

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αντικαρκινική δράση των συνθετικών αναλόγων ιντιρουπίνης 6-bromoindirubin-3'oxime και 7-bromoindirubin-3'-oxime σε καρκινικά κύτταρα μαστού, προστάτη και οστεοσαρκώματος

> ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ Δεκέμβριος 2012

Σύνθεση εξεταστικής επιτροπής

Εσωτερικά Μέλη:

Καθηγητής Ανδρέας Κωνσταντίνου, (Ερευνητικός Σύμβουλος) Καθηγητής Κωνσταντίνος Δέλτας, (Πρόεδρος Επιτροπής) Επίκουρος Καθηγητής, Παντελής Γεωργιάδης

Εξωτερικά Μέλη:

Αναπληρωτής Καθηγητής, Θεόδωρος Τζαβάρας Επίκουρος Καθηγητής, Ιωάννης Π. Τρουγκάκος

Στον Πατέρα μου

Ευχαριστίες

Με το τέλος της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Ανδρέα Κωνσταντίνου για την πολυετή συνεργασία μας, τις συμβουλές και ευκαιρίες που μου έχει δώσει και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου. Στην συνέχεια ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, Καθ. Κωνσταντίνο Δέλτα, Επίκουρο Καθηγητή Παντελή Γεωργιάδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Θεόδωρο Τζαβάρα και Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Π. Τρουγκάκο. Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανδρέα Ευδοκίου, και τα μέλη του εργαστηρίου του στο Royal hospital, University of Adelaide, στην Αυστραλία, για την πολύτιμη βοήθεια, φιλοξενία και παραχώρηση του εργαστηρίου του με σκοπό την ολοκλήρωση σημαντικών πειραμάτων που περιλαμβάνονται στην παρούσα διατριβή. Επίσης ευχαριστώ τον Δρ Αλέξανδρο Λέανδρο Σκαλτσούνη για την σύνθεση των υπό μελέτη ουσιών 6-BromoIndirubin-3'-Oxime (6BIO) και 7-BromoIndirubin-3'-Oxime (7BIO) όπως επίσης την Δρ Ουρανία Τσιν διάρκεια των σπουδών μου.

Τα μέλη του εργαστηρίου μου, Βιολογίας Καρκίνου και Χημειοπροφύλαξης όπως επίσης και τους συμφοιτητές μου, του τμήματος Βιολογικών επιστήμων για τις στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί, την συνεργασία και την φιλία που αναπτύχτηκε μεταξύ μας,

Θα θελα να ευχαριστήσω από τα βαθύ της καρδίας μου την υπέροχη οικογένεια μου, τον σύζυγο μου όπως επίσης και το μικρό μας αγοράκι που αναμένουμε να έρθει για την απέραντη αγάπη τους, την συμπαράσταση τους και την κατανόηση τους όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος αφιερώνω την διατριβή μου στον πατέρα μου που πάντα με συμβούλευε και μου έδινε θάρρος να βάζω στόχους στην ζωή μου και να τους ολοκληρώνω. Αν και έφυγε πλέον από κοντά μου τον έχω πάντα μέσα στην καρδιά μου και εύχομαι να τον έχω κάνει περήφανο.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	14
Καρκίνος	14
Απόπτωση και καρκίνος	16
Εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης	18
Ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης	19
Ανεξάρτητο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι	20
Αποπτωτικά μόρια	22
TRAIL	23
Apomab	25
Κυτταρικός κύκλος	26
Μετάσταση	33
Μεταλλοπρωτεϊνάσες	35
Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου	37
Ιντικοειδή	42
Επιστημονική υπόθεση και ειδικοί στόγοι της διατριβής	49
Υλικά και μέθοδοι	52
Κρυοδιατήρηση	52
Κυτταροκαλλιέργεια	52
Μέτρηση κυττάρων	53
Μέτρηση βιωσιμότητας των κυττάρων	53
Μέθοδος ΜΤΤ	53
Μέθοδος με χρήση της χρωστικής κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet)	54
Χρώση με DAPI	54
Ποσοτική μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας της κασπάσης-3	55
ELISA για την ανίχνευση κυτταρικού θανάτου	56
Εκτίμηση της απόπτωσης με τη μέθοδο Tali TM	57
Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου	57
Ανοσοδοκιμασία Western Blot	57
Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών:	57
Ηλεκτροφόρηση και μεταφορά πρωτεϊνών:	58
Ανοσοεντοπισμός και Ανοσοεμφάνιση:	58
Δοκιμασία διείσδυσης (Invasion assay)	59
Δοκιμασία ενεργότητας του uPA (uPA activity assay)	59
Κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου (DRs) στην	
επιφάνεια καρκινικών κυττάρων	60
In vivo πειραματικές μελέτες χρησιμοποιώντας στο πειραματικό μοντέλο ενοφθαλμισμο	νύ
καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό του μαστού ποντικού (mammary fat pat mouse	
model)	61
Μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό μαστού ποντικού	61
Στατιστικές προσεγγίσεις:	62
Αποτελέσματα	63
Καρκίνος του προστάτη	63
3.1. Τα 6BIO και 7BIO προκαλούν μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των	
καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3, LNCaP και DU145.	63

3.2. Τα 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ καθώς και οι συνδυασμοί τους με TRAIL και Apomab επάγ	νυυν
αποπτωτικά χαρακτηριστικά στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη.	74
3.3. Η επώαση με τις υπο μελέτη ουσίες προκαλεί ενεργοποίηση πρωτεϊνών σημαν	τικών
στην διαδικασία της απόπτωσης.	78
3.4. Προσδιορισμός της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου στις καρκινικές σειρές προστάτη	του 83
3.5 Κατασταλτική δράση του 6ΒΙΟ αλλά όχι του 7ΒΙΟ στη διεισδυτική ικανότητα τ	ων
καρκινικών κυττάρων του προστάτη και σε επαγωγικούς παράγοντες της μετάστασ	ης 85
Ενότητα 4: Καρκίνος του μαστού	88
4.1 Αντιπολλαπλασιαστική δράση των ιντικοειδών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε καρκινικά	
κύτταρα μαστού	88
4.2 Τα 6BIO και 7BIO δρουν αποπτωτικά στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231-TX	ζSΑ
	91
4.3 Επίδραση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης και του	
κυτταρικού κύκλου	95
4.3 Αντιπολλαπλασιαστική δράση του 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε ανθεκτικά στο Apomab	
καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA-R	100
4.4 Ο συνδυασμός του 6BIO με το Apomab επάγει το εξαρτώμενο από τις κασπάσ	ες
αποπτωτικό μονοπάτι στα ανθεκτικά στο Apomab MDA-MB-231-TXSA-R κύτταρ	α 103
5.1 Αντιπολλαπλασιαστική δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα κύτταρα οστεοσαρκώματο	ς
KHOS	106
5.2 Τα 6BIO και 7BIO δεν παρουσιάζουν σημαντική αποπτωτική δράση στην καρκ	ινική
σειρά KHOS	106
5.3 Επίδραση των 6BIO και 7BIO σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης και του	ა
κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα KHOS	110
6.1 Δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO στο in vivo πειραματικό μοντέλο ενοφθαλμισμ	ιού
καρκινικών κυττάρων στον λιπώδη ιστό μαστού ποντικών	114
	110

Συζήτηση

Κατάλογος γραφικών παραστάσεων

Σχήμα 1.1: Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO, 7BIO, TRAIL και Apomab και των συνδυασμών αυτών, στην προστατική καρκινική σειρά PC3.

Σχήμα 1.2: Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6ΒΙΟ, 7ΒΙΟ, TRAIL και Apomab και των συνδυασμών αυτών, στην προστατική καρκινική σειρά LNCaP.

Σχήμα 1.3: Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO, 7BIO, TRAIL και Apomab και των συνδυασμών αυτών, στην προστατική καρκινική σειρά DU145.

Σχήμα 2.1.1: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στον πολλαπλασιασμό των PC3 κυττάρων

Σχήμα 2.1.2: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στον πολλαπλασιασμό των PC3 κυττάρων.

Σχήμα 3.1.1: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στον πολλαπλασιασμό των LNCaP κυττάρων.

Σχήμα 3.1.2: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στον πολλαπλασιασμό των LNCaP κυττάρων

Σχήμα 4.1.1: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στον πολλαπλασιασμό των DU145 κυττάρων.

Σχήμα 4.1.2: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στον πολλαπλασιασμό των DU145 κυττάρων.

Σχήμα 5.1: Χρώση φθορισμού DAPI σε PC3 κύτταρα.

Σχήμα 5.2: Χρώση φθορισμού DAPI σε LNCaP κύτταρα.

Σχήμα 5.3: Χρώση φθορισμού DAPI σε DU145 κύτταρα.

Σχήμα 6.1: Ανάλυση κατά Western για την ανίχνευση πρωτεϊνών της απόπτωσης σε PC3 κύτταρα και προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3.

Σχήμα 6.2: Western blot ανάλυση για την ανίχνευση πρωτεϊνών της απόπτωσης σε LNCaP κύτταρα και προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3.

Σχήμα 6.3: Western blot ανάλυση για την ανίχνευση πρωτεϊνών της απόπτωσης σε DU145 κύτταρα και προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3.

Σχήμα 7: Προσδιορισμός της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου (DRs), στα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145, LNCaP και PC3 με την χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Σχήμα 8.1: Δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων DU145 και PC3

Σχήμα 8.2: Δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην ενεργότητα της πρωτεάση uPA στα κύτταρα PC3 και DU145.

Σχήμα 9: Δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 (A), ZR75(B), MDA-MB-231(Γ), MDA-MB-468 (Δ) και MDA-MB-231-TXSA (Ε).

Σχήμα 10: Δράση του 6BIO (15 μM) και 7BIO (15 μM) στην απόπτωση και ενεργότητα της κασπάσης-3 στα MDA-MB-231-TXSA καρκινικά κύτταρα.

Σχήμα 11: Δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην βιωσιμότητα των κυττάρων (A) MDA-MB-231-TXSA μετά την προσθήκη του αναστολέα κασπασών Z-VAD (OMe)-FMK (B) Χρώση φθορισμού DAPI

Σχήμα 12: Δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε πρωτεΐνες-κλειδιά του αποπτωτικού μονοπατιού και του κυτταρικού κύκλου.

Σχήμα 12: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των σχημάτων 11Α και 11Β μετά την επώαση των MDA-MB-231-TXSA με 6ΒΙΟ (Γ) και 7ΒΙΟ (Δ)

Σχήμα 13: Επίδραση του 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στο Apomab TXSA-R κυττάρων.

Σχήμα 14: Προσδιορισμός της δράσης του συνδυασμού των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ με το Apomab στην ενεργότητα της κασπάσης-3 στα TXSA-R κύτταρα.

Σχήμα 15: Δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO σε συνδυασμό με το Apomab σε πρωτεΐνεςκλειδιά του αποπτωτικού μονοπατιού και του κυτταρικού κύκλου.

Σχήμα 16: (A) Δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων KHOS.

Σχήμα 17: Προσδιορισμός της δράσης του 6ΒΙΟ (15 μΜ) και 7ΒΙΟ (15 μΜ) στην απόπτωση κυττάρων οστεοσαρκώματος KHOS.

Σχήμα 18: Δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε πρωτεΐνες κλειδιά του αποπτωτικού μονοπατιού και του κυτταρικού κύκλου.

