας, με φυσιολογική κινητικότητα των φωνητικών χορδών
T2	Ο όγκος διηθεί στο βλεννογόνο σε περισσότερες από μια θέσεις της υπεργλωττιδικής μοίρας ή της γλωττίδας, με φυσιολογική κίνηση του λάρυγγα.
T3	Ο όγκος περιορίζεται στο λάρυγγα με καθήλωση των φωνητικών χορδών
T4a	Ο όγκος εισβάλλει στο θυρεοειδή χόνδρο και/ή σε ιστούς πέρα από το λάρυγγα (π.χ μαλακοί ιστοί του λαιμού συμπεριλαμβανομένων των μυών της γλώσσας, ή τον οισοφάγο)
T4b	Ο όγκος εισβάλλει σε προσπονδυλικό χώρο, περιβάλλει την καρωτιδική αρτηρία ή εισβάλλει σε μεσοθωρακικές δομές

Γλωττιδική μοίρα

TX	Δεν υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης της έκτασης του όγκου
T0	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ
T1	Ο όγκος περιορίζεται στις φωνητικές χορδές με φυσιολογική κινητικότητα
T1a	Ο όγκος περιορίζεται στη μία φωνητική χορδή
T1b	Ο όγκος διηθεί και τις δύο φωνητικές χορδές
T2	Ο όγκος εισβάλλει στην υπεργλωττίδα ή/και στην υπογλωττίδα, με διαταραγμένη κινητικότητα των φωνητικών χορδών

T3	Ο όγκος περιορίζεται στο λάρυγγα με καθήλωση των φωνητικών χορδών
T4a	Ο όγκος εισβάλλει στο θυρεοειδή χόνδρο και/ή σε ιστούς πέρα από το λάρυγγα (π.χ μαλακοί ιστοί του λαιμού συμπεριλαμβανομένων των μυών της γλώσσας, ή τον οισοφάγο)
T4b	Ο όγκος εισβάλλει σε προσπονδυλικό χώρο, περιβάλλει την καρωτιδική αρτηρία ή εισβάλλει σε μεσοθωρακικές δομές

Υπογλωττιδική μοίρα

TX	Δεν υπάρχει δυνατότητα εκτίμησης της έκτασης του όγκου
T0	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα in situ
T1	Ο όγκος περιορίζεται στην υπογλωττιδική μοίρα
T2	Ο όγκος εκτείνεται στη μια ή και στις δυο φωνητικές χορδές με φυσιολογική ή αλλοιωμένη κινητικότητα
T3	Ο όγκος περιορίζεται στο λάρυγγα με καθήλωση των φωνητικών χορδών
T4a	Ο όγκος εισβάλλει στο θυρεοειδή χόνδρο και/ή σε ιστούς πέρα από το λάρυγγα (π.χ μαλακοί ιστοί του λαιμού συμπεριλαμβανομένων των μυών της γλώσσας, ή τον οισοφάγο)
T4b	Ο όγκος εισβάλλει σε προσπονδυλικό χώρο, περιβάλλει την καρωτιδική αρτηρία ή εισβάλλει σε μεσοθωρακικές δομές

Επιχώριοι λεμφαδένες-Nodes (N)

NX	Η μετάσταση στους περιφερειακούς λεμφαδένες δεν μπορεί να εκτιμηθεί
N0	Απουσία διήθησης λεμφαδένων
N1	Μετάσταση σε ένα ομόπλευρο λεμφαδένα, μεγίστης διαμέτρου 3cm ή λιγότερο.
N2	Μετάσταση σε ένα ομόπλευρο λεμφαδένα, μεγίστης διαμέτρου μεταξύ 3 και 6cm ή μεταστάσεις σε περισσότερους από ένα λεμφαδένες, ομόπλευρα, ετερόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα, από τις οποίες καμία δεν ξεπερνάει σε μέγιστη διάμετρο τα 6cm.
N2a	Μετάσταση σε ένα ομόπλευρο λεμφαδένα μεγίστης διαμέτρου μεταξύ 3 και 6cm.
N2b	Μεταστάσεις σε περισσότερους από ένα ομόπλευρους λεμφαδένες, καμία από τις οποίες δεν ξεπερνάει σε μέγιστη διάμετρο τα 6cm.
N2c	Μεταστάσεις σε επιχώριους λεμφαδένες, ετερόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα, καμία από τις οποίες δεν ξεπερνάει σε μέγιστη διάμετρο τα 6cm.
N3	Μετάσταση σε επιχώριο λεμφαδένα μεγίστης διαμέτρου περισσότερο από 6cm.

Απομακρυσμένες μεταστάσεις-Metastases (M)

MX	Η απομακρυσμένη μετάσταση δεν μπορεί να εκτιμηθεί
M0	Απουσία απομακρυσμένων μεταλλάξεων
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταλλάξεων

Το στάδιο προκύπτει από την ομαδοποίηση της αξιολόγησης μεγέθους όγκου, λεμφαδένων και απομακρυσμένων μεταστάσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ III : Στάδια καρκίνου του λάρυγγα

Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο I	T1	N0	M0
Στάδιο II	T2	N0	M0
Στάδιο III	T3	N0	M0
	T1,T2 ή T3	N1	M0
Στάδιο IV	T4	N0 ή N1	M0
	οποιαδήποτε T	N2 ή N3	M0
	οποιαδήποτε T	οποιαδήποτε N	M1

1.7 Βιοδείκτες

Όσο αναφορά τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, στο παρελθόν οι βιοδείκτες είχαν χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικοί δείκτες για ασθενείς με SCC. Πρόσφατα, ο ρόλος των βιοδεικτών έχει διευρυνθεί για την αντιμετώπιση όλων των πτυχών της φροντίδας των ασθενών από την έγκαιρη διάγνωση της νόσου μέχρι την ακριβή σταδιοποίησή της και την επιλογή εκείνων των ασθενών που είναι πιο πιθανόν να επωφεληθούν από συγκεκριμένες θεραπείες και την παρακολούθηση τους μετεγχειρητικά. Παρακάτω αναφέρονται βιοδείκτες για τον ΚΠΕΚΤ τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και σε πρωτεϊνικό.

- ✓ Ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV)
- ✓ Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
- ✓ Απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of heterozygosity, LOH)
- ✓ Μεθυλίωση
- ✓ Ιντερλευκίνη 6 και 8 (IL-6 και IL-8)
- ✓ Κυτοκερατίνη 17 (CK-17)
- ✓ ΜικροRNA (microRNA, miRNA)
- ✓ Ακτίνη και μυοσίνη
- ✓ Γονίδιο που σχετίζεται με το μελάνωμα (Melanoma-associated gene, MAGE)
- ✓ Εξωσώματα

Από κλινικής πλευράς, τα εξωσώματα βρίσκονται σε αρκετά υγρά του σώματος και δεδομένου του γεγονότος της σχετικά εύκολης και μη επεμβατικής φύσης της απομόνωσής τους από τους ασθενείς και στην συνέχεια από τα δείγματα των ασθενών καθώς και των διακριτών πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων που περιέχουν, αρκετές μελέτες (Michael et al., 2010; Skog et al., 2008; Taylor et al.2008; Zhou et al., 2008) έχουν προτείνει τη χρησιμοποίηση εξωσωμικών βιοδεικτών για διαγνωστικούς σκοπούς. Η πλειονότητα αυτών των μελετών ερευνά εξωσώματα που έχουν απομονωθεί από τον ορό, αν και αρκετές έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε

πρωτεομικούς εξωσωμικούς βιοδείκτες στα ούρα, για νεφρικές νόσους ή τον καρκίνο του προστάτη και το σίελο. Αναλυτικότερα, προσφάτως αναφέρθηκε ότι τα εξωσώματα στο σίελο μπορούν να ληφθούν από τα στοματικά κερατινοκύτταρα και κατά συνέπεια να ρυθμίσουν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μεταβάλλοντας τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα στόχους. Αυτός ο μηχανισμός πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία σταθερών mRNA μεταγράφων μέσα στα εξωσώματα. Αυτά τα μετάγραφα που βρίσκονται μέσα στα εξωσώματα είναι προστατευμένα από τις νουκλεάσες και μπορούν να μεταφερθούν έτσι στα κύτταρα στόχους. Επιπλέον, τα εξωσώματα θεωρούνται σαν ένας μηχανισμός με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα και τα μολυσμένα από ιό κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν το μικροπεριβάλλον τους. Επιπρόσθετα, οι ιοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν το μονοπάτι των εξωσωμάτων για την διάδοση μολύνσεων καθώς και τη διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στην περίπτωση ασθενών με καρκίνο του ρινοφάρυγγα έχουν ανιχνευθεί σε αναλύσεις του περιφερικού αίματος γονιδιακά υλικά όπως ιικό DNA και microRNAs, εξωσώματα και κυτταροκίνες. Η σχέση μεταξύ του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου και των εξωσωμάτων αρχικά δείχτηκε σε καρκινικά εξωσώματα σιέλου, ορού και πλάσματος ασθενών με καρκίνο του ρινοφάρυγγα (Principe et al., 2013).

2. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΕΣ (HYALS)

Οι υαλουρονιδάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων που κατά κύριο λόγο αποικοδομούν το υαλουρονικό οξύ (HA) καθώς επίσης και τη θειική χονδροϊτίνη και τη χονδροϊτίνη, με βραδύτερο όμως ρυθμό. Είναι παρούσες σε αρκετές τοξίνες και δηλητήρια, και η δράση τους συμβάλλει στην εξάπλωση τοξινών και δηλητηρίων στο σώμα. Παρόλο που οι Hyals των βακτηρίων, των ασπόνδυλων και των όρχεων έχουν μελετηθεί εκτενώς, η σύνδεση μεταξύ αυτών και καρκίνου καθώς και η λειτουργική σημασία τους σε αυτόν, αναπτύχθηκε ξεκάθαρα τα τελευταία χρόνια (Jacobson et al., 2002; Simpson and Lokeshwar, 2008).

Πρόκειται για ενδογλυκοζιδάσες, καθώς αποικοδομούν τους β-N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμινιδικούς δεσμούς του υαλουρονικού. Έξι γονίδια τους είναι παρόντα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, και αυτά προκύπτουν σε δύο συνδεόμενες τριάδες. Τα γονίδια Hyal 1, 2 και 3 είναι συγκεντρωμένα στο γενετικό τόπο 21.3 του χρωμοσώματος 3p, ενώ οι HYAL4, HYALP1, και PH-20 (κωδικοποιεί την Hyal των όρχεων) βρίσκονται στο γενετικό τόπο 31.3 του χρωμοσώματος 7p.

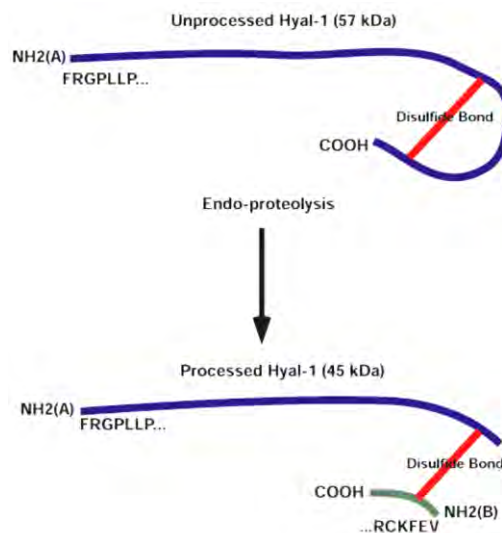
Βάσει του προφίλ ενεργότητάς τους ως προς το pH, οι Hyals χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Οι Hyal 1, 2 και 3 είναι όξινες υαλουρονιδάσες, καθώς είναι ενεργές σε όξινο pH και η PH-20 είναι μια ουδέτερη ενεργή υαλουρονιδάση καθώς έχει ένα προφίλ ενεργότητας σε μια ευρύτερη γκάμα τιμών pH, 3.0-9.0 .

2.1. Ιδιότητες των ανθρώπινων υαλουρονιδασών

Οι υαλουρονιδάσες των θηλαστικών ή αλλιώς 4-γλυκανοϋλοϋδρολάσες του HA (EC 3.2.1.35), δρουν ως ενδο-N-ακετυλοεξαμινιδάσες, υδρολύοντας τον β(1,4) δεσμό μεταξύ της εξοζαμίνης και του ουρονικού οξέος. Το αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η παραγωγή τετρα- και εξασακχαριτών. Επειδή στερούνται απόλυτης εξειδίκευσης, είναι ικανές να διασπούν επίσης χονδροϊτίνη (Ch) και θεική χονδροϊτίνη (ChS), αλλά με πιο αργούς ρυθμούς. Οι υαλουρονιδάσες έχουν επίσης τρανσγλυκοσυλιωτική δραστηριότητα, δημιουργώντας *in vitro* και *in vivo* διασταυρούμενες (crosslinked) αλυσίδες όχι μόνο μεταξύ αλυσίδων HA αλλά και υβριδικών μεταξύ μορίων HA και CS (Shuttleworth TL et al., 2003).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν έξι γνωστά γονίδια για τις υαλουρονιδάσες, όπου όλα έχουν υψηλό βαθμό ομολογίας, είναι μεταγραφικώς ενεργά και η έκφρασή τους εξαρτάται από το είδος του ιστού. Τα γονίδια αυτά περιλαμβάνουν την ανθρώπινη Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal- 4, and PH-20/Sram1, όπως επίσης και το ψευδογονίδιο, Phyal1, το οποίο μεταγράφεται στον άνθρωπο αλλά δεν μεταφράζεται. Οι πρώτες τρεις ανθρώπινες Hyals, η Hyal-1, -2, και -3, είναι στενά συνδεδεμένες στο χρωμόσωμα 3p21.3, μία περιοχή πυκνοπακεταρισμένη με γονίδια, και οι υπόλοιπες είναι τοποθετημένες με παρόμοιο τρόπο στο χρωμόσωμα 7q31.3 (Stern et al., 2003). Οι ανθρώπινες Hyal-1 και Hyal-2 είναι οι δύο κύριες Hyals για την αποικοδόμηση του HA σε σωματικούς ιστούς.

Πιο συγκεκριμένα, η Hyal-1 ή αλλιώς LUCA-1 είναι ένα λυσοσωματικό ένζυμο το οποίο έχει την ικανότητα να διασπά το HA κυρίως σε δισακχαρίτες και τετρασακχαρίτες. Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί γιατί ένα λυσοσωματικό ένζυμο βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος. Εντύπωση επίσης προκαλεί το γεγονός ότι το βέλτιστο pH δράσης του είναι 3.8, τιμή pH αρκετά πιο χαμηλή από το pH των λυσοσωμάτων που είναι 4.5. Ήταν η πρώτη υαλουρονιδάση που απομονώθηκε από σωματικούς ιστούς και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε (Frost, 1997 & Zacchigna, 2004). Υψηλά επίπεδα Hyal-1 έχουν βρεθεί σε παρεγχυματικά όργανα όπως το ήπαρ, οι νεφροί, ο σπλήνας και η καρδιά. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή, με μοριακή μάζα 49 kDa και περίπου 8 kDa μετα- μεταγραφική γλυκοζυλίωση. Η Hyal-1 είναι η μόνη υαλουρονιδάση του πλάσματος, ενώ εμφανίζεται και μια ισομορφή του ενζύμου στα 45 kDa στα ούρα, η οποία προέρχεται από δύο ενδοπρωτεολυτικές διασπάσεις του αρχικού μορίου (57 kDa) και σύνδεση των δύο τμημάτων με δισουλφιδικό δεσμό, αφού έχει απομακρυνθεί πεπτίδιο 99 αμινοξέων.



Εικόνα 32: Σχηματική παράσταση της (ενδο)πρωτεολυτικής διάσπασης της Hyal-1.

Η Hyal-2 ή αλλιώς LUCA-2 είναι προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω GPI-σύνδεσης, ενώ με ενδοπρωτεολυτική διάσπαση μπορεί να βρεθεί στη διαλυτή της μορφή. Η ανθρώπινη Hyal-2 έχει ευρύτερο βέλτιστο pH δράσης 4 και έχει την ικανότητα να διασπά μεγάλου μοριακού μεγέθους HA σε τμήματα 50 διασακχαρικών μονάδων μοριακής μάζας 20 kDa περίπου. Η Hyal-2 θεωρείται λυσοσωματικό ένζυμο και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς πλην του εγκεφάλου των ενηλίκων όπου το γονίδιό της καταστέλλεται με μεθυλίωση αμέσως μετά τη γέννηση (Lerperding, 2001).

Η Hyal-3 (LUCA-3), αν και φαίνεται να εκφράζεται ευρέως, δεν έχει γίνει ακόμη εφικτή η ανίχνευση της δραστηρότητάς της με τις υπάρχουσες μεθόδους. Φαίνεται να εκφράζεται σε συνδυασμό με την Hyal-2 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων (Nicol SB, 2002). Η έκφρασή της επηρεάζεται από κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1 και ο TNF-α (Flannery CR, 1998).

Η Hyal-4 βρίσκεται κι αυτή συνδεδεμένη πάνω στην πλασματική μεμβράνη μέσω GPI-σύνδεσης. Σε αντίθεση με τις Hyal-1 και PH-20, δεν έχει την ικανότητα να διασπά το HA. Είναι μία χονδροϊτινάση με απόλυτη εξειδίκευση στην Ch και ChS, γεγονός που είναι απόλυτα λογικό αν ληφθεί υπόψη ότι τόσο η Hyal-1 όσο και η PH-20 έχουν επίσης την ικανότητα να διασπούν ChS σε περιορισμένο όμως βαθμό.

Η ανθρώπινη PH-20, αλλιώς SPAM1 (sperm adhesion molecule 1) (HPH-20), ανήκει στις GPI-συνδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη υαλουρονιδάσες, από την οποία μπορεί να απελευθερωθεί πρωτεολυτικά και να δώσει τη διαλυτή της μορφή. Η συνδεδεμένη μέσω GPI ισομορφή της PH-20 έχει ουδέτερο βέλτιστο pH δράσης (Oettl M., 2003). Η PH-20 είναι μία διπλολειτουργική και προσκολλητική συνάμα πρωτεΐνη (Hunnicutt G.R., 1996). Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές μοριακής μάζας 65 kDa και 53 kDa μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης σε άγνωστο σημείο του μορίου της (Meyer MF, 1997). Είναι ειδικό ένζυμο των όρχεων και παίζει ρόλο στη γονιμοποίηση του ωαρίου από τα σπερματοζωάρια, διευκολύνοντας τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο (Cherr GN, 2001). Η PH-20 αρχικά θεωρούνταν ιστο-ειδική. Με τη χρήση της PCR

ανάλυσης η PH-20 ανιχνεύεται πλέον στην επιδιδυμίδα (Deng, X., 2000), στο μαστό (Beech, D.J., 2002), στο ουρογεννητικό σύστημα της γυναίκας (Zhang H., 2003), στον προστάτη, στον πλακούντα, καθώς επίσης και σε μεγάλο αριθμό κακοηθειών (Deng X., 2003, Godin D.A., 2000, Madan A.K., 1999). Η παρουσία της PH-20 στο ουρογεννητικό σύστημα της γυναίκας και στο μαστό αποδεικνύει την πολυπλοκότητα του ενζύμου και μάλιστα όλων των ενζύμων της οικογένειας των υαλουρονιδασών.