Σχήμα 19: (A) Η γονιδιακή κατασκευή (Triple reporter retroviral gene construct NES-TGL). και (B) Προσδιορισμός της *in vivo* αντικαρκινικής και αντιμεταστατικής δράσης των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στο μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στον λιπώδη ιστό μαστού ποντικών. Σχήμα 20: Προσδιορισμός της in vivo αντικαρκινικής και αντιμεταστατικής δράσης των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στο μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στον λιπώδη ιστό μαστού ποντικών.

Κατάλογος με πίνακες

Πίνακας 1: Τιμές IC₅₀ καρκινικών κυττάρων μαστού μετά την επώαση με 6BIO ή 7BIO Πίνακας 2: Δράση των 6BIO και 7BIO στον κυτταρικό κύκλο των MDA-MB-231-TXSA κυττάρων.

Πίνακας 3: Δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στον κυτταρικό κύκλο των ΚΗΟS κυττάρων.

Συντμήσεις

6BIO	6-BromoIndirubin-3'-Oxime		
7BIO	7-BromoIndirubin-3'-Oxime		
Apo2L/TRAIL Apo2 ligand/ Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand			
Cas-3	Caspase-3		
Cas-8	Caspase-8		
Cas-9	Caspase-9		
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase		
GPDH	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase		
TNF	Tumor Necrosis Family/Factor		
DR	Death Receptor		
DR4	Death Receptor - 4/TRAIL-R1		
DR5	Death Receptor - 5/TRAIL-R2		
DcR1	Decoy Receptor - 1/TRAIL-R3		
DcR2	Decoy Receptor - 2/TRAIL-R4		
DISC	Death Inducing Signalling Complex		
Cyt c	Cytochrome c		
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins		
APAF-1	Apoptosis Protease Activating Factor-1		
AIF	Apoptosis Inducing Factor		
FADD	Fas Associated Death Domain protein		
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain protein		
CDK	Cyclin-Dependent Kinase protein		
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3		
GSK-3b	Glycogen Synthase Kinase-3-beta		
ECM:	Extracellular Matrix		
MMP:	Matrix Metalloproteinases		
uPA:	Urokinase type Plasminogen Activator system		
Mcl-1:	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)		
PDK1:	Phosphoinositide-Dependent kinase		

Περίληψη διδακτορικής διατριβής

Στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής επιχειρήθηκε μια επιστημονική προσέγγιση στη πρόληψη και θεραπεία των μεταστατικών καρκίνων του προστάτη, οστεοσαρκώματος και μαστού, χρησιμοποιώντας συνθετικά ανάλογα φυτικών ουσιών οι οποίες υπάγονται στην κατηγορία των ιντικοειδών και συγκεκριμένα της ουσίας ιντιρουπίνης. Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα συνθετικά ανάλογα της ιντιρουπίνης 6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) και 7-bromoindirubin-3'-oxime (7BIO), ουσίες με καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα και κυτταροτοξική δράση από την ιντιρουπίνη, καθώς και ισχυρότερη κατασταλτική δράση έναντι των κινασών CDK και GSK-3b. Η δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ μελετήθηκε σε in vitro καλλιέργειες κυττάρων καρκίνου του προστάτη DU145, PC3 και LNCaP, οστεοσαρκώματος KHOS και καρκίνου του μαστού MDA-MB-231-TXSA, που έχουν μεταστατικό χαρακτήρα εκφράζοντας πρωτεάσες, όπως σύμπλοκα του συστήματος του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (urokinase type plasminogen activator system, uPA). Υποθέτουμε ότι ένα ή περισσότερα ανάλογα της ιντιρουπίνης παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση, η οποία οφείλεται είτε στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ή στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε αυτά ή στην αναστολή της διείσδυσης και μετάστασής τους ή σε συνδυασμού αυτών των φαινομένων. Αρχικός στόχος της παρούσας διατριβής, ήταν ο προσδιορισμός βελτιωμένης αντικαρκινικής δράσης των 6BIO και 7BIO, στα υπό μελέτη καρκινικά κύτταρα σε σχέση με το πατρικό μόριο, την ιντιρουπίνη. Στην συνέχεια μελετήθηκε ο επαγόμενος από τις ουσίες αυτές αποπτωτικός μηχανισμός και η συνδυασμένη δράση των ουσιών με άλλους αποπτωτικούς παράγοντες όπως είναι το Apomab και το TRAIL στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, με σκοπό την ενίσχυση της αντικαρκινικής τους ιδιότητας. Οι 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ μελετήθηκαν και για τη δράση τους σε παράγοντες που ευνοούν τη μετάσταση, όπως στην ενεργότητα του uPA και στη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων. Η αντι-καρκινική και αντι-μεταστατική δραστικότητα των 6BIO και 7BIO εξετάστηκε και in vivo, σε μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό μαστού ποντικού. Τα αποτελέσματά μας απέδειξαν ότι οι ουσίες 6BIO και 7BIO παρουσιάζουν ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση στα καρκινικά κύτταρα που μελετήθηκαν, ενεργοποιώντας διαφορετικά μονοπάτια ανάλογα με την κυτταρική σειρά στην οποία δρουν. Συγκεκριμένα, στα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα το 6BIO επάγει απόπτωση ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι ενώ το 7BIO καταστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G2 και στην

συνέχεια επάγει απόπτωση ενεργοποιώντας κυρίως το ανεξάρτητο από κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Επίσης οι ουσίες μας επαναφέρουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων μαστού τα οποία είναι ανθεκτικά στο αποπτωτικό αντίσωμα Apomab, επάγοντας απόπτωση. Η αντικαρκινική δράση των 6BIO και 7BIO ενισχύεται μετά τον συνδυασμό τους με τους παράγοντες TRAIL και Apomab στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη ενεργοποιώντας το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι. Επίσης το 6BIO αλλά όχι το 7BIO καταστέλει την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων, όπως επίσης και την ενεργότητα της μεταστατικής πρωτεάσης uPA. Τέλος *in vivo* και οι δύο ουσίες μειώνουν την εξέλιξη του όγκου. Το 6BIO παρουσιάζει αντιμεταστατικές ιδιότητες μειώνοντας το ποσοστό των μεταναστευμένων

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής, αποδείξαμε ότι οι 6BIO και 7BIO αποτελούν βελτιωμένα ανάλογα της ιντιρουπίνης με σημαντική *in vitro* και *in vivo* δραστικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων μαστού, προστάτη και οστεοσαρκώματος που ίσως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον, μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλους γνωστούς αντικαρκινικούς παράγοντες, ως αντικαρκινικά φαρμακευτικά σκευάσματα με αντιμεταστατικό δυναμικό.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate and compare the anti-cancer properties of two novel bromo-substituted derivatives 6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) and 7bromoindirubin-3'-oxime (7BIO) which differ in the position of bromine in their chemical structure and have improved solubility compared to the parental compound; We investigated (1) the potency of the two compounds to induce apoptosis on several cancer cell lines including, prostate (DU145, PC3), osteosarcoma (KHOS) and breast cancer cells (MCF-7, ZR75, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-231-TXSA) and (2) the effect of the two compounds on metastatic parameters such as the activity of proteolytic enzymes and the invasive ability of these cell lines. We found that the highly metastatic MDA-MB-231-TXSA cells were the most sensitive to the anti-proliferative effects of both derivatives. Both, 6BIO and 7BIO, induced apoptosis as determined by the cell death ELISA assay. However, 6BIO produced substantial increase in caspase's activity and Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage compared to marginal increases produced by 7BIO. Furthermore, a pancaspase inhibitor [Z-VAD (OMe)-FMK] significantly reduced the level of apoptosis induced by 6BIO, while reducing only marginally the apoptotic effect of 7BIO. These results demonstrate that 6BIO triggers cell death via activation of the classical caspase-dependent pathway of apoptosis and 7BIO via the activation of caspase independent dominant pathway. The incubation of MDA-MB-231-TXSA cells with 7BIO also induced the up-regulation of p53 and p21 which was associated with a G₂/M cell cycle arrest that preceded the induction of apoptosis. Furthermore, MDA-MB-231-TXSA cells resistant to Apomab were found to be responsive to the apoptotic effects of the above compounds. DU145, PC3 and KHOS cells were the most sensitive to the anti-metastatic and anti-invasive effect of 6BIO as determined by the uPA activity assay and by the use of Boyden Chambers, respectively. Similarly to amyloride, a uPA inhibitor, 6BIO (but not 7BIO) reduced uPA activity. In agreement with this, 6BIO (but not 7BIO) reduced substantially the invasive ability of these cells. Taken together our results show that, (1) both compounds induce apoptotic effects through different molecular pathways, and (2) 6BIO only exhibit anti-metastatic and anti-invasive properties. These differences in the mechanism of action between the two derivatives may prove useful in combination chemotherapy protocols for the treatment of cancer.

Εισαγωγή

Καρκίνος

Ως καρκινογένεση ορίζεται ο υπέρμετρος και ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μεταλλαγμένων/εξαλλαγμένων κυττάρων. Στα καρκινικά κύτταρα ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA και ο μηχανισμός άμυνας του κυττάρου έναντι της δράσης μεταλλαξογόνων παραγόντων υπολειτουργούν. Παρατηρούνται μεταβολές στη σύσταση και οργάνωση του κυτταροσκελετού, αυξημένος μεταβολισμός, σχηματισμός κυτταρικών στιβάδων και μεταβολές στο τρόπο μεταγωγής σήματος. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται με την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων στους μεμβρανικούς υποδοχείς βρίσκονται σε μία κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης. Η καρκινογένεση αποτελείται από (α) την Έναρξη, δηλαδή την μετάλλαξη ενός κυττάρου, (β) την Προαγωγή, που επάγει τον πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου μεταλλαγμένου κυττάρου δημιουργώντας μια στιβάδα κυττάρων με την ίδια μετάλλαξη (όγκος) και (γ) την Ανάπτυξη και μετατροπή του όγκου σε κακοήθεια αποκτώντας επιπλέον μεταλλαγές και ιδιότητες που τον καθιστούν επιθετικό, διεισδυτικό και μεταστατικό. Στην συνέχεια θα αναφερθούμε στον καρκίνο του μαστού, προστάτη και οστεοσάρκωμα, που αποτελούν τις τρείς μορφές καρκίνου που μελετήθηκαν στη παρούσα διατριβή. Στην Αμερική αναμένονται κατά το 2012 πάνω από 1,5 εκ. νέα περιστατικά καρκίνου, με ένα στους τέσσερις θανάτους να οφείλεται στον καρκίνο (Siegel, Naishadham, & Jemal). Ο καρκίνος του προστάτη αναπτύσσεται σε μία περίοδο 20-30 ετών και 5-10% των περιπτώσεων πιστεύεται ότι οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες που καθιστούν τον ασθενή πιο ευάλωτο στην ογκογένεση (Carter et al., 1993). Αποτελεί έναν από τους τέσσερις πιο συγνούς τύπους καρκίνου μεταξύ των αντρών στην Αμερική, και αποτελεί το 29% όλων των νέων περιστατικών εμφάνισης καρκίνου (Siegel, et al.). Επιπλέον, αποτελεί το δεύτερο συχνότερο τύπο καρκίνου που προκαλεί θάνατο σε άντρες (Etzioni et al., 2008). Παράλληλα, και στην Ευρώπη ο καρκίνος του προστάτη συνεχίζει να κατέχει την πρώτη θέση όσον αφορά τον συχνότερο τύπο καρκίνου που διαγιγνώσκεται στους άντρες, με τα περιστατικά να φτάνουν τα 382.000 κατά το έτος 2008 (Ferlay, Parkin, & Steliarova-Foucher). Σύμφωνα με το Ινστιτούτο Έρευνας για τον Καρκίνο (Cancer Research Institute SAS, Slovak Academy of Sciences), τα περιστατικά αυξήθηκαν δραματικά την περίοδο 1995-2008, και μάλιστα στο διάστημα αυτό σχεδόν διπλασιάστηκαν. Το γεγονός

αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην έγκαιρη διάγνωση με την μέτρηση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (Prostate-Specific Antigen, PSA) σε άντρες μεγαλύτερης ηλικίας. Ωστόσο, η θνησιμότητα παρουσιάζει φθίνουσα τάση η οποία σχετίζεται πιθανόν με τη βελτιωμένη έκβαση της νόσου μετά από την έγκαιρη διάγνωση (Kvale et al., 2007). Τέλος, στη Κύπρο, ο αριθμός των νέων περιστατικών το έτος 2008 ξεπερνά τα 300, αποτελώντας σχεδόν το 8% όλων των νέων περιστατικών εμφάνισης καρκίνου (Ferlay, et al.).