Οι Hyal-2, Hyal-4 και PH-20, μπορούν να απελευθερωθούν από τη GPI- σύνδεσή τους με την κυτταρική μεμβράνη, μέσω πρωτεολυτικής πορείας. Επομένως και τα τρία αυτά ένζυμα μπορεί να βρεθούν και με τις δύο ισομορφές, τη διαλυτή και τη μεμβρανικά συνδεόμενη. Ωστόσο δεν έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οι διαλυτοί τύποι των Hyal-2 και Hyal-4. Γενικά, επεξεργασία με φωσφολιπάση C μπορεί να απελευθερώσει ένζυμα συνδεδεμένα μέσω GPI σύνδεσης με την κυτταρική μεμβράνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δραστηριότητες των ενζύμων που προκύπτουν με τεχνητό τρόπο διαφέρουν από τις δραστηριότητες εκείνων των ενζύμων που απελευθερώνονται με φυσικό τρόπο. Επίσης μπορεί να υπάρχουν διαφορές στην τιμή του βέλτιστου pH δράσης. Για παράδειγμα, η διαλυτή PH-20 που παράγεται με φυσική διαδικασία έχει βέλτιστο pH δράσης 4, ενώ όπως έχει αναφερθεί, η συνδεδεμένη μέσω GPI ισομορφή έχει ουδέτερο βέλτιστο pH (Oettl M, 2003).

Έχει βρεθεί ένα έβδομο ανθρώπινο γονίδιο με δράση υαλουρονιδάσης (Heckel D., 1998) αλλά η ταυτότητά του ως υαλουρονιδάση παραμένει αμφίβολη. Η ανάλυση της πρωτοταγούς, δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής αυτής της πρωτεΐνης απέφερε διαφορετικά αποτελέσματα από αυτά των ανθρώπινων Hyals-1-4 και HPH-20, προτείνοντας τη διαφορετική λειτουργικότητά του που δεν είναι σύμφωνη με της υαλουρονιδάσης. Επίσης, δεν υπάρχει καμία ομοιότητα αυτής της πρωτεΐνης με την BVHyal όπως και με καμία πρωτεΐνη με γνωστή τρισδιάστατη δομή. Ένα εναλλακτικά ματισμένο mRNA αυτού του γονιδίου παράγει μία πυρηνική πρωτεΐνη με δράση α-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάσης (Comtesse N., 2001). Το ένζυμο αυτό φαίνεται να μοιάζει ανοσολογικά με μία υαλουρονιδάση που υπάρχει στα μηνιγγιώματα.

Οι αλληλουχίες των γνωστών ανθρώπινων υαλουρονιδασών (Hyals-1-4 και HPH-20) είναι σχετικά ομοιόμορφες στο μήκος των αμινοξέων τους, και ποικίλουν από την πιο “κοντή”, την Hyal-1 (435 αμινοξέα), μέχρι την πιο “μακριά”, την HPH-20 (510 αμινοξέα). Η PH-20, η Hyal 4 καθώς και η Hyal-2, ανήκουν στις GPI-συνδεδεμένες (γέφυρα γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης) στην κυτταρική μεμβράνη υαλουρονιδάσες. Η δέσμευση στη GPI-μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω των ακραίων αμινοξέων του C-τελικού άκρου. Η ομολογία των γνωστών ανθρώπινων υαλουρονιδασών (Hyals-1-4 και HPH-20), (Jedrzejas M., 2005, Thompson J.D., 1994) φαίνεται να ποικίλει από 33.1% (ανάμεσα στις Hyal-4 και Hyal-3) μέχρι 41.2% (ανάμεσα στην Hyal-4 και την HPH-20).

Παρόλα αυτά τα ένζυμα διαφέρουν τόσο στην καταλυτική τους δραστηριότητα όσο και στο βέλτιστο pH δράσης τους (Stern R., 2003). Για παράδειγμα, η bPH-20 (61%

ομολογία με την ανθρώπινη) είναι περίπου 400 φορές πιο ενεργή από την hHyal σε όξινες συνθήκες (Vigdorovich V., 2007). Η Hyal-2 ανθρώπινης προέλευσης αποικοδομεί το μεγαλομοριακό HA σε περίπου 20 kDa προϊόν (~50 σακχαριτικές μονάδες), ενώ η Hyal-1 έχει την ικανότητα να το αποικοδομεί σε μικρότερα ολιγομερή, κυρίως σε τετρασακχαρίτες. Η ανθρώπινη Hyal-3 είναι ενεργή σε όξινο pH, όπως και η Hyal-1 (3.8), ενώ η Hyal-2 έχει ευρύτερο βέλτιστο pH (5.6-7.0), (Harada 2007, Frost 1997, Stern 2006). Επίσης, στην περίπτωση της bPH-20 η καμπύλη pH εμφανίζει δύο μέγιστα, στις τιμές 4.5 και 7.5 (Frost G.I. 2000). Ακόμη, ενώ οι αλληλουχίες στα κέντρα αντίδρασης είναι διατηρημένες σε όλη την οικογένεια των υαλουρονιδασών, οι αλληλουχίες στην περιφέρεια του ενεργού κέντρου διαφέρουν. Η hHyal-4 έχει ως κύρια υποστρώματα Ch και Chs (Junker, 2003), που διαφέρουν από το HA στην ανωμερική μορφή του υδροξυλίου του C4 της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης. Να σημειωθεί εδώ ότι η hHyal-4 περιέχει ένα κατάλοιπο Cys αντί για Tyr247, το οποίο είναι το μόνο τμήμα από τις διατηρημένες αλληλουχίες των υαλουρονιδασών. Αυτή η αλλαγή είναι πολύ πιθανό να συνεισφέρει στη διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος της hHyal- 4. Τέτοιου είδους διαφοροποιήσεις είναι υπεύθυνες για τις διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες των ανθρώπινων υαλουρονιδασών.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV: Ομολογία (%) μεταξύ των ανθρώπινων υαλουρονιδασών Hyal-1- 4 και PH-20.

ENZYMΟ	Hyal – 1	Hyal – 2	Hyal – 3	Hyal – 4	HPH – 20
Hyal – 1	100	38.3	38.3	38.5	35.1
Hyal – 2		100	38.0	36.4	34.5
Hyal – 3			100	33.1	33.7
Hyal – 4				100	41.7
HPH – 20					100

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των υαλουρονιδασών σε σωματικούς ιστούς έγιναν κατορθωτά σχετικά πρόσφατα. Ο λόγος είναι ότι υπάρχουν σε πολύ μικρά ποσά έχοντας πολύ υψηλές αλλά ασταθείς δραστηριότητες. Επομένως απαιτείται συνεχής παρουσία αναστολέων πρωτεασών αλλά και απορρυπαντικών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού έτσι ώστε να διατηρήσουν τη δραστηριότητά τους. Αμέσως μετά τον καθαρισμό τους, οι υαλουρονιδάσες είναι απόλυτα σταθερές.

2.2 Δομές και μηχανισμοί δράσης της ανθρώπινης υαλουρονιδάσης

Στις πέντε ανθρώπινες Hyals, η κύρια καταλυτική περιοχή μοιάζει με τη δομή (β/α) (Frost G. I., 2000) βαρελιού της πρόδρομης BVHyal. Το σύνολο των πτυχωτών επιφανειών που συγκροτούν το κεντρικό τμήμα του βαρελιού ποικίλει, ωστόσο, αλλά προσομοιάζει των διαφόρων μορφών της BVHyal. Το ευρύτερο άκρο του βαρελιού

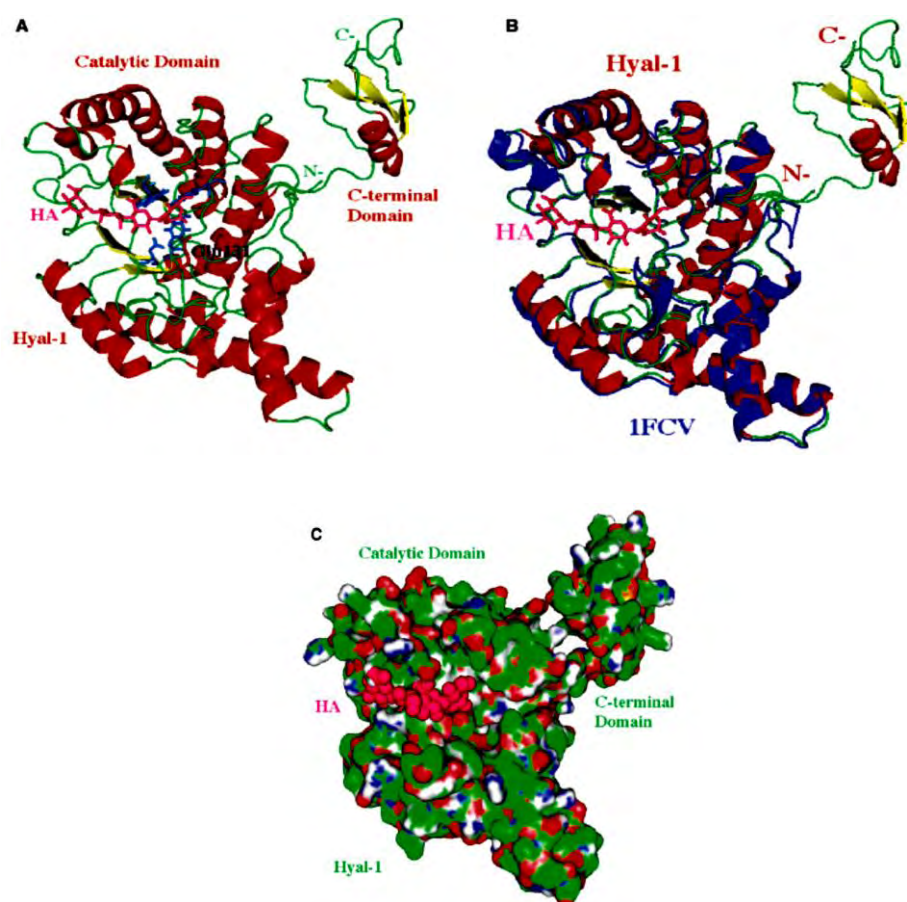
έχει διαμόρφωση που μοιάζει με μεγάλη και επιμηκυσμένη σχισμή. Οι πλευρές του αποτελούνται κυρίως από κατάλοιπα αμινοξέων τα οποία σχηματίζουν θηλιές (μεταξύ πτυχωτών επιφανειών και ελικών του βαρελιού). Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του HA και για κατάλυση, και είναι αρκετά μεγάλη για να δεσμεύσει τουλάχιστον ένα τμήμα οκτασακχαρίτη HA (Junker N., 2003 , Triggs-Raine B., 1999).

Το ακραίο N-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής, που ποικίλει σε μέγεθος από 28 αμινοξέα (για την ανθρώπινη Hyal-1) μέχρι 41 αμινοξέα (για την HPH-20), έχει πάντα ελικοειδή διαμόρφωση. Στην Hyal-1 και Hyal-2 αποτελείται από μία έλικα (είναι οι Hyals με το μικρότερο αριθμό καταλοίπων στο N-τελικό τους άκρο), ενώ στις Hyal-3, Hyal-4 και HPH-20 από δύο έλικες που συνδέονται με μία μικρή θηλιά. Η Hyal-4 και η HPH-20 έχουν μεγαλύτερο αριθμό καταλοίπων στο N-τελικό τους άκρο (εικόνα 5). Και στις πέντε περιπτώσεις, ωστόσο, οι έλικες βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος του βαρελιού, δεν ενσωματώνονται στις πτυχές του και είναι κυρίως συνδεδεμένες στην καταλυτική περιοχή του μορίου: οι αλληλεπιδράσεις με το C-τελικό άκρο είναι ελάχιστες, έως και μηδαμινές (εικόνες 4, 5). Η ομοιότητα στην αλληλουχία αυτής της περιοχής όλων των ανθρώπινων Hyals είναι πολύ μικρή, σε σχέση με το υπόλοιπο τμήμα των Hyals, και έτσι επιτρέπει κάποιες διαφοροποιήσεις στη δομή.

Στο C-τελικό άκρο όλων των ανθρώπινων Hyals, η καταλυτική περιοχή ακολουθείται από μία δεύτερη περιοχή, που δεν υπάρχει στην ομόλογη BVHyal. Αυτό το τμήμα των ανθρώπινων Hyals είναι σημαντικά μικρότερο από την καταλυτική περιοχή, και ποικίλει σε μέγεθος από 68 αμινοξέα (για την Hyal-1), μέχρι 122 αμινοξέα (HPH-20 (εικόνα 5)). Κατά μήκος αυτού του τμήματος, η ομοιότητα στην αλληλουχία, συγκριτικά με το υπόλοιπο μέρος των ενζύμων, είναι ελάχιστη, συμπεριλαμβανομένου και του N-τελικού άκρου. Η δομή αυτής της περιοχής ποικίλει σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες Hyals. Στην Hyal-1 φαίνεται να έχει μία τριπλοελικωμένη αντιπαράλληλη α-πτυχωτή επιφάνεια που πλαισιώνεται από μία έλικα στη μία μεριά και από δομές χαμηλής πολυπλοκότητας στο C-τελικό άκρο (εικόνα 33A, B). Στην Hyal-2, το C-τελικό άκρο συντίθεται από μία ομάδα δύο ελίκων, ενώ στην HPH-20 είναι μία ομάδα οκτώ ελίκων, όπου τρεις από τις έλικες είναι πιο βραχείς. Στην Hyal-3 το C-τελικό άκρο συντίθεται από δύο έλικες, ενώ στην Hyal-4 αποτελείται από τρεις έλικες που πλαισιώνονται στη μία μεριά από μία αντιπαράλληλη, διπλοελικωμένη α-πτυχή (εικόνα 34). Ωστόσο, η C-τελική περιοχή είναι πάντα διαχωρισμένη από το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου μέσω ενός πεπτιδίου (linker peptide). Αυτό το πεπτίδιο είναι αρκετά μακρύ, εύκαμπτο, καθιστώντας την περιοχή ανεξάρτητη από το υπόλοιπο μέρος της πρωτεΐνης (Jedrzejewski et al., 2005).

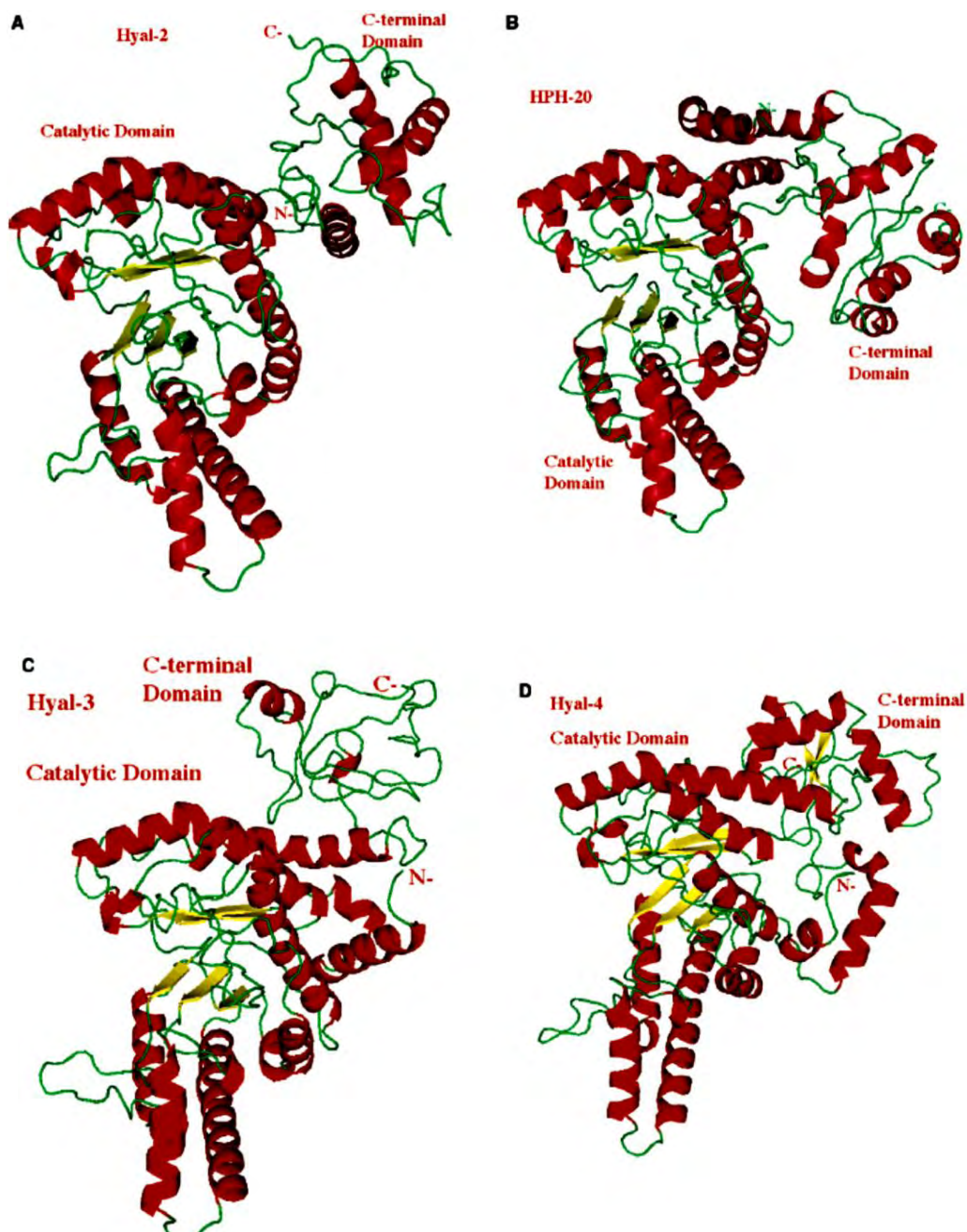
Το ενεργό κέντρο των ανθρώπινων Hyals βρίσκεται εντός της σχισμής δέσμευσης του υποστρώματος που διαπερνά το ευρύτερο άκρο της δομής βαρελιού της καταλυτικής περιοχής. Η σχισμή δεν επεκτείνεται στο C-τελικό άκρο. Ευθυγραμμίζεται από έναν σύνολο θετικά φορτισμένων και υδρόφοβων αμινοξέων.

Με τον τρόπο αυτό, δεσμεύει εξειδικευμένα αρνητικά φορτισμένα και υδρόφοβα υποστρώματα υαλουρονικού, χονδροϊτίνης και θειικής χονδροϊτίνης.



Εικόνα 33: Τρισδιάστατες δομές της ανθρώπινης Hyal-1, στις οποίες διακρίνονται το N-τελικό άκρο του μορίου (A,B), το C-τελικό άκρο του μορίου (A, B και C) καθώς και η διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από το Glu131 και μια ομάδα καταλοίπων αμινοξέων τα οποία φέρουν το νουκλεόφιλο καρβονυλικό για κατάλυση. Αυτά συνήθως είναι τα Asp129, Tyr202, Tyr247, και Trp321. Όλα αυτά τα κατάλοιπα έχουν επίσης αυστηρά συντηρημένες αλληλουχίες (εικόνες 7A, B). Το κατάλοιπο Tyr247 αντικαθίσταται από Cys263 στην ανθρώπινη Hyal-4, ένα ένζυμο που ίσως έχει διαφορετικά υποστρώματα, αφού αποικοδομεί κυρίως Ch και ChS (Jedrzejewski et al., 2005; Markovic-Housley et al., 2000).



Εικόνα 34: Τρισδιάστατες δομές των ανθρώπινων Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4, and HPH- 20.

Το Glu131 δρα ως οξύ. Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην τοποθέτηση του υποστρώματος είναι αρμόδια για τον ακριβή προσανατολισμό του καρβονυλίου της ομάδας του ακεταμιδίου του HA, το οποίο δρα ως νουκλεόφιλο σε αυτή την περίπτωση, αντί για το δεύτερο όξινο κατάλοιπο. Σε αυτή την περίπτωση, δε σχηματίζεται κανένα ενδιάμεσο ενζύμου- υποστρώματος.