Το οστεοσάρκωμα, αποτελεί τον κυριότερο τύπο καρκίνου των οστών στα παιδιά και στους ενήλικες (Bramwell, 2000). Η πρώτη γραμμή αντιμετώπισης είναι η χημειοθεραπεία, όμως ανεξάρτητα με τη σημαντική βελτίωση πολλών ασθενών, κάποιες ομάδες ασθενών παρουσιάζουν μεταστάσεις, ιδιαίτερα οστεολυτικό καρκίνο των οστών και μετάσταση στους πνεύμονες. Ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου στις γυναίκες του Δυτικού κόσμου, με συχνότητα εμφάνισης περίπου 1 στις 11 γυναίκες (Devita). Ο θάνατος επέρχεται μετά από μετάσταση των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα όργανα, αλλά κυρίως στα οστά όπου ο καρκίνος εφίσταται στο 44-71% των περιπτώσεων. Σύμφωνα με το Αμερικανική Εταιρεία για τον Καρκίνο (American Cancer Society), ο καρκίνος του προστάτη και του μαστού αποτελούν τις συχνότερες μορφές καρκίνου και αναμένεται, για το 2012, να παρουσιαστούν 241.740 νέα περιστατικά καρκίνου του προστάτη και 226.870 νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Στατιστική μελέτη της Αμερικανικής Εταιρείας για τον Καρκίνο με τις πιο συχνές μορφές καρκίνου σε άντρες και γυναίκες που αναμένεται να εμφανιστούν το 2012. Ο

καρκίνος του προστάτη και του μαστού αποτελούν οι συχνότερες μορφές καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα και τη δεύτερη αιτία θανάτου (American Cancer Society).

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων είναι σημαντικό να διατηρείται η ομοιόσταση και επιπλέον να απομακρύνονται τα μεταλλαγμένα κύτταρα. Για τη διατήρηση των συνθηκών αυτών είναι απαραίτητος ο προγραμματισμένος θάνατος των κυττάρων, που διαχωρίζεται σε απόπτωση, νέκρωση, αυτοφαγία, μιτωτική καταστροφή, παράπτωση και αργό θάνατο. Ο τύπος κυτταρικού θανάτου που ακολουθείται αναγνωρίζεται από τις μορφολογικές αλλαγές που προκαλούνται στα κύτταρα, καθώς επίσης και από τη συμμετοχή/ενεργοποίηση διαφορετικών κασπασών στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Kroemer et al., 2009). Διάφορες ασθένειες, όπως νευροεκφυλιστικές διαταραχές (neurodegenerative disorders) και κακοήθειες, έχουν συνδεθεί με ανωμαλίες κατά την διαδικασία της απόπτωσης (Thompson, 1995).

Απόπτωση και καρκίνος

Ο Kerr το 1972, εισήγαγε την ιδέα ότι η αναστολή της απόπτωσης σχετίζεται με την εμφάνιση κακοηθειών (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Η απόπτωση είναι μια αυστηρά ρυθμισμένη διαδικασία, που απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και σκοπό έχει την απομάκρυνση κυττάρων με επιβλαβείς μεταλλάξεις στο DNA, με απώτερο στόχο την καταστολή του υπέρμετρου και ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού που οδηγεί στην καρκινογένεση. Επίσης συμμετέχει στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτελεί μηχανισμό άμυνας έναντι κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες λόγω υποκείμενων ασθενειών ή άλλων εξωγενών παραγόντων (Norbury & Hickson, 2001).

Η απόπτωση περιλαμβάνει αρκετές μορφολογικές αλλαγές, όπως συρρίκνωση του κυττάρου, συμπύκνωση της χρωματίνης, κατακερματισμό της πυρηνικής μεμβράνης (Kerr, Winterford, & Harmon, 1994; Kerr, et al., 1972; Wyllie, Kerr, & Currie, 1980) και τέλος απομάκρυνση των αποπτωσωμάτων που δημιουργούνται με άμεση φαγοκυττάρωση από μακροφάγα ή από τα γειτονικά κύτταρα (Burz, Berindan-Neagoe, Balacescu, & Irimie, 2009; Savill & Fadok, 2000). Παρ' όλες τις μορφολογικές αλλαγές, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης παραμένει ανέπαφη, χωρίς να υφίσταται ρήξη (Kerr, et al., 1972; Savill & Fadok, 2000), επιτρέποντας την αποφυγή πρόκλησης φλεγμονής από την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών σε παρακείμενους ιστούς (Kurosaka, Takahashi, Watanabe, & Kobayashi, 2003; Savill & Fadok, 2000). Τα χαρακτηριστικά αυτά μας επιτρέπουν να

χαρακτηρίσουμε την απόπτωση σαν μια φυσιολογική διαδικασία κυτταρικού θανάτου (Cohen, 1993).

Πολλοί φυσιολογικοί και παθολογικοί παράγοντες σηματοδοτούν την ενεργοποίηση του αποπτωτικου μονοπατιού, όμως δεν επηρεάζονται όλα τα κύτταρα από αυτούς τους παράγοντες. Αυτό οφείλεται στη διαφοροποίηση των κυττάρων, δηλαδή στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζει κάθε είδος κυττάρου. Κάποια κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς Fas ή TNF που οδηγούν στην απόπτωση μέσω της πρόσδεσης του κατάλληλου συνδέτη, ενώ άλλα κύτταρα χρησιμοποιούν ορμόνες ή αυξητικούς παράγοντες ως σήματα που αποτρέπουν την απόπτωση, αναστέλλοντας συγκεκριμένα μονοπάτια.

Ανάλογα με το ερέθισμα, η απόπτωση μπορεί να συμβεί διαμέσου δύο μονοπατιών: (α) του εξωγενούς, το οποίο ονομάζεται και μονοπάτι υποδοχέα θανάτου, και (β) του ενδογενούς, το οποίο ονομάζεται και μιτοχονδριακό μονοπάτι (Elmore, 2007). Τα δύο μονοπάτια συνδέονται μεταξύ τους, αφού έχουν κάποια μόρια τα οποία αλληλοεπηρεάζονται (Igney & Krammer, 2002).

Σημαντικό ρόλο και στα δύο μονοπάτια παίζουν οι κασπάσες (caspases: cysteine-rich aspartate proteases) που είναι υπεύθυνες για την πρωτεόλυση των κυτταρικών συστατικών. Όλες οι κασπάσες εκφράζονται σαν προκασπάσες, δηλ. ανενεργά προένζυμα. Η ενεργοποίηση των κασπασών συμβαίνει διαμέσου της πρωτεόλυσης σε ασπαραγινικά κατάλοιπα που βρίσκονται στις πιο πάνω υπομονάδες (Alnemri et al., 1996) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των κασπασών. Οι εναρκτήριες κασπάσες έχουν μακριές περιοχές (prodomains) που ονομάζονται CARD ή DED, ενώ οι κασπάσες-τελεστές έχουν μικρότερες τέτοιες περιοχές (J. Li & Yuan, 2008). Μετά την ενεργοποίηση των κασπασών ξεκινά ένας καταρράκτης αντιδράσεων που οδηγεί προς τον κυτταρικό θάνατο. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 10 μέλη της οικογένειας των κασπασών τα οποία διαχωρίζονται σε εκκινητές (κασπάσες -2, -8, -9, -10), τελεστές (κασπάσες -3, -6, -7) και κασπάσες φλεγμονής (κασπάσες -1, -4, -5) (Alnemri, et al., 1996).

Εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης

Η ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού ξεκινά όταν συνδέτες (ligands) που απελευθερώνονται από άλλα κύτταρα διεγείρουν τους υποδοχείς θανάτου (death receptors) που βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων (Burz, et al., 2009) (Εικόνα 3). Οι υποδοχείς θανάτου ανήκουν στην οικογένεια TNF (Tumor Necrosis Family). Επί του παρόντος, οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι συνδέτες-υποδοχείς είναι οι TNF-α/TNFR1, FasL/Fas, Apo3L/DR3 (ή Apo3) (23), Apo2L/DR4 (ή TRAIL-R1) και Apo2L/DR5 (ή TRAIL-R2) (Ashkenazi & Dixit, 1998; Chicheportiche et al., 1997; Peter & Krammer, 1998; Rubio-Moscardo et al., 2005; Screaton et al., 1997; Suliman, Lam, Datta, & Srivastava, 2001). ME την δέσμευση των πρωτεϊνών προσαρμογέων (FADD, TRADD) στους υποδογείς, δημιουργείται ένα σύμπλεγμα το οποίο ονομάζεται σύμπλοκο που επάγει θάνατο μέσω σηματοδότησης (Death-Inducing Signalling Complex, DISC), με παράλληλη στρατολόγηση της προκασπάσης-8. Τα μόρια της προκασπάσης-8 μπορούν να αυτοενεργοποιηθούν και αυτό συμβαίνει μέχρις ότου οι προκασπάσες αποκτήσουν χαμηλή ενζυματική δράση, γεγονός που οδηγεί σε ένα καταρράχτη από ενεργοποιήσεις των τελεστών (executioner) κασπασών -3, -6, και -7 (Burz, et al., 2009). Η πορεία του εξωγενούς μονοπατιού εξαρτάται από τα επίπεδα του DISC και αναλόγως ενεργοποιείται το μονοπάτι τύπου Ι ή το μονοπάτι τύπου ΙΙ. Σε περιπτώσεις παραγωγής υψηλών επιπέδων DISC ακολουθείται το τύπου Ι μονοπάτι, ενώ σε αντίθετη περίπτωση το τύπου ΙΙ. Στο τύπου Ι μονοπάτι, αφού το επίπεδο παραγωγής DISC είναι υψηλό, η ενεργή κασπάση-8 είναι ικανή να ενεργοποιήσει την κασπάση-3 άμεσα, και να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση. Στο τύπου ΙΙ μονοπάτι, απαιτείται αρχικά η διάσπαση της πρωτεΐνης Bid, μέλος της Bcl-2 υπεροικογένειας, σε tBid (Ozoren & El-Deiry, 2002). Η υπεροικογένεια Bcl-2 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Η σημαντικότερη λειτουργία των μελών της είναι να ρυθμίζουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα μέλη της οικογένειας χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (α) τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-a και A1, (β) τις προ-αποπτωτικές, όπως η Bax και η Bad, και (γ) τις προ-αποπτωτικές BH3only, μόρια που μοιράζονται μόνο την ομόλογη περιοχή BH3. Αυτές οι πρωτεΐνες δρουν είτε επάγοντας τη δράση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών ή μέσω της πρόσδεσης και αναστολής των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της Bel-2 υπεροικογένειας. Η ενεργός λοιπόν μορφή tBid μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο, όπου προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-ς, γεγονός που ενεργοποιεί τις κασπάσες -9 και -3 και οδηγεί τελικά στη διάσπαση του

ενζύμου πολυ-ADP-ριβόζη πολυμεράσης (poly ADP-ribose polymerase, PARP) (Lawen, 2003).

Ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης

Η ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης επάγεται από σήματα που προέργονται από το εσωτερικό του κυττάρου, όπως το οξειδωτικό στρες ή βλάβες στο DNA, επίδραση ραδιενέργειας, τοξινών, ιικών σωματίων και απουσία αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτταροκινών, υπεύθυνων για την αναστολή της απόπτωσης (Εικόνα 3). Το ενδογενές μονοπάτι ρυθμίζεται από τα μέλη της Bcl-2 υπερ-οικογένειας πρωτεϊνών. Τα σήματα ενεργοποίησης μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγώντας στη διάνοιξη μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (MTP), απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού και απελευθέρωση δύο ομάδων αποπτωτικών πρωτεϊνών από τον διαμεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα (Saelens et al., 2004). Το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου επιτυγχάνεται με την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και τον επακόλουθο ολιγομερισμό της από τις πρωτεΐνες Bid και Bim. Αντίθετα τα αντι-αποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας παρεμποδίζουν τους πόρους της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το εξαρτώμενο από τις κασπάσες μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες κυτόχρωμα-ς, Smac/DIABLO (Second mitochondrial-derived activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Protein Binding Protein with Low Pi) kat Omi/HrtA2 (Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2) (Cai & Jones, 1998; Du, Fang, Li, Li, & Wang, 2000; Garrido et al., 2006). Ο σχηματισμός του αποπτωσώματος συμβαίνει όταν το κυτόχρωμα-ς δεσμεύεται με τον ενεργοποιητικό παράγοντα-1 πρωτεασών της απόπτωσης (Apoptosis Protease Activating Factor-1, APAF-1) και την προκασπάση-9 (Chinnaiyan, 1999). Το σύμπλοκο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, γεγονός που θα οδηγήσει στη μετέπειτα ενεργοποίηση των κασπάσεων -3, -6 και -7. Η ενεργή κασπάση-3 μπορεί να προκαλέσει στη συνέγεια διάσπαση του ενζύμου PARP, ώστε να αποτρέψει την ενεργοποίησή του που θα οδηγούσε στην επιδιόρθωση του DNA. Επιπλέον προώθηση της απόπτωσης συμβαίνει και διαμέσου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών Smac/DIABLO και Omi/HtrA2, που δρουν αναστέλλοντας τη δράση των πρωτεϊνώναναστολέων της απόπτωσης (Inhibitor of Apoptosis Proteins, IAPs) (Schimmer, 2004; van Loo et al., 2002).

Ανεξάρτητο από κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι

Κατά την διάρκεια της απόπτωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί και το ανεξάρτητο από τις κασπάσες μονοπάτι, όταν απελευθερωθούν από το μιτοχόνδριο πρωτεΐνες όπως ο επαγωγικός της απόπτωσης παράγοντας (Apoptosis Inducing Factor, AIF) και η ενδονουκλεάση G (Endo-G) και το ένζυμο DNAση ενεργοποιημένη από κασπάσες (Caspase Activated DNase, CAD) (Εικόνα 3) (Elmore, 2007). Ο AIF μετακινείται προς τον πυρήνα και προκαλεί κατακερματισμό του DNA σε κομμάτια μήκους 50-300 bp και συμπύκνωση της περιφερειακής πυρηνικής χρωματίνης, η οποία χαρακτηρίζεται ως συμπύκνωση σταδίου I (Joza et al., 2001; Susin et al., 2000). Ο τρόπος με τον οποίο ο AIF τέμνει το DNA δεν είναι ξεκάθαρος, θεωρείται όμως ότι δρα σαν ενδονουκλεάση ή στρατολογεί πρωτεάσες. Εμφανίζει δράση NADPH οξειδάσης (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase), έχοντας την ικανότητα να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH προς το μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου, τα οποία δρουν ως ελεύθερες ρίζες (Miramar et al., 2001). Η ενδονουκλεάση G, μετατοπίζεται και αυτή προς τον πυρήνα, κατακερματίζοντας το DNA και δημιουργώντας ολιγονουκλεοτίδια (L. Y. Li, Luo, & Wang, 2001).

Το ενδογενές και εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι ακολουθούν κοινό τελικό εκτελεστικό μονοπάτι της απόπτωσης κυρίως μέσω της κασπάσης-3, πρωτεολύοντας διάφορους στόχους συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης PARP.

Η PARP λειτουργεί ως επιδιορθωτής του DNA μέσω της κατάλυσης της πολυ-ADP ριβοζυλίωσης, πρόσδεσης στο DNA και τροποποίησης πυρηνικών πρωτεϊνών. Αυτή η δράση της PARP αποτρέπει την κατάτμηση του DNA από την κασπάση-3 (Slee & Lu, 2003). Η κατάτμηση του DNA επιτυγγάνεται με τη δράση του ενζύμου CAD, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει σε ανενεργή μορφή στο σύμπλεγμα του αναστολέα της CAD (inhibitor of CAD, ICAD). Κατά την απόπτωση, η κασπάση-3 τέμνει το ICAD, απελευθερώνοντας το CAD το οποίο στην συνέχεια κατατέμνει το DNA (Sakahira, Enari, & Nagata, 1998). Η κασπάση-3 επίσης δρα και στον κυτταροσκελετό, διασπώντας την πρωτεΐνη γκελσολίνη η οποία προάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Στα τελικά στάδια της απόπτωσης, με την διάσπαση της γκελσολίνης από την κασπάση-3, προκαλείται αποικοδόμιση της ακτίνης και αστάθεια του κυτταροσκελετού (Kothakota et al., 1997). Στην συνέχεια η φωσφατιδυλσερίνη, η οποία είναι ενσωματωμένη στο εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης, εκτίθεται στον εξωκυττάριο χώρο υποβοηθώντας την αναγνώριση του κυττάρου από τα φαγοκύτταρα (Fadok, de Cathelineau, Daleke, Henson, & Bratton, 2001).



Εικόνα 3: Η οδοί της απόπτωσης. Η απόπτωση μπορεί να συμβεί διαμέσου του εξωγενούς ή του ενδογενούς μονοπατιού. Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται από προ-αποπτωτικά σήματα που μεταφέρονται στο μιτοχόνδριο και οδηγούν σε διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ακολούθως απελευθερώνονται ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες όπως είναι το AIF, Endo-G και Smac/DIABLO. Στη συνέχεια το κυτόχρωμα c (cyt c) οδηγεί στη δημιουργία του αποπτωσώματος το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση-9, η οποία ενεργοποιεί την κασπάση-3. Οι AIF και το Endo-G λειτουργούν κατακερματίζοντας το DNA και προκαλούν τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Η απόπτωση διαμέσου του Smac/DIABLO προωθείται έμμεσα, με την παρεμπόδιση της δράσης των IAPs. Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται με σήματα που φθάνουν στους επιφανειακούς υποδοχείς και οδηγούν στην αυτοενεργοποίηση της κασπάση-8 (Bayir & Kagan, 2008).

Η δομή της PARP είναι συντηρημένη ανάμεσα στα είδη. Είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 116 kDa με τρεις διακριτές περιοχές, το Ν-τελικό άκρο που δεσμεύεται στο DNA (DNA-binding domain; 42 kDa) και εμπεριέχει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού, την κεντρική περιοχή (16 kDa) και την C-τελική καταλυτική περιοχή (55 kDa) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Δομή της PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase). (N. A. Berger, Sims, Catino, & Berger, 1983)

Αν και η PARP λειτουργεί ως επιδιορθωτής DNA, η υπερενεργοποίησή της από τοξικούς παράγοντες και η παραγωγή PAR πολυμερών μεγάλου μήκους, οδηγεί στη κατανάλωση NAD⁺ και ATP με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του AIF από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα (N. A. Berger, et al., 1983). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τα κανάλια MPT και αυξάνουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, προάγουν τη πυρηνική συμπύκνωση, την έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης, τη μεταβολή στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και τέλος τον κυτταρικό θάνατο (Yu, Wang, Dawson, & Dawson, 2003). Είναι πιθανόν ότι λόγω της δράσης της PARP, απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο και η ενδονουκλεάση G (Hong, Dawson, & Dawson, 2004). Η διαδικασία αυτή είναι ανεξάρτητη των κασπασών, καθώς δεν αναστέλλεται με τη επίδραση αναστολέων των κασπασών.

Αποπτωτικά μόρια

Η ανάπτυξη και η μελέτη συμπλόκων με αποπτωτική δράση αποτελεί σημαντικό στόχο για θεραπευτικές προσεγγίσεις (Steiner & Gingrich, 2000). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση διαμέσου της δέσμευσής τους στους υποδοχείς θανάτου (death receptors), DR4 και DR5. Η ενεργοποίηση τέτοιων υποδοχέων μπορεί να προκαλέσει απόπτωση σε ποικίλες καρκινικές σειρές, χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα (Ashkenazi & Dixit, 1998). Ουσίες όπως το TRAIL και το Apomab έχουν τη δυνατότητα αυτή. Το TRAIL είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που μπορεί να δεσμευτεί στους υποδοχείς DR4 και DR5 (MacFarlane, 2003), ενώ το Apomab ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται στον υποδοχέα DR5 (Adams et al., 2008).

TRAIL

Η πρωτεΐνη Apo2L/TRAIL (Apo2 Ligand/Tumor Necrosis factor - related Apoptosis -Inducing Ligand) ανακαλύφθηκε ανεξάρτητα από τους Wiley και συνεργάτες (Wiley et al., 1995) και τους Pitti και συνεργάτες (Pitti et al., 1996). Η σχεδόν ταυτόχρονη ανακάλυψή της οδήγησε στη διπλή ονομασία της. Χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης αυτής είναι η υψηλή ομολογία της με τους υποδοχείς της οικογένειας TNF και η ικανότητά της να προκαλεί απόπτωση (Wiley, et al., 1995). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη-συνδέτης TRAIL ανήκει στην οικογένεια των TNF και μπορεί να προκαλέσει απόπτωση διάμεσου της δέσμευσής της με τους DRs (Ashkenazi & Dixit, 1998). Η ομο-τριμερής δομή (Hymowitz et al., 2000) της πρωτεΐνης TRAIL της δίνει τη δυνατότητα να συνδέεται με τέσσερις διαφορετικούς DRs. Η δέσμευσή της με τους υποδοχείς DR4 (TRAIL-R1) και DR5 (TRAIL-R2) οδηγεί στη μεταφορά αποπτωτικού σήματος, ενώ αντίθετα η δέσμευση με τους υποδοχείς DcR1 (Decoy Receptor-1/TRAIL-R3) και DcR2 (Decoy Receptor-2/TRAIL-R4) δεν είναι ικανή να προκαλέσει απόπτωση (Kelley & Ashkenazi, 2004). Η αποπτωτική δράση της TRAIL επιτυγγάνεται διαμέσου του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού (H. N. LeBlanc & Ashkenazi, 2003). Η δέσμευση της TRAIL στους υποδοχείς DR4 και DR5 οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών -8 και -10, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις κασπάσες -3, -6 και -7 οδηγώντας τελικά σε απόπτωση (Kelley & Ashkenazi, 2004). Ωστόσο, σε ορισμένες καρκινικές σειρές η απόπτωση μετά από τη δέσμευση της TRAIL επιτυγχάνεται διαμέσου του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού (H. LeBlanc et al., 2002) (Εικόνα 5). Τόσο in vitro όσο και in vivo έρευνες καταδεικνύουν την αντικαρκινική δράση της TRAIL σε ποικίλες καρκινικές σειρές όπως μαστού (Walczak et al., 1999), πνεύμονα (Jin et al., 2004), πολλαπλού μυελώματος (Shipman & Croucher, 2003; Vitovski, Phillips, Sayers, & Croucher, 2007), προστάτη και τονίζουν το πλεονέκτημα της χαμηλής τοξικότητας ενάντια στα φυσιολογικά κύτταρα (Ashkenazi, 2002; Croucher & Apperley, 1998). Συγκεκριμένα, η έρευνα των Sean και συνεργατών σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκίνου του παχέος εντέρου αποδεικνύουν την χαμηλή τοξικότητα της TRAIL σε πρωτεύοντα θηλαστικά και τρωκτικά (Kelley et al., 2001). Επιπλέον, η έρευνα των Shankar και συνεργατών σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, κατέδειξε ότι η TRAIL προκαλεί διαφορετικού βαθμού

απόπτωση, ανάλογα με την κυτταρική σειρά, χωρίς όμως να επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα (Shankar, Chen, & Srivastava, 2005).

Ο ακριβής μηχανισμός της διαφορετικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων ή ακόμη και καρκινικών κυττάρων ιδίου τύπου καρκίνου στην TRAIL δεν έχει διαλευκανθεί. Πιστεύεται όμως ότι η διαφορετική έκφραση των DR (Degli-Esposti, Smolak, et al., 1997; Griffith, Chin, Jackson, Lynch, & Kubin, 1998; Keane, Ettenberg, Nau, Russell, & Lipkowitz, 1999; X. D. Zhang, Franco, Nguyen, Gray, & Hersey, 2000; X. D. Zhang, Nguyen, Thomas, Sanders, & Hersey, 2000), η υπερέκφραση ενδοκυττάριων αποπτωτικών πρωτεϊνών (πχ FLIP) και κατασταλτικών πρωτεϊνών της απόπτωσης (IAPs) σε κάθε κυτταρική σειρά μεταβάλλει και την ευαισθησία τους (Suliman, et al., 2001).

Αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου, είναι ο συνδυασμός ουσιών με συνεργιστικη ή προσθετική δράση με σκοπό την χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων και περιορισμό των ανεπιθύμητων παρενεργειών που συνήθως προκύπτουν.

Η TRAIL παρουσίασε συνεργιστική δράση in vivo, όταν συνδυάστηκε με συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά παράγωγα ή με ραδιοθεραπεία, προκαλώντας σημαντική μείωση του μεγέθους του όγκου, χωρίς να παρατηρηθεί τοξική δράση σε φυσιολογικούς ιστούς και όργανα των πειραματοζώων (Chinnaiyan et al., 2000; Gliniak & Le, 1999). Έχει χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες κλινικές μελέτες φάσης Ι για διάφορες μορφές καρκίνου και φάνηκε να είναι ασφαλής και ανεκτή από τους ασθενείς. Σημαντικά είναι τα αποτελέσματα της έρευνας του Butler και συνεργατών, οι οποίοι απέδειξαν την αντικαρκινική δράση της TRAIL σε ποικίλες καρκινικές σειρές μαστού, δράση που ενισχύθηκε περαιτέρω όταν η TRAIL συνδυάστηκε με τον καταστολέα των διακετυλασών των ιστονών (Histone deacetylases, HDACs), SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) (Butler et al., 2006). Τα αποτελέσματα από τις διάφορες μελέτες για την αντικαρκινική δράση της TRAIL οδηγούν στο συμπέρασμα ότι είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με άλλες αντικαρκινικές ουσίες, αποτελεί ένα υποσχόμενο και ισχυρό χημειοθεραπευτικό σκεύασμα. **Cell-extrinsic**



Εικόνα 5: Οι αποπτωτικοί μηχανισμοί δράσης της TRAIL. Η πρωτεΐνη TRAIL μπορεί να προκαλέσει απόπτωση διαμέσου και του ενδογενούς και του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού (Kelley & Ashkenazi, 2004).

Apomab

Η διαλυτότητα που παρουσιάζει ο συνδέτης Apo2L/TRAIL και η επακόλουθη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του στον οργανισμό οδήγησαν στην ανάγκη για δημιουργία μονοκλωνικών αντισωμάτων που να στοχεύουν τους ίδιους υποδοχείς. Η δράση τέτοιων αντισωμάτων βρίσκεται υπό μελέτη (Camidge, 2008) και φαίνεται να ενισχύεται σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία (Belyanskaya et al., 2007).

Το 2008, οι Adams και συνεργάτες , δημιούργησαν το αντίσωμα Apomab με στόχο να παρακάμψουν τα μειονεκτήματα της πρωτεΐνης TRAIL. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Apomab αναγνωρίζει και συνδέεται στον DR5 (Adams, et al., 2008). Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* το Apomab παρουσιάζει κατασταλτική δράση σε ποικίλες καρκινικές σειρές. Συγκεκριμένα, σε *in vivo* έρευνες των Zinonos και συνεργατών, το Apomab αποδείχθηκε να παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δράση ενάντια στον καρκίνο του μαστού (Zinonos et al., 2009). Επιπλέον, η αποπτωτική δράση του Apomab έχει αποδειχθεί σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκίνου του παχέως εντέρου, καρκίνου του πνεύμονα και καρκίνου του παγκρέατος (Adams, et al., 2008; Jin et al., 2008). Η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ως αποτέλεσμα της δράσης του Apomab, συνδέθηκε με την ενεργοποίηση των κασπασών (Adams, et al., 2008). Προς το παρόν, η δράση του Apomab αξιολογείται σε κλινικές μελέτες φάσης ΙΙ (Zinonos, et al., 2009).

Κυτταρικός κύκλος

Η κυτταρική διαίρεση είναι μια ζωτική διαδικασία για την ανάπτυξη του οργανισμού. Ο μηχανισμός της κυτταρικής διαίρεσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και ελέγχεται από ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν προσωρινά αλλά με συγκεκριμένη σειρά, ώστε να εξασφαλίζεται η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη (Εικόνα 6). Στην καρκινογένεση αυτή η διαδικασία απορυθμίζεται με αποτέλεσμα τον υπέρμετρο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των εξαλλαγμένων κυττάρων.

Υπό κανονικές συνθήκες τα κύτταρα βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας ή φάση G₀. Με την επίδραση επαγωγέων της μίτωσης (ενδοκυτταρικών ή εξωκυτταρικών), το κύτταρο εισέρχεται στη φάση της διαίρεσης. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις φάσεις: G₁, S, G₂ και M. Κατά την διάρκεια της G₁ φάσης, τα κύτταρα περνούν από ένα κρίσιμο σημείο (restriction point), πέρα από το οποίο η πορεία δεν μπορεί να αναστραφεί. Η G1 αποτελεί προπαρασκευαστικό στάδιο της S και χαρακτηρίζεται και από τη σύνθεση των απαραίτητων παραγόντων για τον διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων και τη σύνθεση του DNA (κυρίως ενζύμων), η οποία πραγματοποιείται στην φάση S. Στην συνέχεια το κύτταρο εισέρχεται στην φάση G2, όπου ελέγχεται και επιδιορθώνεται το νεοσυντιθέμενο DNA και γίνεται η κατάλληλη προετοιμασία για την φάση Μ. Έτσι ακολουθεί η φάση της μίτωσης Μ (πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση), όπου τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται και σχηματίζονται τα θυγατρικά κύτταρα. Η κυτταροκίνηση ολοκληρώνει τη κυτταρική διαίρεση, οπότε τα θυγατρικά κύτταρα είτε εισέρχονται εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο είτε περνούν στην κατάσταση ηρεμίας. Ανωμαλίες και προβλήματα που μπορούν να αποτρέψουν την επιτυχή έκβαση της κυτταρικής διαίρεσης οδηγούν συχνά σε διάφορες ασθένειες, εκ των οποίων χαρακτηριστικότερη είναι ο καρκίνος.



Εικόνα 6: Φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Υπό κανονικές συνθήκες τα κύτταρα βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας ή φάση G₀. Με την επίδραση επαγωγέων της μίτωσης (ενδοκυτταρικών ή εξωκυτταρικών), το κύτταρο εισέρχεται στη φάση της διαίρεσης. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις φάσεις: G₁, S, G₂ και M (Vermeulen, Berneman, & Van Bockstaele, 2003).

Η μετάβαση από τη μία κυτταρική φάση στην άλλη ρυθμίζεται από διάφορες ενδοκυττάριες πρωτεΐνες. Σημαντικές ρυμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου αποτελούν οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) (Εικόνα 7). Ανήκουν στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης, αποτελούνται από 300 περίπου αμινοξέα, έχουν μοριακό βάρος 30-40 kDa και ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου. Είναι ενεργές μόνο όταν είναι συνδεδεμένες με τις κυκλίνες. Η συνολική τρισδιάστατη δομή των CDKs παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τη δομή των υπολοίπων κινασών: παρατηρούνται δύο περιοχές, η θηλιά με ένα μικρό αμινοτελικό άκρο, στο οποίο κυριαρχούν δομές β-πτυχωτών επιφανειών και ο η θηλιά με ένα μεγάλο καρβοζυτελικό άκρο, στο οποίο κυριαρχεί η δομή της α-έλικας. Στο δεύτερο λοβό εντοπίζεται το ενεργό κέντρο καθώς και η ρυθμιστική περιοχή T-loop, στην οποία γίνεται η φωσφορυλίωση αμινοξέων, διαδικασία απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Jeffrey et al., 1995; Johnson et al., 2002; Paulovich & Hartwell, 1995). Η σύνδεση της υπομονάδας ελέγχου είναι απαραίτητη για την αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου και την έναρξη της δράσης του. Η θέση πρόσδεσης του ATP βρίσκεται μεταξύ των δύο λοβών. Οι δύο λοβοί είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους με μία περιοχή που λειτουργεί ως "στρόφιγγα" για την προσέγγιση και πρόσδεση ή απελευθέρωση των ATP/ADP (Jeffrey, et al., 1995; Johnson, et al., 2002; Paulovich & Hartwell, 1995).