2.3 Καταβολικό σχήμα του HA

Το υαλουρονικό έχει έναν εκπληκτικά γρήγορο ρυθμό ανακύκλησης στα σπονδυλωτά λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο του όγκο. Στον άνθρωπο το ένα τρίτο της συνολικής ποσότητας του HA ημερησίως είναι αποτέλεσμα της δράσης των καταβολικών του ενζύμων μέσω τριών καταβολικών μονοπατιών. Τα επίπεδα ανακύκλησης του HA αυξάνονται ταχέως μετά από οξύ στρες, σε κατάσταση σοκ, στη σηψαιμία, σε εκτεταμένα εγκαύματα και στην περίπτωση σήψης. Αυτή η αύξηση στα επίπεδα του HA πιθανόν να αποτελεί μηχανισμό επιβίωσης. Από την άλλη παρατηρείται εξαιρετικά άφθονη εναπόθεση και ανακύκληση του HA σε ιστούς που εμφανίζουν κακοήθεια. Το ποσοστό των θραυσμάτων HA μικρού μοριακού βάρους είναι μεγαλύτερο σε καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι δυο κύριες υαλουρονιδάσες οι οποίες διασπούν το HA σταδιακά σε όλο και μικρότερα θραύσματα είναι η Hyal-1 και η Hyal-2. Το πολυμερές αποικοδομείται σε μια σειρά σταδίων κατά τα οποία δημιουργούνται σταδιακά μικρότερα θραύσματα.

Στάδιο 1ο

Το πολυμερές με δράση τόσο της Hyal-2 όσο και του υποδοχέα του HA, CD44 δεσμεύεται στην επιφάνεια του κυττάρου.

Στάδιο 2ο

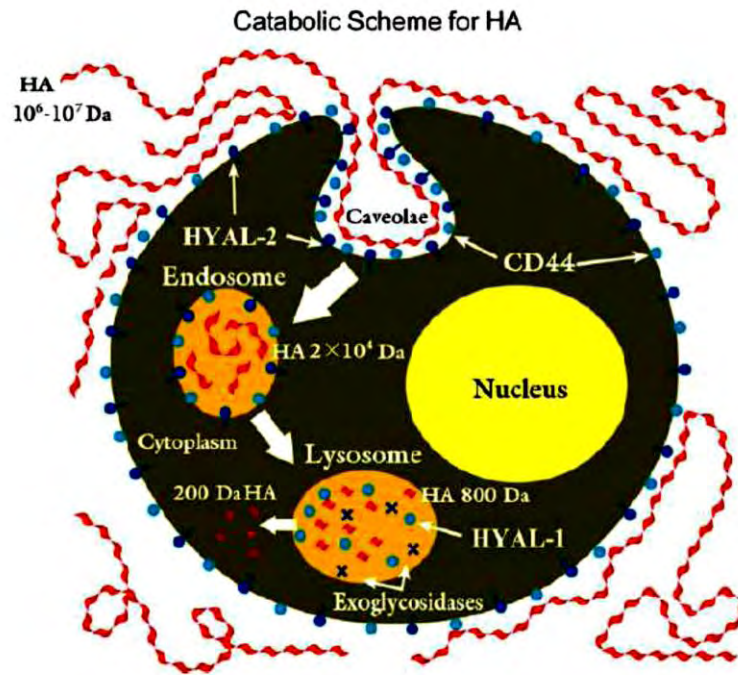
Το δεσμευμένο πολυμερές οδηγείται σε εγκολπώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης οι οποίες είναι πλούσιες σε λιπιδικές δομές. Μέσα στις εγκολπώσεις το HA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα, μέσω της συνεργασίας μιας Na^+-H^+ ιονοανταλλακτικής πρωτεΐνης 1 και αφού έχει αποικοδομηθεί από την Hyal-2 σε χαμηλού μοριακού βάρους θραύσματα μήκους 50-100 σακχάρων. Εναλλακτική πορεία των θραυσμάτων είναι η διάχυση μέσω της λέμφου.

Στάδιο 3ο

Τα θραύσματα παραλαμβάνονται από τα ενδοσώματα και τελικά από τα λυσοσώματα. Στο σημείο αυτό τα θραύσματα θα υποστούν περαιτέρω θραύση, αρχικά από την όξινη Hyal-1, η οποία θα παράγει κυρίως τετρασακχαρίτες και στη συνέχεια από δύο επίσης όξινα ένζυμα, τις β-εξωγλυκοζιδάσες β-γλυκουρονιδάση και β-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάση κατακερματίζονται σε απλά σάκχαρα.

Στάδιο 4ο

Τα σάκχαρα εξέρχονται από τα λυσοσώματα στο κυτταρόπλασμα, όπου λαμβάνουν μέρος σε άλλες μεταβολικές πορείες.



Εικόνα 35: Καταβολική οδός του HA

2.4 Γονιδιακή έκφραση υαλουρονιδασών και καρκίνος

Το μικρότερο γονίδιο ανάμεσα στις έξι ανθρώπινες αλληλουχίες είναι το *hyal-1* (3.7 kb) και το μεγαλύτερο γονίδιο είναι το *hyal-4* (πάνω από 32 kb), που αντιστοιχεί περίπου σε 10 φορές ποικιλότητα (ποικιλομορφία) σε γονιδιακό μέγεθος. Η ανθρώπινη *Hyal-1* φαίνεται να διατηρεί το εσώνιο 1, το οποίο βρίσκεται μέσα στο εξώνιο 1, στο mRNA του, με αποτέλεσμα να παράγονται δύο είδη mRNA, μόνο ένα από τα οποία μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Αυτό δεν παρατηρείται σε καμία από τις αλληλουχίες των άλλων υαλουρονιδασών. Το mRNA με το διατηρημένο εσώνιο δε μπορεί να μεταφραστεί, λόγω του μεγάλου αριθμού κωδικίων λήξης που περιέχει (Arming et al., 1997; Jedrzejewski et al., 2005; Chivian et al., 2003).

Οι περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υαλουρονιδάσες και στα δύο χρωμοσώματα, έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανές περιοχές ογκοκατασταλτικών γονιδίων (TSG). Το γονίδιο *hyal-1* έχει χαρτογραφηθεί πράγματι μέσα σε μία περιοχή ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπως προσδιορίστηκε έπειτα από ομοζυγωτικές ελλείψεις και μελέτες ογκοκατασταλτικής δραστηριότητας (Wei et al., 1996). Φαίνεται να είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ειδικά για καρκίνους που σχετίζονται με το κάπνισμα. Απενεργοποιείται στους περισσότερους καρκίνους των πνευμόνων είτε με απώλεια της ετεροζυγωτίας είτε με εξάλειψη της ομοζυγωτίας, σε επίπεδο DNA. Επίσης, η *hyal-1* απενεργοποιείται σε πολλά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου που σχετίζονται με το κάπνισμα, μέσω έκτροπου ματίσματος του mRNA, έτσι ώστε μόνο η μη μεταφραζόμενη μορφή να μεταγραφεί (Arming et al., 1997). Επομένως, φαίνεται πως τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να απενεργοποιηθούν όχι μόνο σε

επίπεδο DNA αλλά επίσης περιστασιακά και σε επίπεδο RNA. Δεν είναι γνωστό γιατί είναι το μόνο γονίδιο για την ανθρώπινη Hyal-1 (ανάμεσα στις έξι αλληλουχίες) το οποίο έχει διατηρημένο εσώνιο που επιτρέπει το εναλλακτικό μάτισμα, με μεταγραφή πολλαπλών ειδών mRNA εκ των οποίων μόνο ένα καταλήγει σε τελικό προϊόν.

Πρόσφατες αναλύσεις υποδεικνύουν ότι οι Hyals μπορούν επίσης να δράσουν και ως ογκογονίδια. Η Hyal-1 των ανθρώπων δρα ως ογκογονίδιο σε πολλούς καρκίνους του προστάτη και του ουροποιητικού συστήματος, ενώ και η Hyal-2 μπορεί επίσης να δράσει ως ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (TSG). Η Hyal-2 υπερεκφράζεται και επιταχύνει την καρκινογένεση σε πειραματικά μοντέλα μυών (Novak et al., 1999). Επίσης, η Hyal-2 λειτουργεί και ως επιφανειακός κυτταρικός υποδοχέας για ορισμένους ρετροϊούς, οι πρωτεΐνες του ελύτρου των οποίων δημιουργούν ογκογενετικό μετασχηματισμό των κυττάρων (Rai et al., 2001). Αντιθέτως, σε καλλιέργειες L929 ινοβλαστών, η Hyal-2 φαίνεται να επιταχύνει την αποπτωτική διαδικασία (Chang et al., 2002).

Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η έλλειψη υαλουρονιδασών αποτελεί ένα καλό καρκινικό δείκτη, αλλά τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντιφατικά, εφόσον σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνων, πχ των ωοθηκών, του προστάτη, του αναπνευστικού, αναφέρονται αυξημένα επίπεδα στην έκφρασή τους ή ακόμη και του HA. Αυτό ίσως αντανάκλα σε ολική αύξηση στην αναδιοργάνωση του HA, όπου εμφανίζεται αύξηση παράλληλα και της σύνθεσης και της αποδόμησης (Lockeshwar et al., 2001).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ V: Πρωτόκολλο ασθενών που αντιστοιχούν στους ιστούς που χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης των υαλουρονιδασών και των ισομορφών τους.

A/A	Αρ. Ασθενούς	Φύλο	Ηλικία	Στάδιο	Βιοψία	Ανατομική Θέση	Ακτινοθεραπεία
1	152 Φ-Π	Θ	80	T3N0M0 (Στάδιο III)	150	ΥΠΕΡΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	Πριν από 10 χρόνια
2	150 B	-»-	-»-	T3N0M0	+	-»-	-»-
3	151 B	A	75	T2N2AM0 (Στάδιο IVA)	+	ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΑΣ	
4	155 Φ-Π	A	78	T4N2cM0 (Στάδιο IV)	-	Ca ΥΠΟΦΑΡΥΓΓΑ	Πριν από 6 μήνες
5	158Φ-Π	A	86	T4N0M0 (Στάδιο IV)		ΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	Προεγχειρητική RT
6	159 B	A	87	T3N0M0 (Στάδιο III)	-	ΥΠΕΡΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	
7	162 Φ-Π	A	77	T4N0M0 (Στάδιο IV)	-	ΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	Προεγχειρητική ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.
8	163 Φ-Π	A	66	T4N0M0 (Στάδιο IV)	-	ΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	Προεγχειρητική ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.
9	169 Φ-Π	A	61	T4N3M0 (Στάδιο IVA)	-	ΥΠΕΡΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	Προεγχειρητική ακτινοθεραπεία
10	171 Φ-Π	A	63	T3N0M0 (Στάδιο III)	-	ΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	Προεγχειρητική ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.
11	174-1 ^A	A	63	T2N1M0 (Στάδιο III)	+	ΥΠΕΡΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	ΟΥΔΕΝ
12	175-1B	A	64	T1α - Στάδιο I	+	Προκαρκινωματώδης βλάβη ή γλωττιδικό	ΟΥΔΕΝ
13	176-2A (μόνο Π)	A	79	T3N0M0 (Στάδιο III)	-	ΥΠΕΡΓΛΩΤΤΙΔΙΚΟ	ΟΥΔΕΝ

1.1 Απομόνωση RNA από ιστό λάρυγγα

Η απομόνωση του ολικού RNA από ιστούς παχέος εντέρου πραγματοποιήθηκε με την χρήση του NucleoSpin® RNA της εταιρείας MACHEREY - NAGEL, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τους κατασκευαστές.

Η διαδικασία απομόνωσης RNA από ιστό λάρυγγα περιλαμβάνει ουσιαστικά δύο στάδια: 1) ομογενοποίηση και 2) εκχύλιση RNA.

- 1) Αρχικά παραλαμβάνεται και ζυγίζεται ένα τμήμα ιστού, μέχρι 30mg και στη συνέχεια τεμαχίζεται σε πολύ μικρά κομμάτια με νυστέρι. Ο τεμαχισμένος ιστός τοποθετείται σε ιγδίο και ψύχεται με υγρό άζωτο. Ο ψυγμένος ιστός θρυμματίζεται μέχρι να πάρει τη μορφή σκόνης. Στη συνέχεια η σκόνη του ιστού τοποθετείται σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα με τη βοήθεια υγρού αζώτου και προστίθενται 3,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης και 350μl buffer RA1. Η ομογενοποίηση του διαλύματος γίνεται για λίγα δευτερόλεπτα σε ομογενοποιητή KINAMETICA Polytron. Ακολουθεί μεταφορά του ομογενοποιημένου ιστού σε RNase Eppendorf του 1.5ml και φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 1min.
- 2) Το υπερκείμενο κάθε φορά αποχύνεται σε ειδικό (μωβ) φίλτρο (NucleoSpin Filter, purple), το οποίο είναι τοποθετημένο σε συλλεκτικό σωλήνα των 2ml και φυγοκεντρείται στις 11000 rpm για 1min. Ακολουθεί απομάκρυνση του φίλτρου, προσθήκη 350μl 70% αιθανόλης στο διήθημα και ανάδευση. Κάθε δείγμα υφίσταται νέα διήθηση σε φίλτρο (NucleoSpin RNA column, light blue), το οποίο τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 2ml και φυγοκεντρείται στις 11000 rpm για 30sec. Μετά τη φυγοκέντρηση το διήθημα απορρίπτεται και φυλάσσεται το ίζημα που παραμένει στη μεμβράνη του φίλτρου. Η αφαλάτωση της μεμβράνης αυτής γίνεται κάθε φορά με 350μl MDB (Membrane Desalting Buffer) και ξηραίνεται με φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1min. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πέψη του DNA με 15λεπτη επώαση του φίλτρου με 95μl DNase reaction mixture. Ακολουθούν τρεις πλύσεις της μεμβράνης. Η πρώτη πλύση γίνεται με 200μl ρυθμιστικού RAW2, η δεύτερη με 600μl ρυθμιστικού RA3 και η τρίτη με 250μl RA3. Στις δύο πρώτες γίνεται φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30sec και στην τελευταία στις 11000 rpm για 2min. Τέλος, το φίλτρο τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα του 1,5ml, προστίθενται 30μl H₂O (καθαρό από RNάση, RNase free water) για την έκλυση καθαρού RNA, με φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1min. Το έκλυσμα του καθαρού RNA από κάθε δείγμα, φωτομετρείται στα 260nm και 280nm και φυλάσσεται στους -80°C.

1.2 Κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR)

Η πορεία της RT-PCR έγινε σε δύο βήματα (2 step RT-PCR) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του KaraTaq 2x Ready Mix DNA polymerase kit της KAPABIOSYSTEMS που προτείνονται από τους προμηθευτές των αντιδραστηρίων Takara και Karabiosystems.

Ως πρώτο βήμα θεωρείται η παρασκευή cDNA. Το δεύτερο βήμα της RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται για την PCR. Αφού ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 2 min στους 94°C

προκειμένου να γίνει η αρχική μετουσίωση των κλώνων του cDNA, για 30 sec στους 94°C για τη μετουσίωση των κλώνων του cDNA, οπότε οι δύο κλώνοι αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλο, 30 sec στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του εκάστοτε εκκινητή ούτως ώστε να προσδεθούν με απόλυτη ειδικότητα με τους κλώνους DNA-στόχους και 1 min στους 72°C για την επέκταση των κλώνων. Στο σημείο αυτό ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου DNA με την προσθήκη νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση στους εκκινητές. Μετά το τέλος της επιμήκυνσης, η αντίδραση ξεκινά πάλι από το στάδιο 1, όπου μετουσιώνονται τα μόρια DNA που δημιουργήθηκαν και ακολούθως συντίθενται νέα μόρια. Στη συνέχεια γίνεται επανάληψη των βημάτων για 34 κύκλους. Με κάθε νέο κύκλο έχουμε διπλασιασμό των μορίων DNA που συντίθενται, επομένως στο τέλος το αρχικό cDNA-στόχος έχει ενισχυθεί σημαντικά. Το τελικό βήμα περιλαμβάνει τη δεκάλεπτη δράση της DNA πολυμεράσης στους 72 °C ώστε να αντιγράψει και τα τελευταία νουκλεοτίδια. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα δείγματα φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20 °C.

Ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση κυμαινόταν ανάλογα με τις απαιτήσεις των εκκινητών (στην πλειοψηφία αυτών, καταλήξαμε στους 40 κύκλους). Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από cDNA, 10 μL 2x Ready Mix με Mg^{2+} (η παρουσία των ιόντων Mg^{2+} είναι σημαντική για τη δράση της DNA πολυμεράσης) το οποίο περιέχει και το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, 0,8 μL forward primer (10μM), 0,8 μL reverse primer (10μM) και νερό ελεύθερο νουκλεασών ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 20 μL.

ΠΙΝΑΚΑΣ VI: Εκκινητές και συνθήκες RT-PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (T annealing) °C	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ (bp)
HYAL-1 (WT)	F: 5'-CCACGGCCCTGACATGACAA-3'	59°C	736bp
	R: 5'-CGCACTCTCCCCAGGCTGTG-3'		
HYAL-1 (WT)	F: 5'-AGCTGGGAAAATACAAGAACC-3'	60°C	208bp
	R: 5'-TGAGCTGGATGGAGAACTGG-3'		
HYAL-1 (WT)	F: 5'-GATGTCAGTGTCTTCGATGTGGTA-3'	60°C	79bp
	R: 5'-GGGAGCTATAGAAAATTGTCATGTCA-3'		
HYAL-1 V1	F: 5'-ACCACTTTCTGCCCCTGGAA-3'	53 °C	121 bp
	R: 5'-CCGGAGCACAGGGCTTGACT-3'		
HYAL-1 V2	F: 5'-GGCCCTTCAGCCCCAAGGA-3'	53 °C	139 bp
	R: 5'-CGTGAGTGCTGCCGGTAAAT-3'		
HYAL-1 V3	F: 5'-CTATGGCTTCCCTGACTC-3'	51 °C	155 bp
	R: 5'-CCGGAGCACAGGGCTTGACT-3'		
HYAL-1 V4/V5	F: 5'-GGCCCTTCAGCCCCAAGGA-3'	55 °C	361,211 bp
	R: 5'-CCGGAGCACAGGGCTTGACT-3'		
HYAL-2 (WT)	F: 5'-GGCACAATATGAGTTTGAGTTCGC-3'	54 °C	510 bp
	R: 5'-TTGAGGTACTGGCAGGTCTCCG-3'		
HYAL-3 WT/V1	F: 5'-CCGAGCTTATCAGGCAGCCTCTT-3'	56 °C	512, 422 bp
	R: 5'-CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA-3'		
HYAL-3 V2/V3	F: 5'-CAACGTTGTCGGACCGAGGC-3'	56 °C	286, 193 bp
	R: 5'-CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA-3'		
PH-20	F: 5'-GAGTTGTAAGGAGAAAGCTGAT-3'	56 °C	194 bp
	R: 5'-TGGCTACAGAAGAAATGATAAGAAACA-3'		

1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της RT-PCR αντίδρασης πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος του προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5M Tris-βορικό νάτριο-EDTA (TBE). Αρχικά, το αιώρημα της αγαρόζης τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων προς διαλυτοποίηση για περίπου 3 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτό, με ελαφρά ανακίνηση, χρωστική GelRed, η οποία είναι φθορίζουσα και συμπλοκοποιείται στη διπλή έλικα του DNA (5μl χρωστικής / 50mL TBE). Η χρωστική είναι υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου και καθιστά ορατό το DNA στο υπεριώδες. Εφόσον το παραπάνω διάλυμα τοποθετηθεί στο ειδικό δοχείο και πολυμεριστεί, τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Στα προϊόντα της RT-PCR των προς ανάλυση mRNA προστίθεται 1μl χρωστικής (μπλε της βρωμοφαινόλης), ώστε να είναι ορατή η μετακίνηση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρησή τους, ενώ πάντα χρησιμοποιείται DNA γνωστού μεγέθους βάσεων (DNA ladder) για μέτρηση του μεγέθους του DNA προϊόντος. Ακολούθως, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 100V για περίπου 1 ώρα.