Πέντε διαφορετικές CDKs είναι ενεργές κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ανάλογα με την φάση. Στη φάση G_1 ενεργές είναι οι CDK4, CDK6, CDK2, στη φάση S η CDK2 και στη φάση G₂/M, η CDK1. Με την ενεργοποίηση των κινασών επάγεται η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Morgan, 1995; Pines, 1995). Τα επίπεδα των CDKs παραμένουν σταθερά κατά την διάρκεια του κύκλου, σε αντίθεση με τις ενεργοποιητικές πρωτεΐνες, τις κυκλίνες, των οποίων τα επίπεδα αυξομειώνονται, ενεργοποιώντας περιοδικά τις CDKs. Σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου εμπλέκονται και διαφορετικές κυκλίνες. Οι τρεις κυκλίνες τύπου D (Cyclin D1, Cyclin D2 και Cyclin D3), προσδένονται με την CDK4 και CDK6 δημιουργώντας το σύμπλεγμα CDK/Cyclin D, σημαντικό για την είσοδο στη φάση G₁ (Sherr, 1994). Η κυκλίνη E (Cyclin E), εμπλέκεται και αυτή στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και προσδένεται στην CDK2, ρυθμίζοντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S (Ohtsubo, Theodoras, Schumacher, Roberts, & Pagano, 1995). Η κυκλίνη Α (Cyclin A), προσδένεται με την CDK2, δημιουργώντας σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για τη διεξαγωγή της φάσης S. Στο τέλος της G₂ φάσης και στην αρχή της M, η κυκλίνη A, συμπλοκοποιείται με την CDK1, για την προώθηση στη φάση Μ. Η μίτωση ρυθμίζεται περαιτέρω με τη συμπλοκοποίηση της κυκλίνης B (Cyclin B) με την CDK1 (Arellano & Moreno, 1997; King, Jackson, & Kirschner, 1994).

Η δράση των CDKs μπορεί να παρεμποδιστεί από πρωτεΐνες-καταστολείς του κυτταρικού κύκλου (CDK Inhibitors, CKI). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται είτε στις CDKs ή στο σύμπλοκο CDKs/Cyclins, ρυθμίζοντας την ενεργότητά τους.

Υπάρχουν δύο διαφορετικές οικογένειες CKI: (α) οι INK4 πρωτεΐνες και (β) οι Cip/Kip πρωτεΐνες (Sherr & Roberts, 1995). Η οικογένεια INK4, περιλαμβάνει τις p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), οι οποίες απενεργοποιούν τις κινάσες της φάσης G₁ του κυτταρικού κύκλου (CDK4 και CDK6). Αυτές οι CKI, δημιουργούν σταθερά σύμπλοκα με τις CDK πριν την πρόσδεση των κυκλινών αποτρέποντας την σύνδεση της Cyclin D (Carnero & Hannon, 1998). Η δεύτερη οικογένεια καταστολέων, Cip/Kip, περιλαμβάνει τις p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) και p57 (Kip2). Αυτοί οι καταστολείς απενεργοποιούν τα σύμπλοκα της φάσης G₁ του κυτταρικού κύκλου CDK/Cyclin D και σε μικρότερο βαθμό το σύμπλοκο CDK1/Cyclin B (Harper et al., 1995; Hengst & Reed, 1998; Polyak et al., 1994). Η p21 επίσης καταστέλλει τη σύνθεση του DNA μετά από πρόσδεση και απενεργοποίηση του PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Pan et al., 1995; Waga, Li, & Stillman, 1997). Οι CKI ρυθμίζονται από εσωτερικά και εξωτερικά σήματα: η έκφραση της p21 πρωτεΐνης ρυθμίζεται μεταγραφικά από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Η έκφραση και λειτουργία του p15 και p27 ρυθμίζεται από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (transforming growth factor β, TGF-β) (Hannon & Beach, 1994).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση σημαντικών γεγονότων και των παραγόντων που τα μεσολαβούν κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Vermeulen, Berneman, et al., 2003).

Η p21, δεσμεύει και αναστέλλει τη δράση των συμπλόκων CDK4-CyclinD1, CDK2-Cyclin E, CDK2-Cyclin A καθώς και CDK2-Cyclin B, αποτελώντας έτσι σημαντικό αναστολέα των CDKs (Serrano, Hannon, & Beach, 1993). Μεταλλάξεις του γονιδίου p21 δεν ανιχνεύονται συχνά, ενώ ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης της πρωτεΐνης, φαίνεται να γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής, κυρίως από το γονίδιο p53. Έχει ήδη αναφερθεί ότι σε περίπτωση βλάβης DNA, η φυσιολογική p53 επάγει την έκφραση της p21, με συνέπεια την αναστολή της δράσης των CDKs, παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης της pRb και απελευθέρωσης των παραγόντων E2F, με τελικό αποτέλεσμα την παραμονή στη φάση G1 (el-Deiry et al., 1993). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι λειτουργεί και ανεξάρτητος της p53 μηχανισμός επαγωγής της πρωτεΐνης p21 (Datto et al., 1995; Datto, Yu, & Wang, 1995).

Υπάρχουν συγκεκριμένα "σημεία ελέγχου" που φροντίζουν για τη σωστή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Ως απόκριση σε βλάβη DNA, τα σημεία ελέγχου επάγουν την καταστολή του κυτταρικού κύκλου μέχρι την επιδιόρθωση της βλάβης. Τα σημεία ελέγχου βρίσκονται πριν την S φάση (G₁-S checkpoint), και μετά τον διπλασιασμό του DNA (G₂-M checkpoint).

Δύο ιδιαίτερα σημαντικοί ρυθμιστικοί παράγοντες του σημείου ελέγχου G1-S, είναι η πρωτεΐνη p53 και το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRb). Ο έλεγχος της ακεραιότητας του γονιδιώματος αποτελεί σημαντική διαδικασία στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτεΐνη p53. Υπο φυσιολογικές συνθήκες, μετά από βλάβη του DNA, η p53 (wild type) καταστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου προκαλώντας στάση του κυττάρου στη φάση G1, με σκοπό την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού πριν τον αναδιπλασιασμό του. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τη δραστικότητα των συμπλεγμάτων κυκλινών/κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Εάν η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, η p53 προωθεί την διαδικασία κυτταρικού θανάτου μέσω αποπτωτικών μηγανισμών (Marx, 1993). Η δυσλειτουργία της p53 οδηγεί διαταραχή της απόπτωσης συμβάλλοντας ετσι στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Εκτός από τη σημασία της πρωτεΐνης p53 στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁, πρόσφατες μελέτες εισηγούνται ανάλογο ρόλο της p53 και στην παραμονή του κυττάρου στη φάση G2 μετά από βλάβη του DNA (Bunz et al., 1998). Το γονίδιο (TP53) το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγνότητα μεταλλάξεων σε διάφορες μορφές καρκίνου, ενώ το φάσμα των μεταλλάξεων ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου (Hollstein, Sidransky, Vogelstein, & Harris, 1991). Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον το 50% των όγκων παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, ενώ το 95% των μεταλλάξεων αφορά στην κεντρική περιοχή δέσμευσης του DNA (core DNA-binding domain). Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 μικρό χρόνο ημιζωής, γεγονός που δεν επιτρέπει την ανίχνευσή της στους ιστούς κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο. Αντίθετα, μεταλλαγμένες μορφές της έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, με αποτέλεσμα κατά την ανοσοϊστοχημική μελέτη να δίνουν θετικά αποτελέσματα στην έκφραση της p53. Η λειτουργία της p53 επηρεάζεται και από την πρωτεΐνη, mdm2. Η μεταγραφή του γονιδίου mdm2 ρυθμίζεται από την φυσιολογική p53. Η πρωτεΐνη mdm2 δεσμεύει τη p53, αναστέλλοντας τη ρυθμιστική μεταγραφική δραστηριότητά της, ενώ παράλληλα επάγει την αποικοδόμησή της από το σύστημα της ουβικιτίνης (ubiquitin) με τελικό αποτέλεσμα η υπερέκφραση της mdm2 να αδρανοποιεί την p53 (Momand, Zambetti, Olson, George, & Levine, 1992). Η βλάβη του γενετικού υλικού ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Atm, η οποία εμποδίζει τη δέσμευση της mdm2 στην p53 μέσω φωσφορυλίωσής της σε θέσεις σερίνης από την κινάση Chk2. Σε μερικούς καρκίνους όπως τα σαρκώματα έχει διαπιστωθεί απενεργοποίηση της p53 μέσω υπερέκφρασης της mdm2, ενώ στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει παρατηρηθεί δέσμευση της p53 και αύξηση της αποικοδόμησής της από την πρωτεΐνη E6 του ιού των ανθρώπινων κονδυλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) (Allred et al., 1993; Mirza, Mirza, Vlastos, & Singletary, 2002; Rosen et al., 1995).

Για την μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στη φάση αναδιπλασιασμού του DNA (S), παιζει σημαντικό ρόλο η πρωτεΐνη pRb, η οποία φωσφορυλιώνεται απενεργοποιώντας στην συνέχεια το ογκοκατασταλτικό αυτό μόριο (Buchkovich, Duffy, & Harlow, 1989). Η pRb βρίσκεται στην ενεργό, υποφωσφορυλιωμένη μορφή της κατά τη φάση G0 και έως το μέσο της G1, ενώ φωσφορυλιώνεται και αδρανοποιείται προς το τέλος της G1 και κατά τη φάση S, παραμένοντας σε υψηλό βαθμό φωσφορυλίωσης κατά τη διάρκεια της φάσης G2 (Mittnacht & Weinberg, 1991).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η pRb αποτρέπει την είσοδο στη φάση S σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδρασή της με το μεταγραφικό παράγοντα E2F-1 και τη συνοδό του υπομονάδα DP (Dyson, 1998), ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή ποικιλίας γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στη διαδικασία σύνθεσης DNA. Η υποφωσφορυλιωμένη pRb σχηματίζει σύμπλοκα με αυτούς τους παράγοντες και τους αδρανοποιεί, καταστέλλοντας έτσι την έκφραση γονιδίων. Η αναστολή της ενεργοποίησης αυτών των γονιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης pRb με τον E2F-1 ερμηνεύει την κατασταλτική δράση της pRb στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Helin, Harlow, & Fattaey, 1993).

Σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας του σημείου ελέγχου G₂-M, αποτελεί η πρωτεΐνη cdc2 ή p34^{cdc2} ή CDK1, προϊόν του γονιδίου *cdc2* το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά στον *Schizosaccharomyces pombe*. Η CDK1 είναι η καταλυτική υπομονάδα ενός συμπλέγματος με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, του παράγοντα προαγωγής της

ωρίμανσης ή μίτωσης (Maturation or mitosis promoting factor, MPF) (Masui & Markert, 1971). Ο παράγοντας MPF αποτελεί σύμπλοκο της CDK1 με την Cyclin B (Gautier et al., 1990), το οποίο διεγείρει την έναρξη μιτωτικών γεγονότων όπως είναι ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου, η διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων (Gerhart, Wu, & Kirschner, 1984). Η CDK1 φωσφορυλιώνει πολλαπλά υποστρώματα και παρουσιάζει μέγιστη δράση κατά τη μετάφαση. Στο σημείο αυτό το σύμπλοκο CDK1-Cyclin B, ενεργοποιεί το σύμπλεγμα προαγωγής της ανάφασης (anaphase promoting complex, APC), το οποίο επιτρέπει στις αδελφές χρωματίδες να αποχωριστούν μεταξύ τους, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αποικοδόμηση της κυκλίνης B μέσω σύνδεσής της με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη (ubiquitin).