Η ανίχνευση των προϊόντων της RT-PCR γίνεται με τοποθέτηση των πηκτωμάτων σε λάμπα UV και η φωτογράφησή τους πραγματοποιείται με κάμερα CCD. Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός του λόγου έντασης της ζώνης του προϊόντος για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε προς την ένταση ζώνης του γονιδίου αναφοράς (GAPDH - αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος Image j.

1.4 Ζυμογράφημα για την ανίχνευση υαλουρονιδασών

Η ίδια διαδικασία με το ζυμογράφημα ζελατινασών (MMPs) ακολουθήθηκε και για τα δείγματα προς ανάλυση των υαλουρονιδασών. Σε αυτά ανιχνεύθηκε ότι καλύτερη συγκέντρωση ήταν η 1:40 για τον ορό πρότυπο και καμία αραίωση για τη σίελο.

Σε διαφορετικό erpendorf τοποθετούνται 5l αραιωμένου -ή μη- πλέον δείγματος και 5l sample buffer. Ακολουθεί 3-λεπτος βρασμός των δειγμάτων, φυγοκέντρωση ώστε να συγκεντρωθεί όλο το δείγμα στο κάτω μέρος, και μόλις τα δείγματα φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, εφαρμογή τους στο gel.

Ο κύριος κορμός του πειράματος παραμένει ίδιος με αυτόν του ζελατινογραφήματος.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτάματα επάζονται σε διάλυμα 3% Triton X-100, για 1h υπό ανάδευση. Έπειτα, πραγματοποιούνται δύο πεντάλεπτες πλύσεις με κατάλληλο buffer επώασης υαλουρονιδασών (0.15M NaCl - 0.1M CH₃COOH, ρυθμισμένο σε pH 3,7) και ακολουθεί επώαση των πηκμάτων στο ίδιο διάλυμα για 16h στους 37°C.

Κατόπιν, αφού γίνουν πλύσεις με απεσταγμένο νερό, πραγματοποιείται βαφή με Alcian Blue για 1h υπό ανάδευση και έκπλυση για 2 έως και 3 ώρες με 7% CH₃COOH

με ανανέωση του διαλύματος ανά 45min. Προαιρετικά πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με destain buffer ώστε να έρθουν τα πηγμάτα πιο κοντά στο περιβάλλον της χρωστικής Coomassie που θα χρησιμοποιηθεί, αν και αυτό το βήμα μπορεί να παραληφθεί. Τέλος, ακολουθεί βαφή σε Coomassie Blue R-250 υπό ανάδευση για 30min και έκπλυση σε διάλυμα αποχρωματισμού για 15 έως 20min.

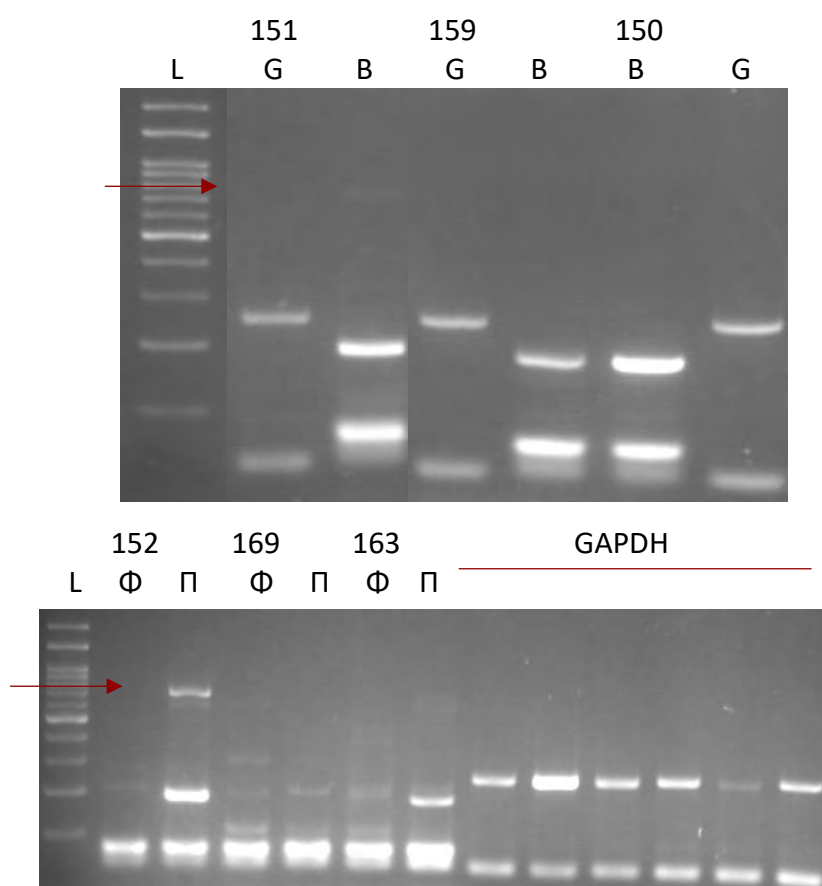
Τέλος, τα πηγμάτα υποβάλλονται σε ψηφιακή σάρωση και φυλάσσονται σε διάλυμα 7% CH_3COOH . Οι ψηφιακές εικόνες αναλύονται με πρόγραμμα Image j και μελετώνται στατιστικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

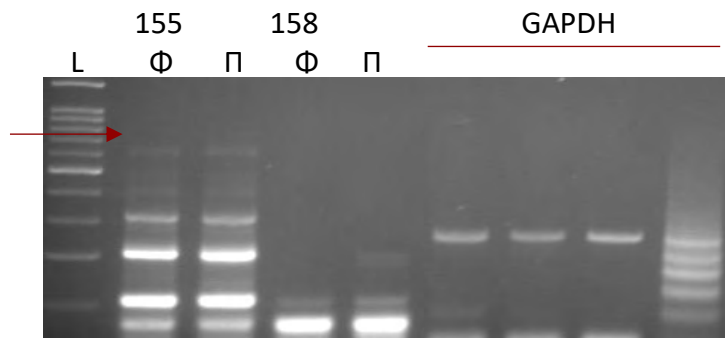
1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL-1

1.1 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 736bp

Η Hyal-1 αποτελεί την κύρια ογκοπροερχόμενη υαλουρονιδάση (HAse) που εκφράζεται σε καρκίνους (ουροδόχου κύστης και προστάτη), ενώ και στον λαρυγγικό καρκίνο είναι η κύρια HAse που εκφράζεται. Αφού πραγματοποιήθηκε η ανάλυση σε δείγματα ιστού έξι ασθενών με ζεύγος εκκινητών που απέδιδε 736bp προϊόν, παρατηρήθηκαν ποικίλες ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε διαφορετικό αριθμό bp, χαμηλότερο, και μόνο στην περίπτωση ενός ασθενούς ανιχνεύθηκε το σωστό μέγεθος στον παθολογικό ιστό, και σε μια βιοψία ίχνη (Εικόνα 36). Αυτό επέφερε έναν προβληματισμό κι έτσι αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί επόμενο πείραμα στους 40 κύκλους (Εικόνα 37).



Εικόνα 36: Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 WT (736bp), πείραμα στους 35 κύκλους. Όπου Φ= φυσιολογικός ιστός, Π= παθολογικός ιστός, B= βιοψία, G= αντίστοιχη GAPDH



Εικόνα 37: Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-1 WT* (736bp), πείραμα στους 40 κύκλους.

Ακόμα και στην περίπτωση των 40 κύκλων, εξακολούθησε η ανίχνευση μη αναμενόμενων ζωνών και έτσι καταφύγαμε στην αναζήτηση της αλληλουχίας του mRNA ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια αποσιώπηση που προκαλούσε το πρόβλημα αυτό.

```

ATGGCAGCCACCTGCTTCCCATCTGCGCCCTCTTCCTGACCTTACTCGATATGGCCCAAGGCT
TTAGGGGCCCCCTTGCTACCCAACCGGCCCTTACCACCGTCTGGAATGCAAACACCCAGTGG
TGCCTGGAGAGGCACGGTGTGGACGTGGATGTCAGTGTCTTCGATGTGGTAGCCAACCCAG
GGCAGACCTTCCGCGGCCCTGACATGACAATTTCTATAGCTCCCAGCTGGGCACCTACCCCT
ACTACACGCCCCTGAGGAGCCTGTGTTTGGTGGTCTGCCCCAGAATGCCAGCCTGATTGCC
CACCTGGCCCGCACATTCCAGGACATCCTGGCTGCCATACCTGCTCCTGACTTCTCAGGGCTG
GCAGTCATCGACTGGGAGGCATGGCGCCACGCTGGGCCTTCAACTGGGACACCAAGGACA
TTTACCGGCAGCGCTCACGGGCACTGGTACAGGCACAGCACCTGATTGGCCAGCTCCTCAG
GTGGAGGCAGTAGCCCAGGACCAGTTCCAGGGAGCTGCACGGGCCTGGATGGCAGGCACC
CTCCAGCTGGGGCGGGCACTGCGTCCTCGCGGCCTCTGGGGCTTCTATGGCTTCCCTGACTG
CTACAACTATGACTTTCTAAGCCCCAACTACACCGGCCAGTGCCCATCAGGCATCCGTGCCCA
AAATGACCAGCTAGGGTGGCTGTGGGGCCAGAGCCGTGCCCTCTATCCCAGCATCTACATGC
CCGCAGTGCTGGAGGGCACAGGGAAGTCACAGATGTATGTGCAACACCGTGTGGCCGAGGC
ATTCCGTGTGGCTGTGGCTGCTGGTGACCCCAATCTGCCGGTGCTGCCCTATGTCCAGATCTT
CTATGACACGACAAACCACTTTCTGCCCTGGATGAGCTGGAGCACAGCCTGGGGGAGAGT
GCGGCCAGGGGGCAGCTGGAGTGGTGTCTGGGTGAGCTGGGAAAATACAAGAACCAAG
GAATCATGTCAGGCCATCAAGGAGTATATGGACACTACACTGGGGCCCTTCATCCTGAACGTG
ACCAGTGGGGCCCTTCTCTGCAGTCAAGCCCTGTGCTCCGGCCATGGCCGCTGTGTCCGCCG
CACCAGCCACCCCAAAGCCCTCCTCCTTAACCCTGCCAGTTTCTCCATCCAGCTCACGCCT
GGTGGTGGGGCCCTGAGCCTGCGGGGTGCCCTCTCACTTGAAGATCAGGCACAGATGGCTG
TGGAGTTCAAATGTCGATGCTACCCTGGCTGGCAGGCACCGTGGTGTGAGCGGAAGAGCAT
GTGGTGA

```

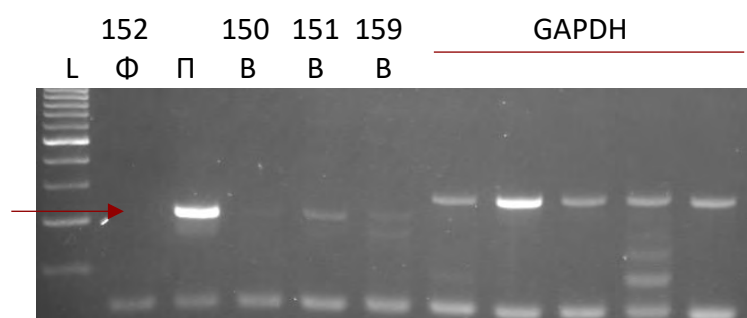
Εικόνα 38: Το mRNA της *HYAL-1 WT*, όπου τονίζεται η μεταβλητή περιοχή αυτού.

Σε διάφορες αλληλουχίες που μελετήθηκαν, υπήρχε το σημειωμένο με κόκκινο χρώμα τμήμα, το οποίο αναφέρεται ως ένα τμήμα που δύναται να υπάρχει ολόκληρο, τμήμα αυτού ή και να απουσιάζει πλήρως από το συνολικό mRNA. Διερευνήθηκε ένα ακόμη ζεύγος εκκινητών που είχε επιλεγεί από παλαιότερη μελέτη στο εργαστήριο, και κατόπιν, συνδυασμός forward του πρώτου και reverse του δεύτερου που έδωσαν προϊόντα 208bp και 977bp αντίστοιχα.

```
ATGGCAGCCACCTGCTTCCCATCTGCGCCCTCTTCCTGACCTTACTCGATATGGCCCAAGGCTT
TAGGGGCCCCTTGCTACCCAACCGGCCCTTACCACCGTCTGGAATGCAAACACCCAGTGGTG
CCTGGAGAGGCACGGTGTGGACGTGGATGTCAGTGTCTTCGATGTGGTAGCCAACCCAGGGC
AGACCTTCCGCGGCCCTGACATGACAAATTTCTATAGCTCCCAGCTGGGCACCTACCCCTACTAC
ACGCCCCTGAGGAGCCTGTGTTTGGTGGTCTGCCCCAGAATGCCAGCCTGATTGCCACCTG
GCCCCGACATTCCAGGACATCCTGGCTGCCATACCTGCTCCTGACTTCTCAGGGCTGGCAGTCA
TCGACTGGGAGGCATGGCGCCACGCTGGGCCTTCAACTGGGACACCAAGGACATTTACCGG
CAGCGCTCACGGGCACTGGTACAGGCACAGCACCTGATTGGCCAGCTCCTCAGGTGGAGGC
AGTAGCCCAGGACCAGTTCAGGGAGCTGCACGGGCCTGGATGGCAGGCACCTCCAGCTG
GGGCGGGCACTGCGTCCTCGCGGCCTCTGGGGCTTCTATGGCTTCCCTGACTGCTACAACAT
GACTTTCTAAGCCCCAACTACACCGGCCAGTGCCCATCAGGCATCCGTGCCCAAAATGACCAG
CTAGGGTGGCTGTGGGGCCAGAGCCGTGCCCTCTATCCCAGCATCTACATGCCCGCAGTGCTG
GAGGGCACAGGGAAGTCACAGATGTATGTGCAACACCGTGTGGCCGAGGCATTCCGTGTGGC
TGTGGCTGCTGGTGACCCCAATCTGCCGGTGCTGCCCTATGTCCAGATCTTCTATGACACGACA
AACCACCTTCTGCCCTGGATGAGCTGGAGCACAGCCTGGGGGAGAGTGCGGCCAGGGGG
CAGCTGGAGTGGTGCTCTGGGTGAGCTGGGAAAATACAAGAACCAGGAATCATGTCAGGCC
ATCAAGGAGTATATGGACACTACACTGGGGCCCTTCATCCTGAACGTGACCAGTGGGGCCCTT
CTCTGCAGTCAAGCCCTGTGCTCCGGCCATGGCCGCTGTGTCCGCCGCACCAGCCACCCCAA
GCCCTCCTCCTCTTAACCTGCCAGTTTCTCCATCCAGCTCACGCCTGGTGGTGGGCCCTGA
GCCTGCGGGGTGCCCTCTCACTTGAAGATCAGGCACAGATGGCTGTGGAGTTCAAATGTCGAT
GCTACCCTGGCTGGCAGGCACCGTGGTGTGAGCGGAAGAGCATGTGGTGA
```

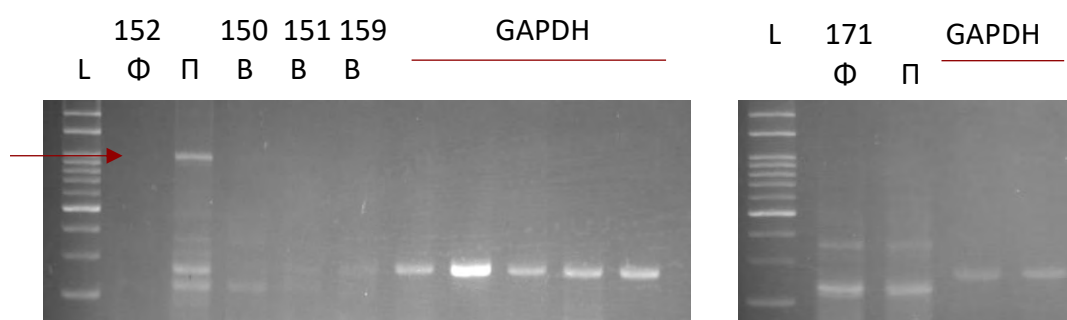
Εικόνα 39: Το mRNA της HYAL-1 WT, όπου τονίζεται η μεταβλητή περιοχή και η θέση των μελετηθέντων εκκινητών.

1.2 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 208bp



Εικόνα 40: Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-1* WT(208bp), πείραμα στους 40 κύκλους

1.3 Γονιδιακή έκφραση της Hyal-1 με εκκινητές που δίνουν προϊόν 977bp



Εικόνα 41: Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-1* WT (977bp), πείραμα στους 40 κύκλους.

Καθώς για κάθε ζεύγος εκκινητών που κυκλοφορεί στο εμπόριο, όπως κι αυτά που προϋπήρχαν στο εργαστήριο ο ένας εκ των δύο εκκινητών ενέπιπτε εντός του μεταβλητού τμήματος, τα αποτελέσματα δεν μπορούσαν με σιγουριά να θεωρηθούν αξιόπιστα. Μετά από αναζήτηση, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ένα ζεύγος εκκινητών για qPCR, το οποίο δεν περιείχε το μεταβλητό τμήμα, ούτε όμως και ενέπιπτε πάνω σε αυτό.

```

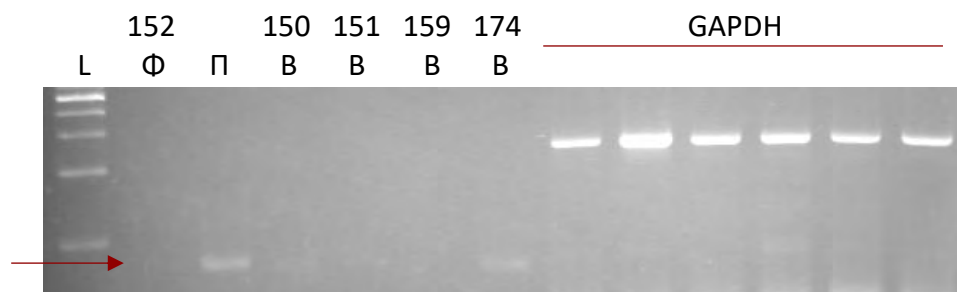
ATGGCAGCCACCTGCTTCCCATCTGCGCCCTCTTCCTGACCTTACTCGATATGGCCCAAGGCTTTAG
GGGCCCCTTGCTACCCAACCGGCCCTTCACCACCGTCTGGAATGCAAACACCCAGTGGTGCCTGGA
GAGGCACGGTGTGGACGTGGATGTCAAGTGTCTTCGATGTGGTAAGCCAACCCAGGGCAGACCTTCCG
CGGCCC TGACATGACAATTTTCTATAGCTCCCAGCTGGGCACCTACCCCTACTACACGCCCACTGGGG
AGCCTGTGTTTGGTGGTCTGCCCCAGAATGCCAGCCTGATTGCCACCTGGCCCGCACATTCCAGGA
CATCCTGGCTGCCATACCTGCTCCTGACTTCTCAGGGCTGGCAGTCATCGACTGGGAGGCATGGCGC
CCACGCTGGGCCTTCAACTGGGACACCAAGGACATTTACCGGCAGCGCTCACGGGCACTGGTACAG
GCACAGCACCCCTGATTGGCCAGCTCCTCAGGTGGAGGCAGTAGCCCAGGACCAGTTCCAGGGAGC
TGCACGGGCCTGGATGGCAGGCACCCCTCCAGCTGGGGCGGGCACTGCGTCCTCGCGGCCTCTGGG
GCTTCTATGGCTTCCCTGACTGCTACAATATGACTTTCTAAGCCCCAACTACACCGGCCAGTGCCCA
TCAGGCATCCGTGCCCCAAAATGACCAGCTAGGGTGGCTGTGGGGCCAGAGCCGTGCCCTCTATCCC
AGCATCTACATGCCCCGAGTGTGGAGGGCACAGGGAAGTCACAGATGTATGTGCAACACCGTGTG
GCCGAGGCATTCCGTGTGGCTGTGGCTGCTGGTGACCCCCAATCTGCCGGTGCTGCCCTATGTCCAGA
TCTTCTATGACACGACAAACCACTTTCTGCCCTGGATGAGCTGGAGCACAGCCTGGGGGAGAGTG
CGGCCCAGGGGGCAGCTGGAGTGGTGTCTGGGTGAGCTGGGAAAATACAAGAACCAAGGAATC
ATGTCAGGCCATCAAGGAGTATATGGACACTACACTGGGGCCCTTCATCCTGAACGTGACCAGTGGG
GCCCTTCTCTGCAGTCAAGCCCTGTGCTCCGGCCATGGCCGCTGTGTCCGCCGACCAGCCACCCCA
AAGCCCTCCTCCTCCTTAACCCTGCCAGTTTCTCCATCCAGCTCACGCCTGGTGGTGGGCCCTGAGC
CTGCGGGGTGCCCTCTCACTTGAAGATCAGGCACAGATGGCTGTGGAGTTCAAATGTCGATGCTACC
CTGGCTGGCAGGCACCGTGGTGTGAGCGGAAGAGCATGTGGTGA

```

Εικόνα 42: Το mRNA της *HYAL-1* WT, όπου τονίζεται η μεταβλητή περιοχή και η θέση των εκκινήτων που χρησιμοποιούνται σε qPCR.

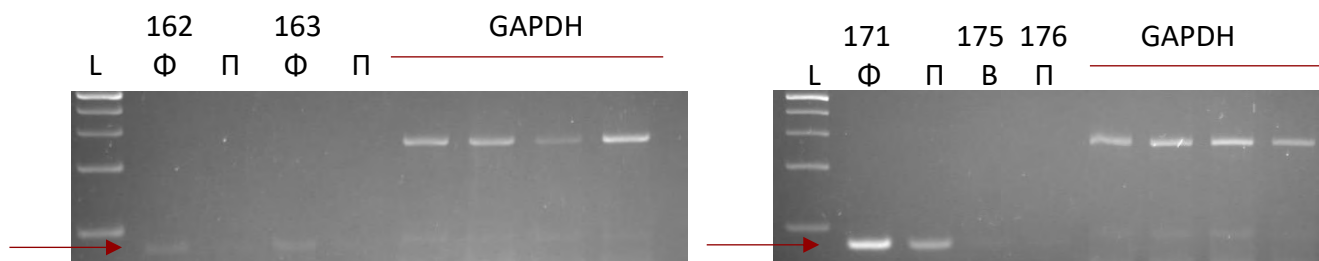
Καθώς το προϊόν θα ήταν πολύ μικρό, δοκιμάστηκε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PCR σε πήγμα αгарόζης 3% αντί του 2% που χρησιμοποιείται κανονικά.

1.4 Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-1* με εκκινήτες που δίνουν προϊόν 79bp



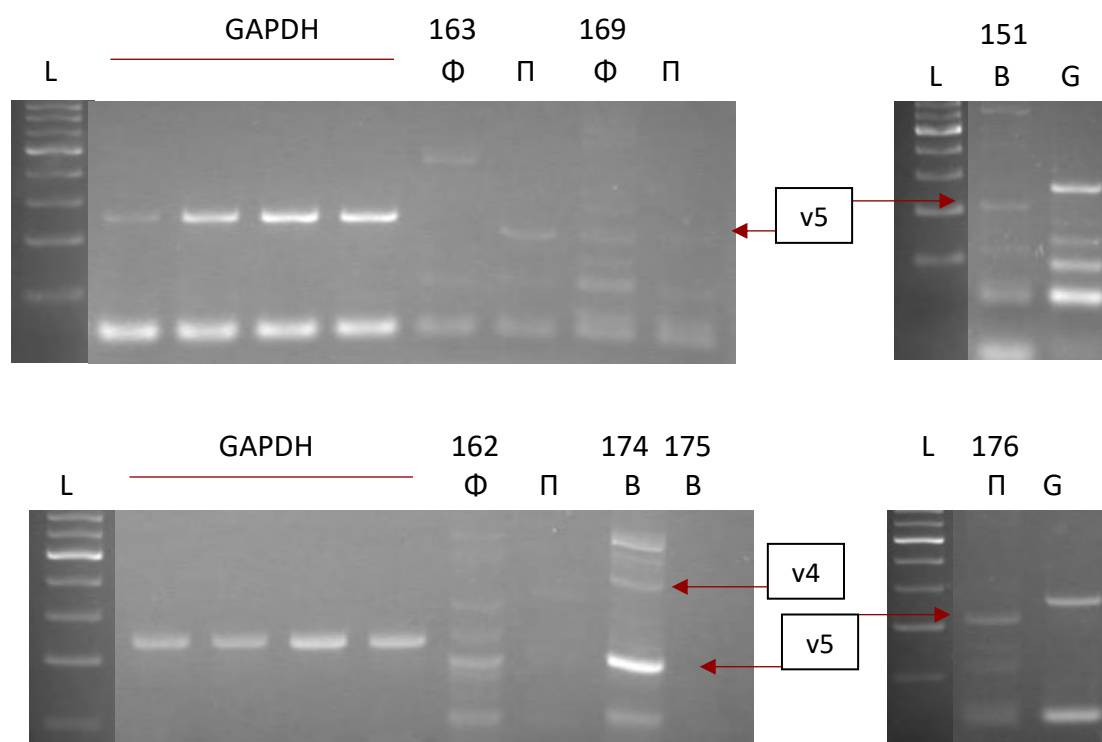
Εικόνα 43: Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-1* WT, πείραμα στους 40 κύκλους, 60ng, gel αгарόζης 3%.

Λόγω των αρκετά ασθενούς έντασης ζωνών που ελήφθησαν, αποφασίστηκε η συνέχιση των πειραμάτων με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα μας επέτρεψε η συγκέντρωση των υπό ανάλυση δειγμάτων (Εικόνα 44). Τα αποτελέσματα οδηγούν στην παραγωγή ενός και μόνο προϊόντος.



Εικόνα 44: Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-1* WT, πείραμα στους 40 κύκλους, 100ng, gel αγαρόζης 3%.

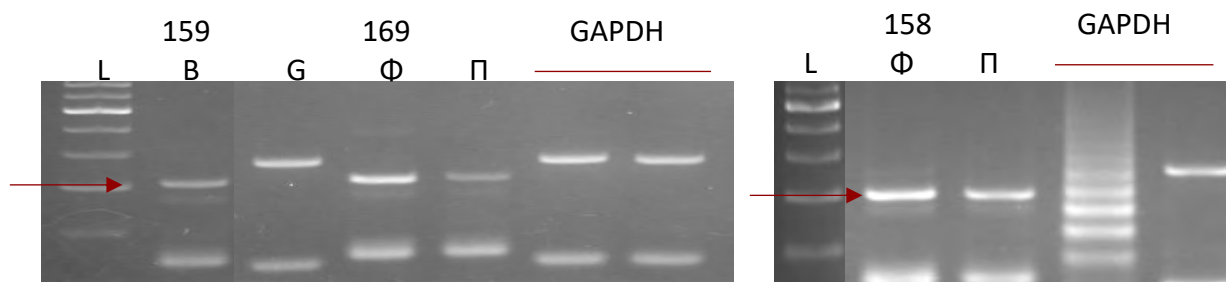
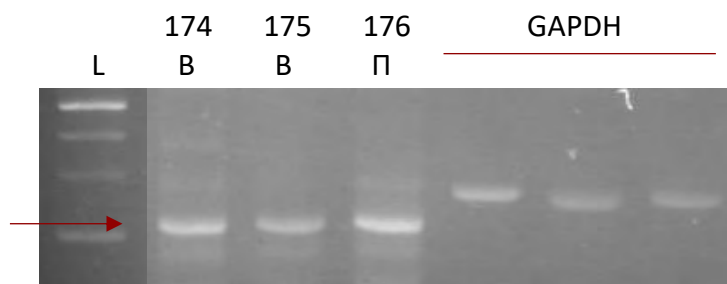
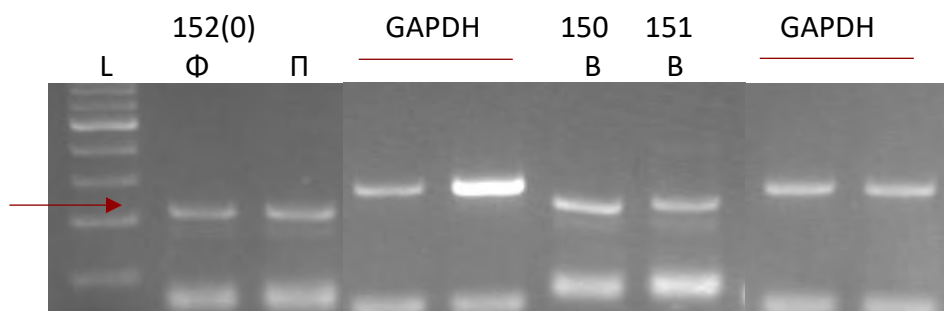
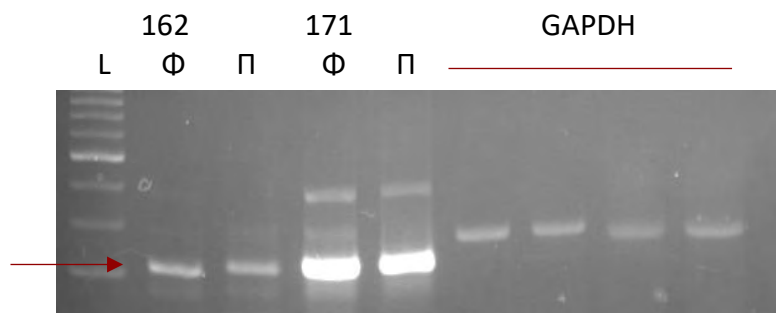
2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ V4 ΚΑΙ V5 ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ HYAL-1 (361BP ΚΑΙ 211BP ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ)

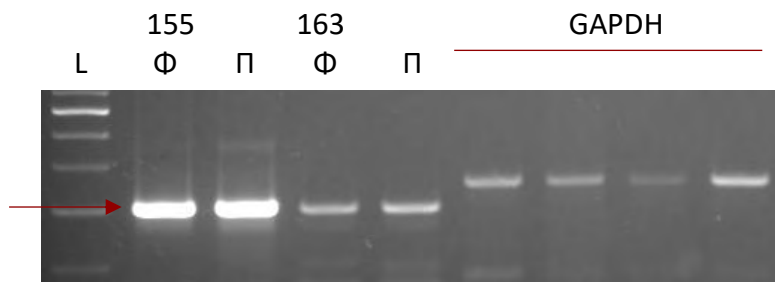


Εικόνα 45 : Γονιδιακή έκφραση των v4 και v5 ισομορφών της *Hyal-1* WT, πείραμα στους 40 κύκλους, gel αγαρόζης 2%.

3. Γονιδιακή έκφραση της PH20 (204bp)

Η PH20 εμφανίζει $\approx 40\%$ ταύτιση με την Hyal-1 wt και είναι ένα ένζυμο που εμφανίζεται στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου. Εκφράζεται σε καρκίνους όπως αυτούς του μαστού και της κεφαλής και τραχήλου και εκτίθεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω GPI αγκυροβόλησης.

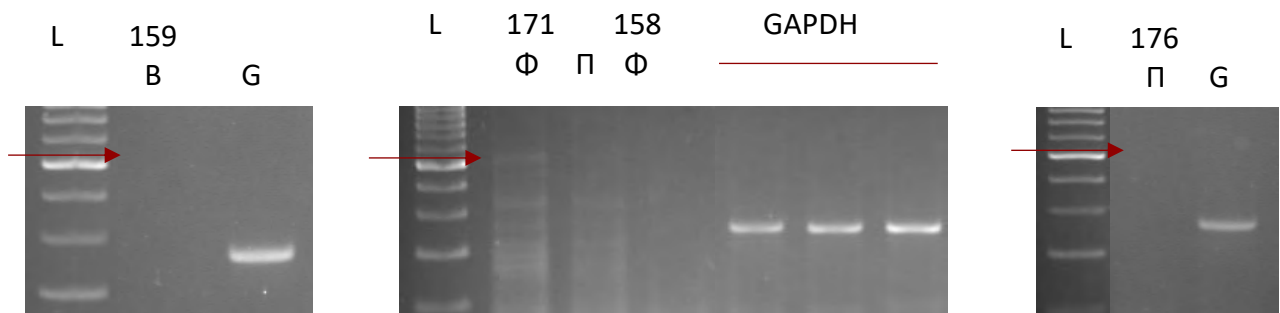
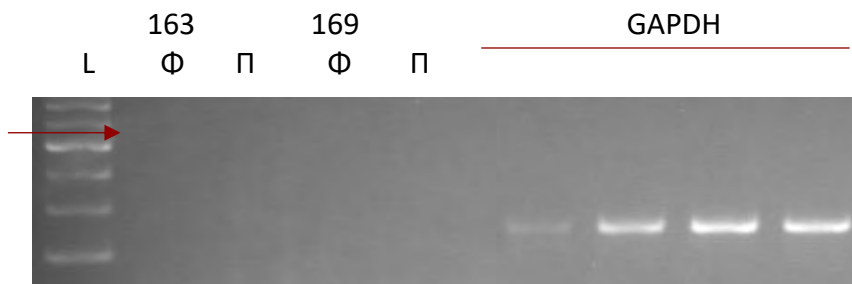
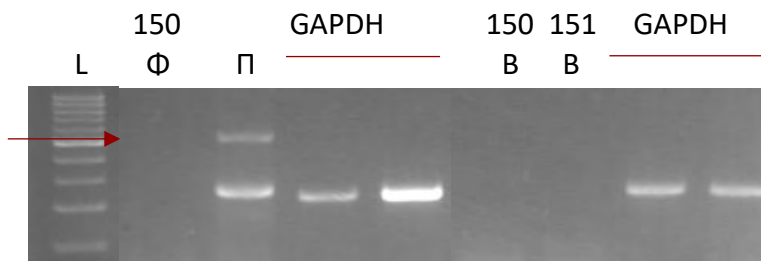


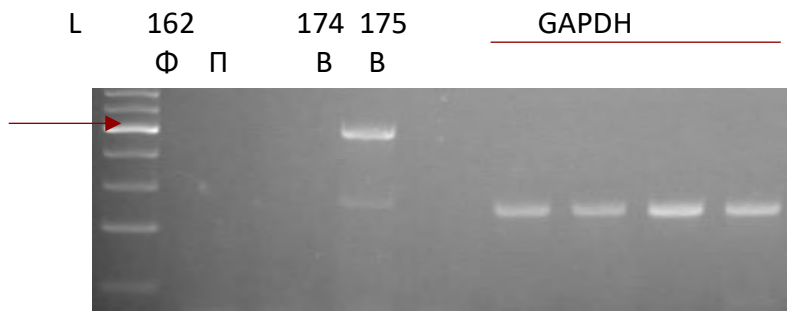


Εικόνα 46 : Γονιδιακή έκφραση της RH20, πείραμα στους 40 κύκλους, gel αгарόζης 2%

4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL2WT (510BP)

Πρόκειται για λυσοσωμική HAase. Υδρολύει το υψηλού μοριακού βάρους υαλουρονικό οξύ σε θραύσματα $\approx 20\text{kDa}$. Ενώ είναι λιγότερο ενεργή από τις άλλες HAases, αναπτύσσει συνεργασία με την Hyal-1 για δημιουργία τετρασακχαριτών υαλουρονικού. Τέλος, όπως και η RH20, έτσι και η Hyal-2 εκτίθεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω GPI αγκυροβόλησης.

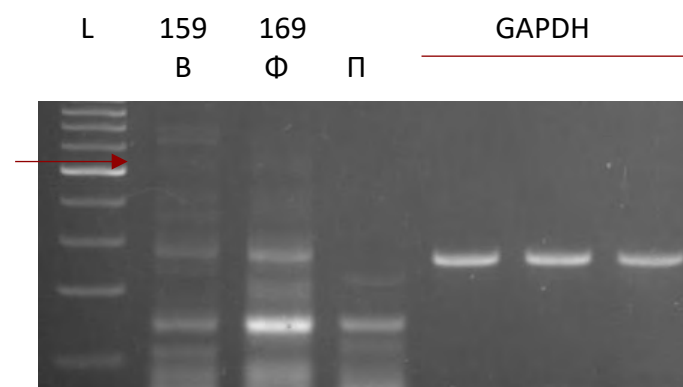
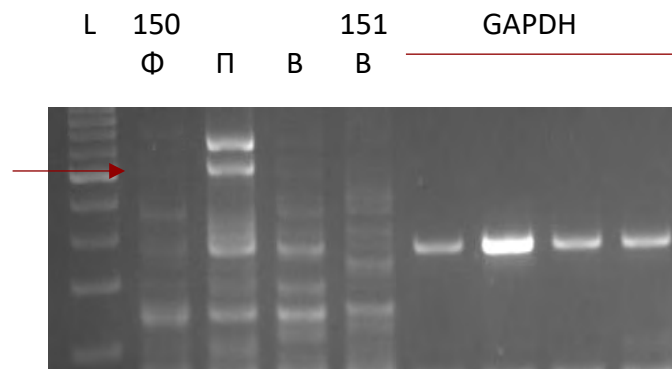


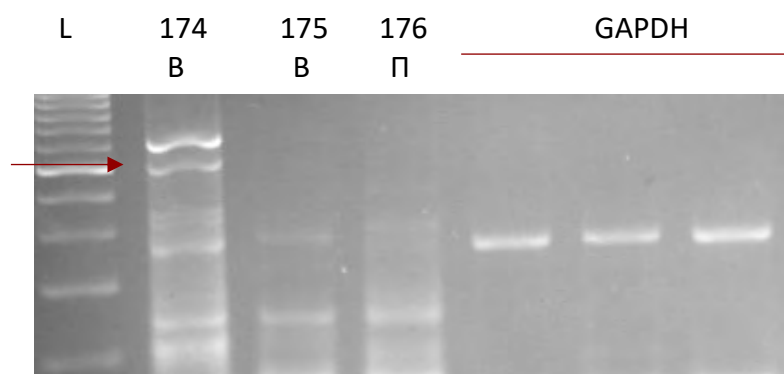


Εικόνα 47 : Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-2wt*, πείραμα στους 40 κύκλους, gel αγαρόζης 2%.

5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HYAL3WT/V1 (512/422BP)

Η *Hyal3v1* ανιχνεύθηκε μόνο ως ίχνος σε έναν ασθενή απ' τους 8 που αναλύθηκαν.