Το σύμπλοκο CDK1-Cyclin B συμμετέχει και σε προστατευτικούς για το κύτταρο μηγανισμούς, καθώς βλάβη του DNA από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας ή άλλους παράγοντες οδηγεί σε παραμονή του κυττάρου στη φάση G2. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση του χρόνου παραμονής του κυττάρου στη φάση G_2 μετά από βλάβη του DNA (Agarwal, Agarwal, Taylor, & Stark, 1995; Bunz, et al., 1998; Winters, Ongkeko, Harris, & Norbury, 1998), αν και τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν και άλλους μηχανισμούς. Η p53 προκαλεί καταστολή στη φάση G2 μέσω αναστολής της CDK1, η οποία απενεργοποιείται ταυτόχρονα από 3 μεταγραφικούς στόχους της p53, την p21, την Gadd45 και την 14-3-3σ. Η αναστολή της CDK1 από την p21, σχετίζεται με διακοπή της ενεργοποίησής της από την CAK, ενώ η Gadd45 διαχωρίζει την CDK1 από την Cyclin B. Η πρωτεΐνη 14-3-3σ, εκτός από την ανασταλτική της δράση στην CDK1, προκαλεί επίσης συσσώρευση του συμπλόκου CDK1-Cyclin B στο κυτταρόπλασμα. Η καταστολή του γονιδίου της Cyclin B και της CDK1 από την p53, αποτελεί έναν ακόμα σημαντικό μηχανισμό (Taylor & Stark, 2001). Η βλάβη DNA κινητοποιεί επίσης οδούς απενεργοποίησης της δραστικότητας της CDK1, ανεξάρτητες από την p53, όπως είναι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών Chk1 και Chk2 από τις κινάσες Atm και Atr. Έχει διαπιστωθεί ότι η Chk1 αναστέλλει άμεσα τη δραστικότητα της Cdc25C και δημιουργεί θέση δέσμευσης για την πρωτεΐνη 14-3-3 μέσω φωσφορυλίωσης, η οποία οδηγεί στην παραμονή της φωσφατάσης Cdc25C στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, η απενεργοποίηση της Plk1 μετά από βλάβη DNA συμβάλλει και αυτή στην αναστολή της δραστικότητας της Cdc25C. Οι κινάσες Chk1, Chk2, Atm και Atr προκαλούν ενεργοποίηση της p53, μέσω φωσφορυλίωσης και αναστολής της αλληλεπίδρασης με την mdm2. Τέλος,

έχει διαπιστωθεί ότι η κινάση Atm φωσφορυλιώνει το BRCA1, το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία επιδιόρθωσης μετά από βλάβη DNA (Smits & Medema, 2001; Taylor & Stark, 2001).

Ο καρκίνος συχνά θεωρείται ότι αποτελεί μία νόσο που σχετίζεται με διαταραχή του κυτταρικού κύκλου. Από τα παραπάνω γίνεται εμφανής η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων που συμμετέχουν στον έλεγχο της κυτταρικής αναπαραγωγής. Αν και πολλοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί έχουν μελετηθεί σε βάθος *in vitro*, είναι ακόμα ασαφής ο τρόπος με τον οποίο διαφορετικές μεταξύ τους κυτταρικές διαδικασίες απορρυθμίζονται συντονισμένα, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση.

Μετάσταση

Η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ασθενείς με καρκίνο είναι ο σχηματισμός μακρινών μεταστάσεων. Η πορεία της διήθησης και μετάστασης είναι πολυσταδιακή, με διαδοχικά στάδια πολλαπλών αλληλεπιδράσεων μεταξύ όγκου και ξενιστή. Ένα κύτταρο ή ομάδα κυττάρων πρέπει να είναι ικανά να αφήσουν τον πρωτοπαθή όγκο και να εισβάλλουν στον παρακείμενο ιστό, να εισέλθουν στην αρτηριακή ή λεμφική κυκλοφορία, να εγκλωβιστούν στα τριχοειδή του νέου οργάνου, να εξαγγειωθούν από την κυκλοφορία και τελικά να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν δευτερεύουσες εστίες όγκων. Η επίτευξη κάθε σταδίου μετάστασης απαιτεί συντονισμένες δράσεις ποικίλων οδών και γονιδίων σχετιζόμενων με τη μετάσταση (Liotta & Stetler-Stevenson, 1991).

Ο εξωκυττάριος χώρος (ECM), είναι αναπόσπαστο μέρος των ιστών (Ossowski, 1992; Seynaeve et al., 1993). Αποτελείται από πρωτεογλυκάνες (ποικιλία πρωτεϊνών) και από ινώδεις πρωτεΐνες, όπως κολλαγόνο, ελαστίνη, ινωδονεκτίνη και λαμινίνη, οι οποίες έχουν δομικές και προσκολλητικές λειτουργίες, απαραίτητες για τη μετάσταση. (Liotta & Stetler-Stevenson, 1991). Τα συστατικά του στρώματος επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων στη διήθηση και μετάσταση. Το εξωκυττάριο στρώμα και το μεταστατικό κύτταρο φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με τρόπο που εξασφαλίζει την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου. Η βασική μεμβράνη αποτελείται απο ένα πυκνό πλέγμα κολλαγόνου τύπου ΙV, γλυκοπρωτεΐνες, όπως λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη, και αυξητικούς παράγοντες. Απώλεια της συνοχής της βασικής μεμβράνης μέσω διήθησής της από τα καρκινικά κύτταρα είναι σημαντικό στοιχείο της κακοήθειας (Liotta & Stetler-Stevenson, 1991). Αρκετές ομάδες πρωτεϊνών συμμετέχουν στο διηθητικό και μεταστατικό φαινότυπο του κυττάρου, όπως είναι μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, των κατχερινών και της οικογένειας των ιντεγκρινών, της λαμινίνης κ.λπ. Η λαμινίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα μόρια προσκόλλησης της βασικής μεμβράνης. Οι συνδέσεις μεταξύ των μορίων προσκόλλησης, των ιντεγκρινών και των κατχερινών σταθεροποιεί την ακεραιότητα των ιστών, ενώ απώλεια ή μεταβολή αυτών των πρωτεϊνών επιφανείας έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με αυξημένη μεταστατική δυνατότητα. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεϊνες συμμετέχουν στην πρόσδεση διαφόρων συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος και αναγνωρίζονται ως σηματοδοτικά μόρια για τη ρύθμιση της απόπτωσης, της γονιδιακής έκφρασης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της διήθησης και μετάστασης του καρκίνου και της αγγειογένεσης (Demetriou & Cress, 2004). Τα συνδετικά μόρια του εξωκυττάριου στρώματος για τις ιντεγκρίνες συμπεριλαμβάνουν ποικιλία μορίων όπως κολλαγόνο, λαμινίνη, ινωδονεκτίνη, βιτρονεκτίνη κτλ (Demetriou & Cress, 2004; Nagle et al., 1995; Rabinovitz, Nagle, & Cress, 1995).

Η πορεία της διήθησης είναι μία ενεργός πορεία η οποία περιλαμβάνει σύνθεση και αποικοδόμηση ποικίλων πρωτεϊνών. Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνοντας ένζυμα διηθούν τους ιστούς εποικοδομώντας το εξωκυττάριο στρώμα διεισδύοντας έτσι επιτυχώς. Σχεδόν όλα τα κύτταρα του όγκου και το περιβάλλον του ξενιστή υπερεκφράζουν ένα ή περισσότερα από αυτά τα ένζυμα (Moller, 1993; Ossowski, 1988, 1992; Ossowski & Reich, 1983). Η διαδικασία αυτή δεν εξαρτάται μόνο από την παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων αλλά από την ισορροπία ενεργοποιημένων πρωτεασών και των φυσικών αναστολέων τους (Mueller, Yu, & Laug, 1995). Πρωτεάσες που συσχετίζονται με την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων αποτελούν οι: (α) πρωτεάσες κυστεΐνης (cystein proteases), (β) πρωτεάσες ασπαρτικού οξέος (aspartic acid proteases) όπως είναι οι καθεψίνες L, B και D (Atkins & Troen, 1995), (γ) μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) (Matrisian, 1992) και (δ) ενεργοποιητές πλασμινογόνου (urokinase-type plasminogen activator, uPA) και πλασμίνες (Blasi, Vassalli, & Dano, 1987; Ossowski & Reich, 1983).

Μεταλλοπρωτεϊνάσες

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) του στρώματος είναι πρωτεολυτικά ένζυμα με κύριο ρόλο την αποικοδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος και έχουν ταξινομηθεί σε 5 ομάδες όπως κολλαγενάσες, ζελατινάσες, ελαστάσες, στρωμελυσίνες και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μεμβρανικού τύπου. Εκκρίνονται ως προένζυμα και για να εκδηλώσουν τη δράση τους χρειάζονται ενεργοποίηση. Οι αναστολείς τους είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για τη πρόληψη των μεταστάσεων (Lu et al., 2000). Όπως αναφέρεται και πιο πάνω ο τύπος VI του κολλαγόνου αποτελεί κρίσιμο στοιχείο της βασικής μεμβράνης. Δύο MMPs αποδομούν το κολλαγόνο τύπου VI (η ζελατινάση A και B) (Aimes & Quigley, 1995; Patterson, Atkinson, Knauper, & Murphy, 2001). Άλλες MMPs (stromelysin, matrilysin) είναι σημαντικές στη μετάσταση, διότι προκαλούν πρωτεόλυση σε άλλες πρωτεΐνες του στρώματος (Lu, et al., 2000; Visse & Nagase, 2003). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος αναστέλλονται από ενδογενείς σχέση μεταξύ των επιπέδων ενεργοποιημένων αναστολείς των MMPs. Η μεταλλοπρωτεϊνασών και των αναστολέων καθορίζει την ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης του στρώματος και της σταθερότητας ή του σχηματισμού του στρώματος. Τόσο οι μεταλλοπρωτεϊνάσες όσο και οι αναστολείς τους βρίσκονται στον ίδιο ιστό ή στον ορό και παράγονται από τον ίδιο τον όγκο ή από τα κύτταρα του στρώματος. Χαμηλά επίπεδα MMPs (πχ της MMP-2) έχουν αποδειχθεί ότι παράγονται από φυσιολογικά κύτταρα, από μη μεταστατικά κύτταρα και από μη κακοήθη κύτταρα του μαστού. Αύξηση της MMP-2 συνδυάζεται με δυσπλαστικά ή νεοπλασματικά κύτταρα και επιπλέον, αυξάνεται προοδευτικά καθώς μετατρέπονται τα κύτταρα από καρκινικά *in situ* σε διηθητικά. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε νεοπλασίες του εντέρου και του στομάχου (Overall & Kleifeld, 2006; B. Zhang et al., 2008).