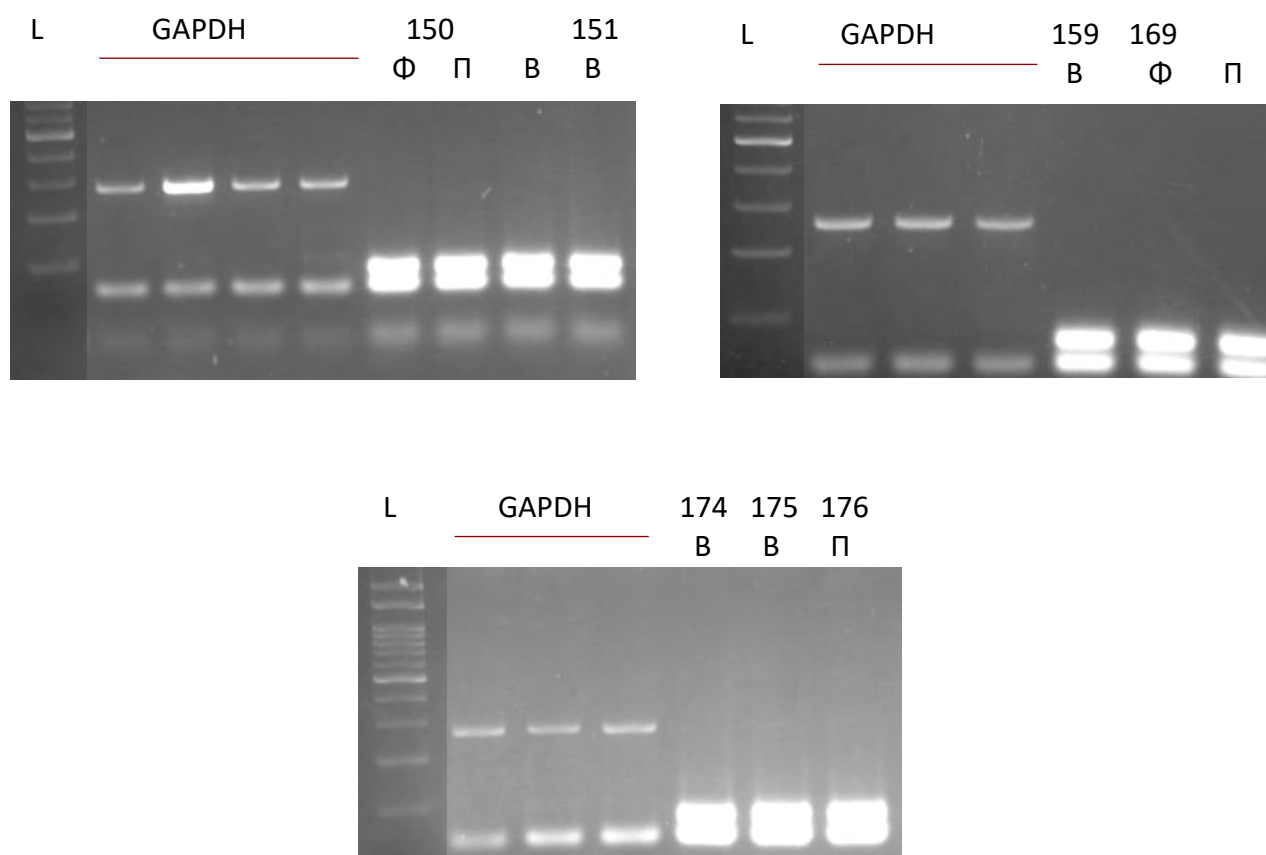




Εικόνα 48: Γονιδιακή έκφραση της *Hyal-3wt* και της *v1* ισομορφής της, πείραμα στους 40 κύκλους, *gel* αγαρόζης 2%.

6. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ *HYAL3V2/V3* (286BP/193BP)

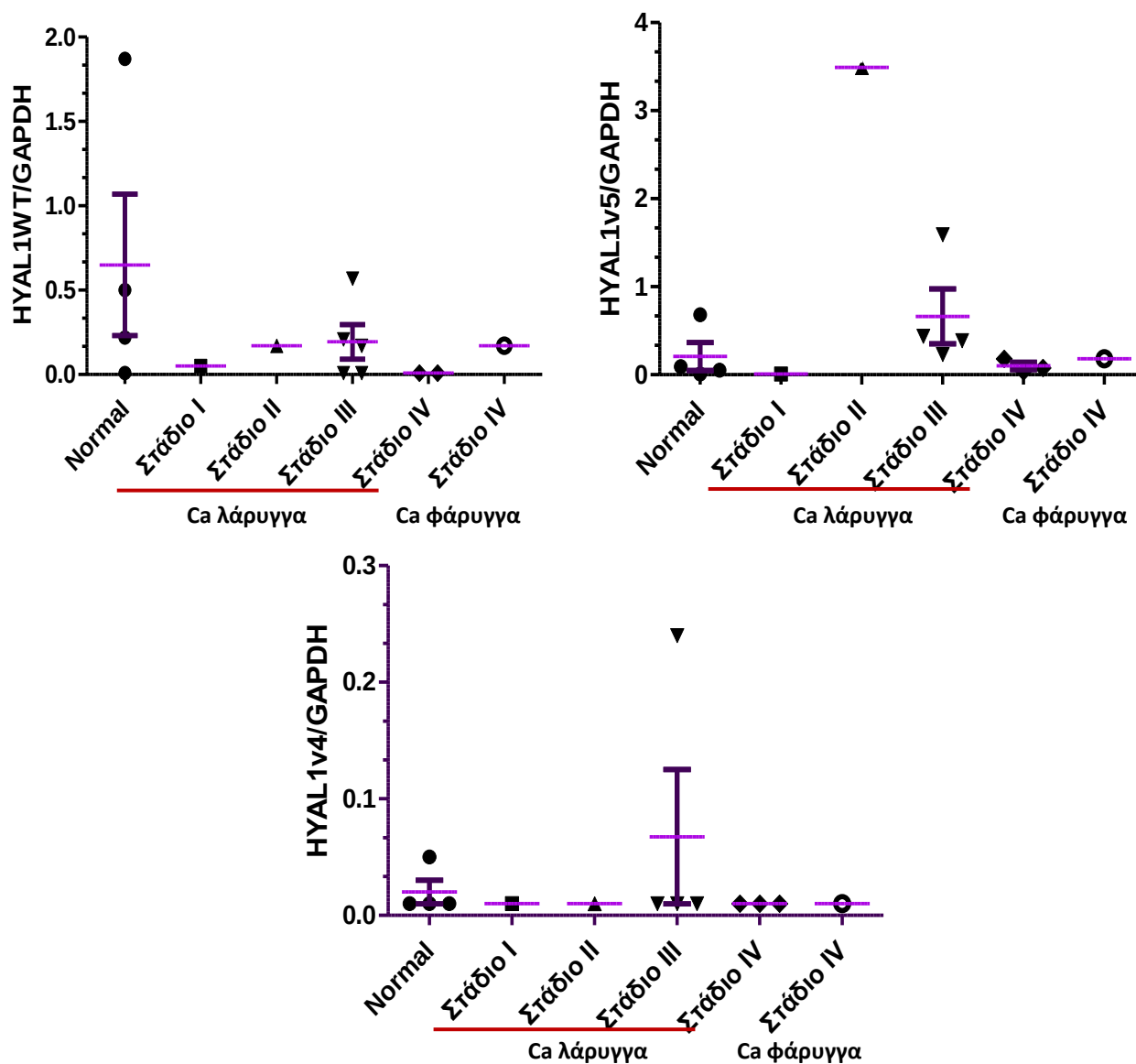
Οι *Hyal3v2/v3* δεν ανιχνεύθηκαν σε κανέναν απ' τους 8 ασθενείς που αναλύθηκαν.



Εικόνα 49: Γονιδιακή έκφραση των *v2* και *v3* ισομορφών της *Hyal-3*, πείραμα στους 40 κύκλους, *gel* αγαρόζης 2%

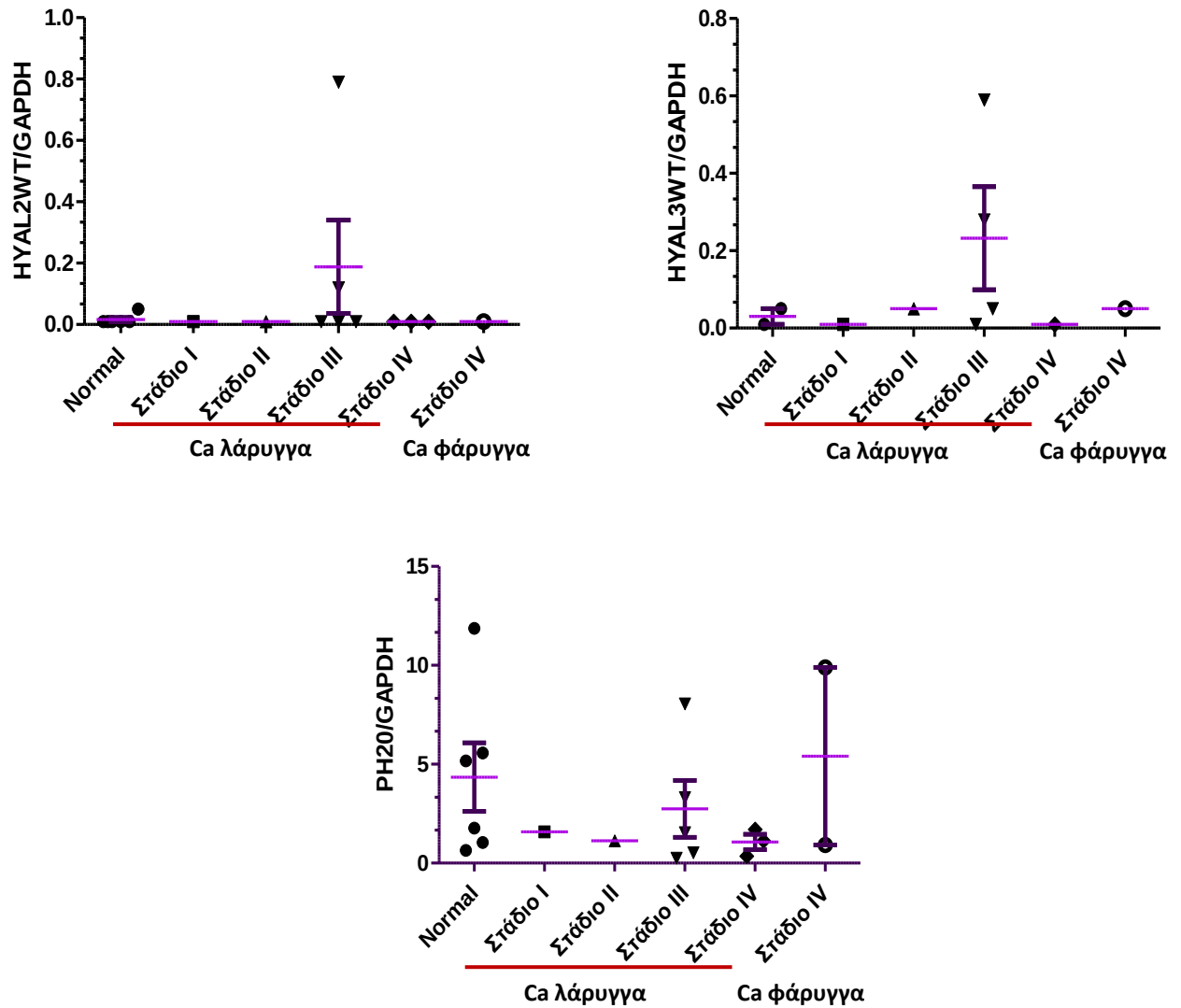
7. ΣΤΑΔΙΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ – ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΘΕΣΗ

Παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της Hyal1wt στα καρκινικά δείγματα μέχρι το στάδιο III και μετά πτώση.



Εικόνα 50: Σταδιοεξαρτώμενη μεταβολή της Hyal-1 wt και των v4 και v5 ισομορφών της, ανάλογα με την ανατομική θέση και το στάδιο.

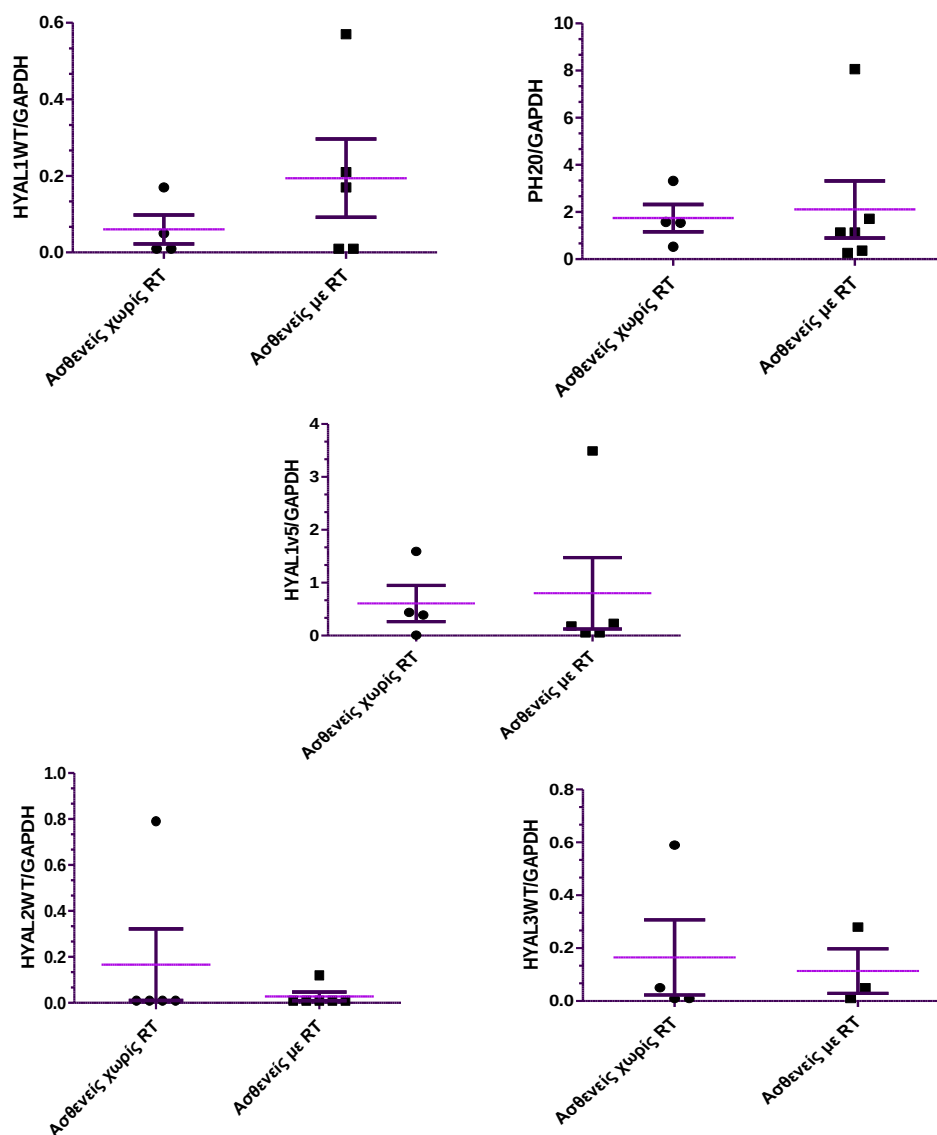
Παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των Hyal2wt και Hyal3wt στα καρκινικά δείγματα μέχρι το στάδιο III και μετά πτώση. Δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο στην PH-20, γεγονός που ίσως υποδεικνύει την μικρότερη εμπλοκή της στην πρόοδο του καρκίνου. (Εικόνα 51)



Εικόνα 51: Σταδιοεξαρτώμενη μεταβολή των Hyal-2 wt, Hyal-3 wt και PH20 ανάλογα με την ανατομική θέση και το στάδιο.

8. ΕΠΙΠΕΔΑ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΩΝ – ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ (RT)

Συγκριτικά με την υποβολή ή όχι σε προεγχειρητική ακτινοθεραπεία, οι ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε RT παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα Hyal1wt, Hyal1v5 και PH20 και μειωμένα επίπεδα Hyal3 wt και Hyal2wt.

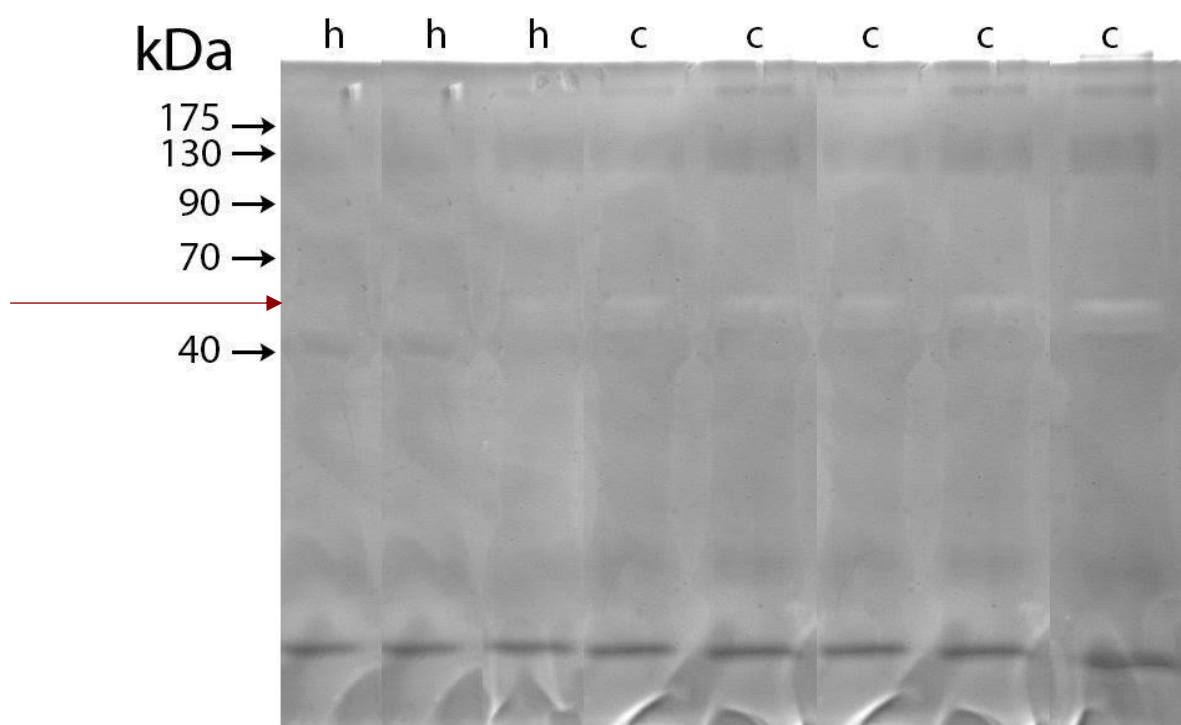


Εικόνα 52: Μεταβολή των Hyal-1wt, v4 και v5 ισομορφών της, Hyal-2 wt, Hyal-3 wt και PH20 ανάλογα με την υποβολή ή όχι σε προεγχειρητική ακτινοβολία..

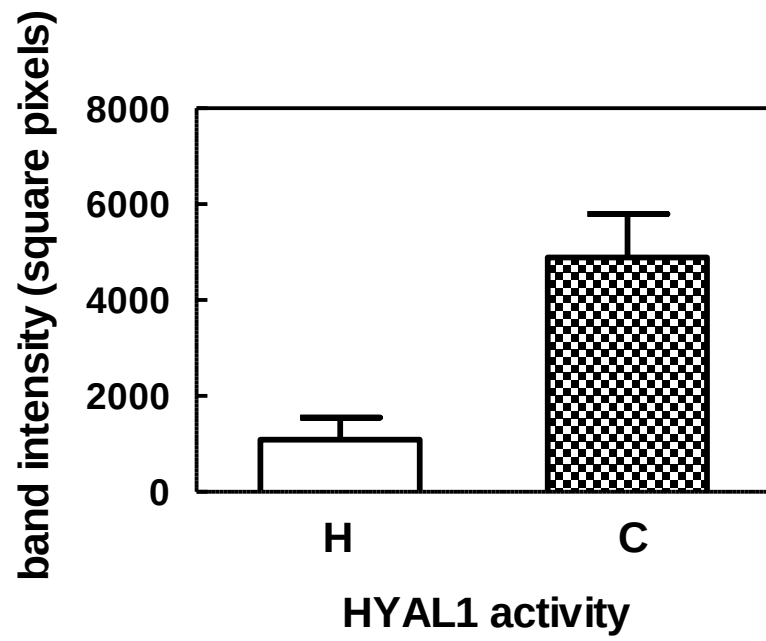
9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΣΙΕΛΟ

Σε παλαιότερες έρευνες έχει δειχθεί ότι το προφίλ των ειδών υαλουρονικού οξέος (HA) στο σάλιο ασθενών καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) και υγιών είναι διαφορετικό. Το σάλιο ασθενών υψηλού σταδίου HNSCC περιέχει υψηλού μοριακού βάρους HA και θραύσματα HA, εκτός από τα είδη HA που περιέχονται στο σάλιο του φυσιολογικού ατόμου. Αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η HYAL1 είναι η κύρια ογκοπροερχόμενη υαλουρονιδάση που εκφράζεται στον HNSCC. Επιπλέον, το HA και η υαλουρονιδάση μπορεί να είναι ευαίσθητοι και ειδικοί δείκτες για την ανίχνευση του HNSCC και την παρακολούθηση της επανεμφάνισής του (Franzemann et al., 2003).

Έτσι, αποφασίστηκε ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας υαλουρονιδάσης σε σίελο ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα σε αντιπαράθεση με δείγματα υγιών (**Εικόνα 53**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα δείγματα των υγιών, τα επίπεδα Hyal1 ήταν σχεδόν μηδαμινά, ενώ στα δείγματα των ασθενών τα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν ήταν εμφανώς αυξημένα (**Εικόνα 54**).



Εικόνα 53: Ενζυμική δραστηριότητα υαλουρονιδάσης σε σίελο ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα σε αντιπαράθεση με δείγματα υγιών. Όπου h=healthy-υγιής, c=ασθενής με καρκίνο του λάρυγγα.



Εικόνα 54: Ποσοτικοποίηση της δραστικότητας υαλουρονιδάσης σε σίελο ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα σε αντιπαράθεση με δείγματα υγιών. Όπου H=υγιής, C=ασθενής με καρκίνο του λάρυγγα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κάθε χρόνο πάνω από 600.000 άτομα παγκοσμίως διαγιγνώσκονται με καρκίνο εκ πλακώδους επιθηλίου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) (Pereira et al., 2011). Ανάμεσα στα αίτια της νόσου είναι το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Παρ' όλα αυτά, ο προ-συπτωματικός έλεγχος είναι ανεπαρκής, συνεπώς οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται στο τελικό στάδιο της νόσου. Παρά την επιθετική θεραπευτική προσέγγιση της νόσου στην οποία περιλαμβάνονται η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία (πριν και μετά την χειρουργική επέμβαση), δεν έχει υπάρξει καμία σημαντική βελτίωση στην επιβίωση μετά τα πέντε χρόνια για τα τελευταία 20 χρόνια (Pereira et al., 2011), και αποτελεί παράδοξο η ολοένα και μειούμενη επιβίωση με την πάροδο των χρόνων. Η 5ετής επιβίωση εκτιμάται ότι βρίσκεται στο 63% για την Ινδο-ευρωπαϊκή φυλή και στο 43% για τους έγχρωμους στις Ηνωμένες Πολιτείες (Jemal et al., 2010).

Η αποτυχία της θεραπείας παρουσιάζεται σαν τοπική υποτροπή και απομακρυσμένες μεταστάσεις (Pereira et al., 2011). Εμφανίζεται αρχικά στους λεμφαδένες του λαιμού και η εμφάνιση αυτή είναι υπεύθυνη για την υψηλή θνησιμότητα και την κακή πρόγνωση των HNSCC, καθώς αποτελεί τον πιο δυσμενή ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα αυτών. Επιπλέον, οι όγκοι μπορεί να διαφέρουν στην εξέλιξη και τη συμπεριφορά ανάλογα με την πρωταρχική θέση εμφάνισης. Μεγάλη ετερογένεια υπάρχει επίσης στο κλινικό αποτέλεσμα και στην ανταπόκριση στη θεραπεία ακόμα και σε ασθενείς της ίδιας ομάδας κινδύνου.

Για τους ανωτέρω λόγους, το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στον προσδιορισμό καλύτερων βιολογικών και κλινικών παραγόντων αλλά και τεχνικών που θα μπορέσουν να χρησιμεύσουν σαν δείκτες διάγνωσης και πρόγνωσης. Καθώς πρόσφατες εξελίξεις στη βασική έρευνα και τη γενωμική έχουν βελτιώσει την κατανόηση της βιολογικής βάσης για την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών μελετώνται στην περίπτωση του HNSCC για την πιθανή δυνατότητα πρόληψης και διάγνωσης της ασθένειας ή την ανταπόκριση στη θεραπεία. Σε αυτά τα πλαίσια, μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία οι υαλουρονιδάσες (HYALs).

Οι υαλουρονιδάσες είναι μία κατηγορία ενζύμων, τα οποία αποικοδομούν κυρίως το υαλουρονικό οξύ (HA) σε μικρά θραύσματα, από τα οποία εκείνα με μέγεθος μεταξύ 3 και 25 δισακχαριτικών μονάδων μπορούν να επάγουν αγγειογένεση. Τέτοια θραύσματα, τα οποία μπορούν να διεγείρουν τον ενδοθηλιακό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την προσκόλληση και την μετανάστευση ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια, είναι παρόντα σε ασθενείς με HNSCC καθώς και σε ασθενείς με άλλους τύπους καρκίνου (Christopoulos et al., 2006). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη των όγκων σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου, όπως σε αυτή του προστάτη και της ουροδόχου κύστης, καθώς και με την επιθετικότητα επιπρόσθετων ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του μαστού και του λάρυγγα. Αυξημένα επίπεδα υαλουρονιδασών έχουν εντοπιστεί σε διάφορες κακοήθειες όπως στον καρκίνο του προστάτη, της ουροδόχου κύστεως, στον καρκίνο

κεφαλής και τραχήλου, του μαστού και στο κακοήθες γλοίωμα (Lokeshwaret al., 2005; Lokeshwar et al., 2005; Franzmann et al., 2003). Επιπλέον, υπερέκφραση της HYAL-2 έχει δείχθει ότι επιταχύνει τον σχηματισμό όγκου. Ωστόσο, επίπεδα υαλουρονιδασών ικανά να απομακρύνουν το υαλουρονικό φέρονται σαν αντικαρκινικές θεραπείες στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη.

Μέχρι στιγμής, τα πειραματικά δεδομένα που υπάρχουν δεν μπορούν να οδηγήσουν σε κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα ως προς την συμβολή των υαλουρονιδασών στους διάφορους τύπους καρκίνου, εκτός ορισμένων περιπτώσεων. Σίγουρα όμως φαίνεται ότι αποτελούν συστατικά των ιστών τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν όσον αφορά στην έγκαιρη διάγνωση, τη σταδιοποίηση και την εξέλιξη του καρκίνου, αλλά και στην ανίχνευση πιθανής επανεμφάνισής του, γεγονός που μας οδήγησε στην μελέτη της γονιδιακής έκφρασης αυτών και των ισομορφών τους στον καρκίνο του λάρυγγα.

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΩΝ

Η Hyal-1 αποτελεί την κύρια ογκοπροερχόμενη υαλουρονιδάση (HASE) που εκφράζεται στον λάρυγγικό καρκίνο. Αφού πραγματοποιήθηκε η ανάλυση δειγμάτων ιστού έξι ασθενών με ζεύγος εκκινητών που απέδιδε 736bp προϊόν, παρατηρήθηκαν ποικίλες ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε διαφορετικό αριθμό bp (χαμηλότερο) και μόνο στην περίπτωση ενός ασθενούς ανιχνεύθηκε το σωστό μέγεθος στον παθολογικό ιστό, και σε μια βιοψία ίχνη. Έτσι αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί επόμενο πείραμα στους 40 κύκλους όπου εξακολούθησε η ανίχνευση μη αναμενόμενων ζωνών. Κατόπιν αναζήτησης της αλληλουχίας του mRNA ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια αποσιώπηση που προκαλεί το πρόβλημα αυτό, σε διάφορες αλληλουχίες που μελετήθηκαν, εντοπίζεται ένα τμήμα που δύναται να υπάρχει ολόκληρο, τμήμα αυτού ή και να απουσιάζει πλήρως από το συνολικό mRNA. Διερευνήθηκε ένα ακόμη ζεύγος εκκινητών που είχε επιλεγεί από παλαιότερη μελέτη στο εργαστήριο, και κατόπιν, συνδυασμός forward του πρώτου και reverse του δεύτερου που έδιναν προϊόντα 208bp και 977bp αντίστοιχα. Καθώς για κάθε ζεύγος εκκινητών που κυκλοφορεί στο εμπόριο, όπως κι αυτά που προϋπήρχαν στο εργαστήριο, ο ένας εκ των δύο εκκινητών ενέπιπτε εντός του μεταβλητού τμήματος, τα αποτελέσματα δεν μπορούσαν με σιγουριά να θεωρηθούν αξιόπιστα. Μετά από αναζήτηση, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ένα ζεύγος εκκινητών για qPCR, το οποίο δεν περιείχε το μεταβλητό τμήμα, ούτε όμως και ενέπιπτε πάνω σε αυτό. Καθώς το προϊόν θα ήταν πολύ μικρού μεγέθους, δοκιμάστηκε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PCR σε πήγμα αгарόζης 3% αντί του 2% που χρησιμοποιείται κανονικά. Λόγω της αρκετά ασθενούς έντασης των ζωνών που ελήφθησαν, αποφασίστηκε η συνέχιση των πειραμάτων με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα μας επέτρεπε η συγκέντρωση των υπό ανάλυση δειγμάτων (100ng). Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην παραγωγή ενός και μόνο προϊόντος και παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της HYAL1wt στα καρκινικά δείγματα μέχρι το στάδιο III και μετά πτώση. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία περισσότερων δειγμάτων χαμηλότερου καρκινικού σταδίου για τη λήψη πιο έγκυρων και στατιστικά αποδεκτών αποτελεσμάτων.

Ελαφρώς αυξημένα επίπεδα παρουσίασαν και οι ισομορφές της HYAL1 η v4 και η v5, με ανίχνευση αυτών σε λίγα από τα δείγματα που αναλύθηκαν.

Σε παλαιότερη μελέτη (Franzmann et al 2003), είχε βρεθεί η παρουσία της HYAL-2 σε καρκινικές σειρές HNSCC. Η HYAL-2 έχει μια ασυνήθιστη ειδικότητα υποστρώματος, καθώς αποικοδομεί HA υψηλού μοριακού βάρους σε θραύσματα ενδιάμεσου μεγέθους περίπου 20 kDa. Για αυτό το λόγο, προτάθηκε ένα μοντέλο κατά το οποίο η HYAL-1 και η HYAL-2 είναι οι κύριες υαλουρονιδάσες των σωματικών ιστών των θηλαστικών και λειτουργούν συνεργατικά για την αποικοδόμηση του υψηλού μοριακού βάρους HA σε τετρασακχαρίτες. Στην παρούσα μελέτη, η HYAL-2 βρέθηκε να έχει αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για τα καρκινικά δείγματα μέχρι το στάδιο III και μετά μειωμένα σε σχέση με τα μακροσκοπικώς φυσιολογικά δείγματα ιστού, με ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση στα δείγματα σταδίου III.

Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα HYAL-3wt ανιχνεύθηκαν στους καρκινικούς ιστούς μέχρι το στάδιο III με μετέπειτα μείωση σε σχέση με τους μακροσκοπικώς φυσιολογικούς. Οι ισομορφές της HYAL3, v2 και v3 δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα απ' τα οκτώ δείγματα που αναλύθηκαν.

Έχει βρεθεί ότι τα λιγότερο επιθετικά κύτταρα του μαστού εκφράζουν HAS-3 και HYAL-3, ενώ πολύ περισσότερο επιθετικά εκφράζουν HAS-2 και HYAL-2. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο γιατί η παραγωγή HA από τη HAS-2 και η αποικοδόμηση αυτού από την HYAL-2 επάγουν εισβολή και επιθετικότητα του όγκου, εν συγκρίσει με τη παραγωγή HA από HAS-3 και επακόλουθη αποικοδόμηση από την HYAL-3, που σχετίζεται με λιγότερο επιθετικό φαινότυπο. Παρόλες αυτές τις παρατηρήσεις, αξίζει να σημειωθεί ότι τα πειράματα διεξήχθησαν σε επίπεδο μεταγραφικό, μέσω πραγματικού χρόνου RT-PCR. Έτσι με βάση τη δεδομένη ύπαρξη λειτουργικά απενεργοποιημένων ματισμένων ισομορφών σε περιπτώσεις των HYAL-1 και HYAL-3, που μεταγράφονται αλλά δε μεταφράζονται, τίθεται σε αμφιβολία η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, όσον αφορά το επίπεδο της έκφρασης. Παρόμοιες παρατηρήσεις άλλωστε ελήφθησαν και στον καρκίνο του ενδομήτριου, όπου HYAL-2 και HYAL-3 ανιχνεύθηκαν σε επίπεδα 1000 και 30 φορές μεγαλύτερα από την HYAL-1, αντίστοιχα. Επομένως η συμπεριφορά της HYAL-3 είναι αμφιλεγόμενη (Lokeshwar et al., 2008).

Τέλος, στην παρούσα έρευνα, βρέθηκε ότι η PH-20 είναι σχεδόν σταθερή και δεν εμφανίζει κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των καρκινικών και των φυσιολογικών δειγμάτων, γεγονός που ίσως υποδεικνύει την μικρότερη εμπλοκή της στην πρόοδο του καρκίνου. Φάνηκε όμως, παρόλα αυτά, ότι είναι σχετικά πιο αυξημένη στο δείγμα ιστού φάρυγγα σε σχέση με τα δείγματα ιστού λάρυγγα διαφόρων αλλά και του ίδιου καρκινικού σταδίου (Στάδιο IV). Το γενικότερο αποτέλεσμα συμφωνεί με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία το επίπεδο έκφρασης της PH-20 βρέθηκε να μην παρουσιάζει διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των καρκινικών δειγμάτων και των μακροσκοπικώς φυσιολογικών δειγμάτων (Christopoulos et al., 2006). Παρά το γεγονός ότι σε παλαιότερη μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της PH-20 είναι σημαντικά αυξημένα για τους καρκινικούς ιστούς σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς, στα αποτελέσματα για τους ιστούς οι οποίοι προηγουμένως είχαν υποστεί ακτινοβολία στα πλαίσια της θεραπείας δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στο επίπεδο έκφρασης μεταξύ των δύο ιστών (Godin et al., 2000). Στην παρούσα εργασία τα έξι από τα δέκα δείγματα που αναλύθηκαν είχαν υποστεί ακτινοβολία,

συνεπώς το αποτέλεσμα που λήφθηκε φαίνεται να συμφωνεί με τη συγκεκριμένη μελέτη.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΣΙΕΛΟ

Εκτός από την αναγκαιότητα εύρεσης δεικτών πρόγνωσης και διάγνωσης της νόσου, απαραίτητη κρίνεται και η εύρεση νέων διαγνωστικών εργαστηριακών τεχνικών. Μέχρι σήμερα, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανάλυση των κυτταρικών και χημικών συστατικών του αίματος και άλλων βιολογικών υγρών όπως τα ούρα. Ανάμεσα σε αυτά ο σίελος προσφέρει αρκετά διακριτά πλεονεκτήματα καθώς η τεχνική δειγματοληψίας αυτής είναι μη επεμβατική και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό για την συλλογή. Η διάγνωση ασθενειών μέσω της ανάλυσης σιέλου αποτελεί επιπλέον μια τεχνική ιδιαίτερα πολύτιμη για την περίπτωση των παιδιών και των ηλικιωμένων ατόμων αφού η συλλογή του δεν φέρει προβλήματα συγκατάβασης, όπως η συλλογή αίματος, ούτε ιδιωτικότητας, όπως η συλλογή ούρων. Επιπλέον, η ανάλυση σιέλου μπορεί να παρέχει μια οικονομικά αποδοτική προσέγγιση ελέγχου μεγάλων ομάδων πληθυσμού.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει σε σχέση με τις τεχνικές ελέγχου μέσω του πλάσματος είναι πολλά. Συγκεκριμένα, στο πλάσμα η συγκέντρωση πρωτεϊνών μπορεί να διαφέρει πάνω από εννέα τάξεις μεγέθους, γεγονός που μειώνει σημαντικά την πιθανότητα ανίχνευσης εκείνων στο κατώτερο όριο της κλίμακας. Επιπλέον, το αίμα συντίθεται από πεπτίδια, πρωτεΐνες και κύτταρα τα οποία έχουν χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από δευτερόλεπτα έως εβδομάδες ή και περισσότερο, επομένως η παρουσία μιας ουσίας μπορεί να μην αντανakλά επακριβώς την τρέχουσα κατάσταση του οργανισμού. Συμπερασματικά, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στο σίελο για την χρησιμοποίησή του σαν διαγνωστικό μέσο για δύο λόγους. Ο πρώτος αφορά στη συλλογή του, καθώς η τεχνική συλλογής του είναι μη επεμβατική και μπορεί να διεξαχθεί σε οποιοδήποτε περιβάλλον χωρίς να απαιτούνται ιδιαίτερες δεξιότητες από τον ερευνητή ούτε ιδιαίτερος εξοπλισμός και ο δεύτερος αφορά στη φυσιολογία της στοματικής κοιλότητας, η οποία επιτρέπει τη συνεχή ανανέωση του σιέλου στο στόμα. Συνεπώς, η σύσταση του υγρού κάθε χρονική στιγμή αντανakλά τη μεταβολική δραστηριότητα των εκκριτικών στοιχείων που παράγουν το σίελο.

Για όλους τους λόγους που αναφέρθηκαν επιλέχθηκε η μελέτη του σιέλου σαν μέσο πιθανής διάγνωσης του καρκίνου του λάρυγγα. Επιπροσθέτως, η χρήση του σιέλου ερμηνεύεται από την ύπαρξη των εξωσωμάτων (εξωκυττάρων κυστιδίων που περικλείουν κυτταρικά συστατικά και απομακρύνονται από τα κύτταρα), τα οποία μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή άλλων μηχανισμών μεταφέρονται σε απομακρυσμένες περιοχές από τον ασθενή ιστό, γεγονός το οποίο εν τέλει συνδέει εννοιολογικά τα δύο μέρη της εργασίας αυτής.

Σε παλαιότερες έρευνες έχει δειχθεί ότι το προφίλ των ειδών υαλουρονικού οξέος (HA) στο σάλιο ασθενών καρκίνου κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) και υγιών είναι διαφορετικό. Ο σίελος ασθενών υψηλού σταδίου HNSCC περιέχει υψηλού μοριακού βάρους HA και θραύσματα HA, εκτός από τα είδη HA που περιέχονται στο σίελο του

φυσιολογικού ατόμου. Αποτελέσματα έχουν δείξει ότι το HA και η υαλουρονιδάση μπορεί να είναι ευαίσθητοι και ειδικοί δείκτες για την ανίχνευση του HNSCC και την παρακολούθηση της επανεμφάνισής του (Franzmann et al., 2003).

Έτσι, αποφασίστηκε ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας υαλουρονιδάσης σε σίελο ασθενών με καρκίνο του λάρυγγα σε αντιπαράθεση με δείγματα υγιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα δείγματα των υγιών, τα επίπεδα HYAL1 ήταν σχεδόν μηδαμινά, ενώ στα δείγματα των ασθενών τα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν ήταν εμφανώς αυξημένα. Δεδομένου ότι η HYAL-1 (WT) βρέθηκε να έχει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στα καρκινικά σε σχέση με τον εγγύς του όγκου φαινομενικά υγιή ιστό, πιθανολογείται ότι θα μπορούσαν αυτά τα ευρήματα να συνδέονται μεταξύ τους.

Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε επίσης αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της HYAL1wt στα καρκινικά δείγματα μέχρι το στάδιο III και μετά πτώση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Επομένως, ίσως να υπάρχει ένας συνδυασμός στον καρκίνο, όπου μάλλον προϋπάρχει αύξηση του υαλουρονικού για να διευκολυνθεί η ανάπτυξη του καρκίνου τοπικά και κατόπιν, ο ίδιος ο καρκίνος ενεργοποιεί την παραγωγή υαλουρονιδάσης για να αποικοδομηθεί το υαλουρονικό και να διευκολυνθεί η αγγειογένεση, αλλά και η μετάσταση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aboughalia**, A. H. (2006). "Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion." *Arch Med Res* **37**(1): 109-116.
- Aimes**, R. T. and J. P. Quigley (1995). "Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments." *J Biol Chem* **270**(11): 5872-5876.
- Alberga**, A., J. L. Boulay, E. Kempe, C. Dennefeld and M. Haenlin (1991). "The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers." *Development* **111**(4): 983-992.
- Angadi**, P. V., P. V. Patil, V. Angadi, D. Mane, S. Shekar, S. Hallikerimath, A. D. Kale and S. G. Kardesai (2016). "Immunoexpression of Epithelial Mesenchymal Transition Proteins E-Cadherin, beta-Catenin, and N-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Int J Surg Pathol* **24**(8): 696-703.
- Arming**, S., B. Strobl, C. Wechselberger and G. Kreil (1997). "In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm." *Eur J Biochem* **247**(3): 810-814.
- Atay**, S. (2014) Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 711–716
- Becker**, K. F., E. Rosivatz, K. Blechschmidt, E. Kremmer, M. Sarbia and H. Hofler (2007). "Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers." *Cells Tissues Organs* **185**(1-3): 204-212.
- Behrens**, J., M. M. Mareel, F. M. Van Roy and W. Birchmeier (1989). "Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion." *J Cell Biol* **108**(6): 2435-2447.
- Bobrie**, A. and Thery, C. (2013) Exosomes and communication between tumors and the immune system: are all exosomes equal? *Biochem. Soc. Trans.* 41, 263–267
- Bonnans**, C., J. Chou and Z. Werb (2014). "Remodelling the extracellular matrix in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(12): 786-801.
- Caramel**, J., E. Papadogeorgakis, L. Hill, G. J. Browne, G. Richard, A. Wierinckx, G. Saldanha, J. Osborne, P. Hutchinson, G. Tse, J. Lachuer, A. Puisieux, J. H. Pringle, S. Ansieau and E. Tulchinsky (2013). "A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma." *Cancer Cell* **24**(4): 466-480.

Carver, E. A., R. Jiang, Y. Lan, K. F. Oram and T. Gridley (2001). "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition." *Mol Cell Biol* **21**(23): 8184-8188.

Cavaillon, J. M. and M. Adib-Conquy (2005). "Monocytes/macrophages and sepsis." *Crit Care Med* **33**(12 Suppl): S506-509.

Chang, N. S. (2002). "Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts." *BMC Cell Biol* **3**: 8.

Chatterjee, A., E. Mambo and D. Sidransky (2006). "Mitochondrial DNA mutations in human cancer." *Oncogene* **25**(34): 4663-4674.

Chen, W. C. and B. Obrink (1991). "Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells." *J Cell Biol* **114**(2): 319-327.

Cherr, G. N., A. I. Yudin and J. W. Overstreet (2001). "The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling." *Matrix Biol* **20**(8): 515-525.

Chivian, D., D. E. Kim, L. Malmstrom, P. Bradley, T. Robertson, P. Murphy, C. E. Strauss, R. Bonneau, C. A. Rohl and D. Baker (2003). "Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server." *Proteins* **53 Suppl 6**: 524-533.

Christopoulos, T. A., N. Papageorgakopoulou, D. A. Theocharis, N. S. Mastronikolis, T. A. Papadas and D. H. Vynios (2006). "Hyaluronidase and CD44 hyaluronan receptor expression in squamous cell laryngeal carcinoma." *Biochim Biophys Acta* **1760**(7): 1039-1045.

Cocucci, E. and J. Meldolesi (2015). "Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles." *Trends Cell Biol* **25**(6): 364-372.

Cocucci, E. et al. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* **19**, 43–51

Comtesse, N., E. Maldener and E. Meese (2001). "Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase." *Biochem Biophys Res Commun* **283**(3): 634-640.

Crescitelli, R. et al. (2013) Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* Published online September 12, 2013.

Curran, S. and G. I. Murray (2000). "Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion etc." *Eur J Cancer* **36**(13 Spec No): 1621-1630.

Deng, X., Y. He and P. A. Martin-Deleon (2000). "Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes." *J Androl* **21**(6): 822-832.

Dissanayake, S. K., M. Wade, C. E. Johnson, M. P. O'Connell, P. D. Leotlela, A. D. French, K. V. Shah, K. J. Hewitt, D. T. Rosenthal, F. E. Indig, Y. Jiang, B. J. Nickoloff, D. D. Taub, J. M. Trent, R. T. Moon, M. Bittner and A. T. Weeraratna (2007). "The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition." *J Biol Chem* **282**(23): 17259-17271.

Flannery, C. R., C. B. Little, C. E. Hughes and B. Caterson (1998). "Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 824-829.

Foulds, L. (1954). "The experimental study of tumor progression: a review." *Cancer Res* **14**(5): 327-339.

Franzmann, E. J., G. L. Schroeder, W. J. Goodwin, D. T. Weed, P. Fisher and V. B. Lokeshwar (2003). "Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors." *Int J Cancer* **106**(3): 438-445.

Frost, G. I., A. B. Csoka, T. Wong and R. Stern (1997). "Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(1): 10-15.

Frost, G. I., G. Mohapatra, T. M. Wong, A. B. Csoka, J. W. Gray and R. Stern (2000). "HYAL1/LUCA-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head and neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA." *Oncogene* **19**(7): 870-877.

Frost, G. I. and R. Stern (1997). "A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents." *Anal Biochem* **251**(2): 263-269.

Gialeli, C., A. D. Theocharis and N. K. Karamanos (2011). "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting." *FEBS J* **278**(1): 16-27.

Godin, D. A., P. C. Fitzpatrick, A. B. Scandurro, P. C. Belafsky, B. A. Woodworth, R. G. Amedee, D. J. Beech and B. S. Beckman (2000). "PH20: a novel tumor marker for laryngeal cancer." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **126**(3): 402-404.

Gross, I., I. Duluc, T. Benameur, A. Calon, E. Martin, T. Brabletz, M. Keding, C. Domon-Dell and J. N. Freund (2008). "The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells." *Oncogene* **27**(1): 107-115.

Halfter, W., P. Oertle, C. A. Monnier, L. Camenzind, M. Reyes-Lua, H. Hu, J. Candiello, A. Labilloy, M. Balasubramani, P. B. Henrich and M. Plodinec (2015). "New concepts in basement membrane biology." *FEBS J* **282**(23): 4466-4479.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Harada, H. and M. Takahashi (2007). "CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2." *J Biol Chem* **282**(8): 5597-5607.

Heckel, D., N. Comtesse, N. Brass, N. Blin, K. D. Zang and E. Meese (1998). "Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma." *Hum Mol Genet* **7**(12): 1859-1872.

Herlyn, M., C. Berking, G. Li and K. Satyamoorthy (2000). "Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation." *Melanoma Res* **10**(4): 303-312.

Hannafon, B.N. and Ding, W.Q. (2013) Intercellular communication by exosome-derived miRNAs in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 14240– 14269

Hirose, Y., K. Chiba, T. Karasugi, M. Nakajima, Y. Kawaguchi, Y. Mikami, T. Furuichi, F. Mio, A. Miyake, T. Miyamoto, K. Ozaki, A. Takahashi, H. Mizuta, T. Kubo, T. Kimura, T. Tanaka, Y. Toyama and S. Ikegawa (2008). "A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation." *Am J Hum Genet* **82**(5): 1122-1129.

Hunnicut, G. R., P. Primakoff and D. G. Myles (1996). "Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding." *Biol Reprod* **55**(1): 80-86.

Ingber, D. E. (2002). "Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation." *Differentiation* **70**(9-10): 547-560.

Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* **67**: 609-652.

Iozzo, R. V. and L. Schaefer (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." *Matrix Biol* **42**: 11-55.

Iwatsuki, M., K. Mimori, T. Yokobori, H. Ishi, T. Beppu, S. Nakamori, H. Baba and M. Mori (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance." *Cancer Sci* **101**(2): 293-299.

Jarvelainen, H., A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight and R. Penttinen (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." *Pharmacol*

Rev **61**(2): 198-223.

Jedrzejas, M. J. and R. Stern (2005). "Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis." *Proteins* **61**(2): 227-238.

Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward (2010). "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* **60**(5): 277-300.

Junker, N., S. Latini, L. N. Petersen and P. E. Kristjansen (2003). "Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines." *Oncol Rep* **10**(3): 609-616.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* **119**(6): 1420-1428.

Kemler, R. (1993). "From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion." *Trends Genet* **9**(9): 317-321.

Kim, J. B., S. Islam, Y. J. Kim, R. S. Prudoff, K. M. Sass, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (2000). "N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility." *J Cell Biol* **151**(6): 1193-1206.

Knudson, W. (1996). "Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion." *Am J Pathol* **148**(6): 1721-1726.

Knudson, W., E. Bartnik and C. B. Knudson (1993). "Assembly of pericellular matrices by COS-7 cells transfected with CD44 lymphocyte-homing receptor genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4003-4007.

Kudo-Saito, C., H. Shirako, T. Takeuchi and Y. Kawakami (2009). "Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells." *Cancer Cell* **15**(3): 195-206.

LeBleu, V. S., B. Macdonald and R. Kalluri (2007). "Structure and function of basement membranes." *Exp Biol Med (Maywood)* **232**(9): 1121-1129.

Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." *J Cell Biol* **172**(7): 973-981.

Lee, K. and C. M. Nelson (2012). "New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis." *Int Rev Cell Mol Biol* **294**: 171-221.

Lepperdinger, G., J. Mullegger and G. Kreil (2001). "Hyal2--less active, but more versatile?" *Matrix Biol* **20**(8): 509-514.

Li, J. et al. (2013) Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 23586–23596

- Lokeshwar**, V. B., W. H. Cerwinka, T. Isoyama and B. L. Lokeshwar (2005). "HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor." *Cancer Res* **65**(17): 7782-7789.
- Lokeshwar**, V. B., D. Rubinowicz, G. L. Schroeder, E. Forgacs, J. D. Minna, N. L. Block, M. Nadji and B. L. Lokeshwar (2001). "Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer." *J Biol Chem* **276**(15): 11922-11932.
- Lokeshwar**, V. B., G. L. Schroeder, R. I. Carey, M. S. Soloway and N. Iida (2002). "Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing." *J Biol Chem* **277**(37): 33654-33663.
- Lokeshwar**, V. B. and M. G. Selzer (2008). "Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor." *Semin Cancer Biol* **18**(4): 281-287.
- Lu**, P., V. M. Weaver and Z. Werb (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression." *J Cell Biol* **196**(4): 395-406.
- Madan**, A. K., K. Yu, N. Dhurandhar, C. Cullinane, Y. Pang and D. J. Beech (1999). "Association of hyaluronidase and breast adenocarcinoma invasiveness." *Oncol Rep* **6**(3): 607-609.
- Markovic-Housley**, Z., G. Miglierini, L. Soldatova, P. J. Rizkallah, U. Muller and T. Schirmer (2000). "Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom." *Structure* **8**(10): 1025-1035.
- Meyer**, K. and M. M. Rapport (1952). "Hyaluronidases." *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **13**: 199-236.
- Meyer**, M. F., G. Kreil and H. Aschauer (1997). "The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme." *FEBS Lett* **413**(2): 385-388.
- Michael**, A., S. D. Bajracharya, P. S. Yuen, H. Zhou, R. A. Star, G. G. Illei and I. Alevizos (2010). "Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers." *Oral Dis* **16**(1): 34-38.
- Moody**, S. E., D. Perez, T. C. Pan, C. J. Sarkisian, C. P. Portocarrero, C. J. Sterner, K. L. Notorfrancesco, R. D. Cardiff and L. A. Chodosh (2005). "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence." *Cancer Cell* **8**(3): 197-209.
- Montecalvo**, A. et al. (2012) Mechanism of transfer and functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **119**, 756–766
- Muralidharan-Chari**, V. et al. (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* **123**, 1603–1611

Murphy, G., C. G. McAlpine, C. T. Poll and J. J. Reynolds (1985). "Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen." *Biochim Biophys Acta* **831**(1): 49-58.

Nagase, H. (2001). "Metalloproteases." *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**: Unit 21
Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." *J Biol Chem* **274**(31): 21491-21494.

Nicoll, S. B., O. Barak, A. B. Csoka, R. S. Bhatnagar and R. Stern (2002). "Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(4): 819-825.

Novak, U., S. S. Styli, A. H. Kaye and G. Lepperdinger (1999). "Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells." *Cancer Res* **59**(24): 6246-6250.

Oettl, M., J. Hoechstetter, I. Asen, G. Bernhardt and A. Buschauer (2003). "Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations." *Eur J Pharm Sci* **18**(3-4): 267-277.

Patterson, M. L., S. J. Atkinson, V. Knauper and G. Murphy (2001). "Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain." *FEBS Lett* **503**(2-3): 158-162.

Pereira, L. H., I. N. Adebisi, A. Perez, M. Wiebel, I. Reis, R. Duncan, W. J. Goodwin, J. J. Hu, V. B. Lokeshwar and E. J. Franzmann (2011). "Salivary markers and risk factor data: a multivariate modeling approach for head and neck squamous cell carcinoma detection." *Cancer Biomark* **10**(5): 241-249.

Posey, J. T., M. S. Soloway, S. Ekici, M. Sofer, F. Civantos, R. C. Duncan and V. B. Lokeshwar (2003). "Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer." *Cancer Res* **63**(10): 2638-2644.

Principe, S., A. B. Hui, J. Bruce, A. Sinha, F. F. Liu and T. Kislinger (2013). "Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery." *Proteomics* **13**(10-11): 1608-1623.

Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383

Rai, S. K., F. M. Duh, V. Vigdorovich, A. Danilkovitch-Miagkova, M. I. Lerman and A. D. Miller (2001). "Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4443-4448.

Schaefer, L. and R. M. Schaefer (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." *Cell Tissue Res* **339**(1): 237-246.

Shuttleworth, T. L., M. D. Wilson, B. A. Wicklow, J. A. Wilkins and B. L. Triggs-Raine (2002). "Characterization of the murine hyaluronidase gene region reveals complex organization and cotranscription of Hyal1 with downstream genes, Fus2 and Hyal3." *J Biol Chem* **277**(25): 23008-23018.

Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, Jr., B. S. Carter, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." *Nat Cell Biol* **10**(12): 1470-1476.

Stasiak, M., J. Boncela, C. Perreau, K. Karamanou, A. Chatron-Colliet, I. Proult, P. Przygodzka, S. Chakravarti, F. X. Maquart, M. A. Kowalska, Y. Wegrowski and S. Brezillon (2016). "Lumican Inhibits SNAIL-Induced Melanoma Cell Migration Specifically by Blocking MMP-14 Activity." *PLoS One* **11**(3): e0150226.

Stern, R. (2003). "Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?" *Glycobiology* **13**(12): 105R-115R.

Stern, R. (2005). "Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology." *Pathol Biol (Paris)* **53**(7): 372-382.

Stern, R. (2008). "Hyaluronidases in cancer biology." *Semin Cancer Biol* **18**(4): 275-280.

Stern, R. and M. J. Jedrzejewski (2006). "Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action." *Chem Rev* **106**(3): 818-839.

Skinner, A.M. et al. (2009) Cellular microvesicle pathways can be targeted to transfer genetic information between non-immune cells. *PLoS ONE* 4, e6219

Soldevilla, B. et al. (2014) Tumor-derived exosomes are enriched in DNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum. Mol. Genet.* 23, 467–478

Sugimachi, K., S. Tanaka, T. Kameyama, K. Taguchi, S. Aishima, M. Shimada, K. Sugimachi and M. Tsuneyoshi (2003). "Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma." *Clin Cancer Res* **9**(7): 2657-2664.

Takeichi, M. (1995). "Morphogenetic roles of classic cadherins." *Curr Opin Cell Biol* **7**(5): 619-627.

Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **110**(1): 13-21.

- Tepass, U., K. Truong, D. Godt, M. Ikura and M. Peifer (2000).** "Cadherins in embryonic and neural morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(2): 91-100.
- Theocharis, A. D., S. S. Skandalis, C. Gialeli and N. K. Karamanos (2016).** "Extracellular matrix structure." *Adv Drug Deliv Rev* **97**: 4-27.
- Theocharis, A. D., S. S. Skandalis, G. N. Tzanakakis and N. K. Karamanos (2010).** "Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting." *FEBS J* **277**(19): 3904-3923.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994).** "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* **22**(22): 4673-4680.
- Triggs-Raine, B., T. J. Salo, H. Zhang, B. A. Wicklow and M. R. Natowicz (1999).** "Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6296-6300.
- Vigdorovich, V., A. D. Miller and R. K. Strong (2007).** "Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus." *J Virol* **81**(7): 3124-3129.
- Visse, R. and H. Nagase (2003).** "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* **92**(8): 827-839.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers and F. van Roy (1991).** "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." *Cell* **66**(1): 107-119.
- Vlodavsky, I., R. V. Iozzo and R. D. Sanderson (2013).** "Heparanase: multiple functions in inflammation, diabetes and atherosclerosis." *Matrix Biol* **32**(5): 220-222.
- Wei, M. H., F. Latif, S. Bader, V. Kashuba, J. Y. Chen, F. M. Duh, Y. Sekido, C. C. Lee, L. Geil, I. Kuzmin, E. Zbarovsky, G. Klein, B. Zbar, J. D. Minna and M. I. Lerman (1996).** "Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG." *Cancer Res* **56**(7): 1487-1492.
- West, D. C., I. N. Hampson, F. Arnold and S. Kumar (1985).** "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid." *Science* **228**(4705): 1324-1326.
- Winter, W. T., P. J. Smith and S. Arnott (1975).** "Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold

helical forms." J Mol Biol **99**(2): 219-235.

Yang, Z., X. Zhang, H. Gang, X. Li, Z. Li, T. Wang, J. Han, T. Luo, F. Wen and X. Wu (2007). "Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression." Biochem Biophys Res Commun **358**(3): 925-930.

Zacchigna, S., L. Zentilin, M. Morini, R. Dell'Eva, D. M. Noonan, A. Albini and M. Giacca (2004). "AAV-mediated gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 inhibits vascular tumor growth and angiogenesis in vivo." Cancer Gene Ther **11**(1): 73-80.

Zhang, H. and P. A. Martin-DeLeon (2003). "Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract." Biol Reprod **69**(2): 446-454.

Zhang, L., C. B. Underhill and L. Chen (1995). "Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior." Cancer Res **55**(2): 428-433.

Zhou, H., A. Cheruvanky, X. Hu, T. Matsumoto, N. Hiramatsu, M. E. Cho, A. Berger, A. Leelahavanichkul, K. Doi, L. S. Chawla, G. G. Illei, J. B. Kopp, J. E. Balow, H. A. Austin, 3rd, P. S. Yuen and R. A. Star (2008). "Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease." Kidney Int **74**(5): 613-621.