Χαρακτηριστικά των μεταλλοπρωτεϊνασών

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, χαρακτηρίζονται ως διάμεσες κολλαγενάσες (interstitial collagenases), λόγω της υδρολυτικής τους δράσης στο μη μετουσιωμένο κολλαγόνο τύπου Ι, ΙΙ, ΙΙΙ σε φυσιολογικές συνθήκες, το οποίο βρίσκεται στο ενδιάμεσο στρώμα. Στην κατηγορία αυτήν υπάγονται οι: MMP-1 (κολλαγενάση τύπου ινοβλαστών - fibroblast collagenase), MMP-8 (κολλαγενάση τύπου ουδετεροφίλων – neutrophil collagenase), MMP-13 και MMP-18. Η MMP-1 απαντάται σε γλυκοζυλιωμένη ή μη-γλυκοζυλιωμένη μορφή, με μοριακό

βάρος 57- και 52 kDa αντίστοιχα, ενώ παράγεται από ινοβλάστες, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η MMP-8 είναι γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 75 kDa, η οποία παράγεται και αποθηκεύεται στα ουδετερόφιλα κύτταρα. Η απελευθέρωσή της από τα αποθηκευτικά κυστίδια των παραπάνω κυττάρων επάγεται από χημικούς παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν τα κύτταρα αυτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άμεση επίτευξη της μέγιστης ενζυμικής δράσης, σε αντίθεση με την MMP-1 της οποίας επάγεται αρχικά η σύνθεση στα παραγωγά κύτταρα και κατόπιν η απελευθέρωση.

Η MMP-13, αποικοδομεί τη ζελατίνη και τις πρωτεογλυκάνες. Επίσης, ενέχεται στην ενεργοποίηση της πρόδρομης MMP-9 και σε συνδυασμό με την MT1-MMP στην ενεργοποίηση της πρόδρομης MMP-2 (McCawley & Matrisian, 2001; Murphy & Knauper, 1997).

Ζελατινάσες

Η ονομασία τους ως ζελατινάσες οφείλεται στην ικανότητα τους να υδρολύουν την ζελατίνη, η οποία δεσμεύεται με την ομόλογη με την ινοσυνδετίνη περιοχή του ενζύμου. Στην κατηγορία αυτήν ανήκουν η ζελατινάση Α ή MMP-2 και η ζελατινάση Β ή MMP-9. Απαντώνται ως προένζυμα, proMMP-2 και proMMP-9, και έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με τον TIMP-2 και TIMP-1 αντίστοιχα, και στη μορφή του προενζύμου. Τα προένζυμα αυτά ενεργοποιούνται από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μεμβρανικού τύπου. Η MMP-2 παράγεται από διάφορα κύτταρα σε καλλιέργεια, όπως ινοβλάστες, οστεοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, και μονοκύτταρα (Birkedal-Hansen, 1993). Η MMP-9 παράγεται και εκκρίνεται από πολλά κύτταρα, μεταξύ των οποίων και μονοκύτταρα, και η παραγωγή της αυξάνεται όταν τα κύτταρα αυτά διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα (Overall & Kleifeld, 2006).

Στρωμαλυσίνες

Στην κατηγορία αυτήν ανήκουν οι MMP-3 (στρωμαλυσίνη 1), MMP-10 (στρωμαλυσίνη 2) και MMP-11 (στρωμαλυσίνη 3). Υδρολύουν συζεύξιμες πρωτεογλυκάνες (aggrecan), τη συζευκτική πρωτεΐνη του χόνδρου (link protein), την ελαστίνη, τις ζελατίνες και την καρβοξυμεθυλιωμένη τρανσφερρίνη. Η MMP-3 είναι η πιο δραστική και εκκρίνεται σε δύο μορφές, την γλυκοζυλιωμένη (59 kDa) και την μη-γλυκοζυλιωμένη (57 kDa).
Πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην *in situ* ενεργοποίηση των MMP-1 και MMP-13 (Knauper, Lopez-Otin, Smith, Knight, & Murphy, 1996; Knauper et al., 1996; Murphy & Knauper, 1997)).

Αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνασών

Η σχέση μεταξύ των επιπέδων ενεργοποιημένων μεταλλοπρωτεϊνασών και των αναστολέων τους (TIMPs), καθορίζει την ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης του στρώματος και της σταθερότητας ή του σχηματισμού του στρώματος. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω οι αναστολείς των μεταλλοπρεωτεϊνασών παράγονται από τα ίδια κύτταρα που παράγουν και τις MMPs και έχουν αναγνωριστεί τέσσερα μέλη αναστολέων οι TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 και ΤΙΜΡ-4. Εκτός από την κατασταλτική τους δράση στις MMPs, οι TIMPs δρουν και σαν αυξητικοί παράγοντες σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Murphy & Willenbrock, 1995). Μέσω του Ν-τελικού άκρου τους δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο των MMPs με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τους. Στην διαδικασία συμπλοκοποίησής τους με τα ένζυμα-στόχους (MMPs), μπορεί το Ν-τελικό άκρο να είναι αυτό που δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, όμως πιστεύεται ότι προηγείται αλληλεπίδραση μεταξύ των Cτελικών περιοχών ενζύμωυ και αναστολέα. Στη περίπτωση των προενζυμικών μορφών των ζελατινασών, που όπως αναφέρθηκε δημιουργούν σύμπλοκα με τους TIMPs, η αντίδραση γίνεται μόνο με αλληλεπίδραση των C-τελικών άκρων, αφού το ενεργό κέντρο των ενζύμων καλύπτεται από το προπεπτίδιο (Murphy & Willenbrock, 1995).

Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένα επίπεδα ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Είναι πρωτεάσες οι οποίες εμπλέκονται στην μετατροπή του ανενεργού πλασμινογόνου σε ενεργό πλασμίνη, το οποίο αποικοδομεί διάφορες πρωτεϊνες όπως είναι η ινωδονεκτίνη, η λαμινίνη, το κολλαγόνο τύπου VI και σημαντικά την βιτρονεκτίνη και αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της διήθησης και μετάστασης. Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου υπάρχουν στους ιστούς και έχουν άμεσο και έμμεσο ρόλο στη διαμόρφωση και αποικοδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος, αλλά και στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και στον πολλαπλασιασμό. Αυξημένα επίπεδα βρέθηκαν σε διάφορες μορφές καρκίνου όπως του μαστού, παχέως εντέρου, πνεύμονα, προστάτη, εγκεφάλου, ενδομητρίου και μελανώματος (Markus, 1988). Υπάρχουν δύο τύποι ενεργοποιητών του πλασμινογόνου, (α) ο τύπου ουροκινάσης (urokinase-type,uPA) και (β) ο ιστικού τύπου (tissue type,tPA). Έχει φανεί οτι ο tPA, ενεργοποιεί την πλασμίνη για να πετύχει θρομβόλυση, ενώ ο uPA, είναι αυτός που ενεργοποιεί την πλασμίνη με σκοπό την αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου (Mignatti & Rifkin, 1993).

Το σύστημα του uPA, αποτελείται από την πρωτεάση σερίνης πλασμίνη (plasmin), από τους καταστολείς PAI-1 και PAI-2 (serpin inhibitors a2-anti-plasmin) και από τον uPA υποδοχέα (u-PAR) (Foekens et al., 2000; Mondino, Resnati, & Blasi, 1999). Το σύστημα αυτό παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ο uPA, προσδένεται στο u-PAR, με αποτέλεσμα τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη (Εικόνα 8). Η πλασμίνη είναι ικανή να διασπάσει τον εξωκυττάριο χώρο έμμεσα και άμεσα μέσω της ενεργοποίησης των μεταλλοπρωτεασών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στον περιβάλλοντα χώρο. Η απενεργοποίηση του uPA και του u-PAR επιτυγχάνεται με τους καταστολείς PAI-1 και PAI-2. Η καταστολή γίνεται με την πρόσδεσή τους με την πλασμίνη, δημιουργώντας το σύμπλοκο plasmin-a2-antiplasmin (PAP) (Foekens, et al., 2000; Mondino, et al., 1999; Nieuwenhuizen & Traas, 1989).



Εικόνα 8 : Μόρια τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία της πρωτεόλυσης. Το σχήμα απεικονίζει τον εκκρινόμενο από τα καρκινικά κύτταρα uPA, να προσδένεται στον υποδοχέα u-PAR, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του προενζύμου πλασμινογόνου σε ενεργό πλασμίνη. Η πλασμίνη με τη σειρά της ενεργοποιεί συγκεκριμένες μορφές μεταλλοπρωτεασών, οι οποίες και αυτές εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του εξωκυτταριου χώρου (Andreasen, Kjoller, Christensen, & Duffy, 1997).

Το πλασμινογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας, μοριακού βάρους 92 kDa και αποτελείται από 791 αμινοξέα και κατά 2% από υδατάνθρακες. Το μόριο του πλασμινογόνου αποτελείται από έξι δομικές περιοχές, με διαφορετικές ιδιότητες (Εικόνα 9) (Kwaan, 1992) (Nieuwenhuizen & Traas, 1989)



Εικόνα 9 : Δομή του πλασμινογόνου. Το μόριο αποτελείται από πέντε δομές τύπου kringle (K1 έως K5) και την περιοχή της πρωτεϊνάσης σερίνης (P). Η μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη επιτυγχάνεται μέσω της διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού 560-561 από τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (uPA, tPA). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο πολυπεπτιδικών αλυσίδων οι οποίες συνδέονται μέσω δυο δισουλφιδικών δεσμών. Τα αμινοξέα His603, Asp646 και Ser741 (•) αποτελούν μέρος του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνάσης. Οι δομές τύπου kringle 2 και 3 συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό (Andreasen, et al., 1997).

Το αμινοτελικό άκρο του μορίου αποτελείται από πέντε δομές τύπου kringle, με τις οποίες το πλασμινογόνο προσδένεται στο ινοδογόνο του πλάσματος αλλά και σε άλλα κύτταρα. Οι δομές kringle δίνουν στο μόριο την ικανότητα να λαμβάνει διαφορετικές δομές στον χώρο. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης (His603, Asp646, Ser741) και παρουσιάζει ομοιότητες με τα ενεργά κέντρα άλλων πρωτεϊνασών τύπου σερίνης. Το πλασμινογόνο συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά παρατηρείται και σε άλλα όργανα, όπως τα επινεφρίδια, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, τους όρχεις, την καρδιά, τους πνεύμονες και το σπλήνα (Markus, 1988). Για την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε ενεργό πλασμίνη διασπάται ένας πεπτιδικός δεσμός, μετατρέποντας το μόριο από πρωτεΐνη μονής αλυσίδας σε πρωτεΐνη διπλής αλυσίδας η οποία συγκρατείται με δυο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η πλασμίνη αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα και συμμετέχει σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως τη θρομβόλυση, διάσπαση των πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου και τέλος υποκινεί σημαντικές αντιδράσεις με σκοπό την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνασών.

Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουρακινάσης (uPA), απαντάται ως πρωτεΐνη μονής αλυσίδας και μοριακού βάρους 56 kDa (Ichinose, Fujikawa, & Suyama, 1986). Ο uPA υπάρχει με την μορφή της μονής και τη μορφή της διπλής αλυσίδας (Εικόνα 10). Μετατρέπεται στην τελευταία μετά απο διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού Lys158-Ile159 που καταλύεται από διάφορες πρωτεϊνάσες όπως η πλασμίνη, και η καθεψίνη B (Yoshida, Ohmura, Sugiki, Maruyama, & Mihara, 1995). Για να είναι ενεργό το ένζυμο, πρέπει να έχει την μορφή της διπλής αλυσίδας αποτελούμενο από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό (Yoshida, et al., 1995). Η βαρύτερη A αλυσίδα περιέχει μια δομή τύπου EGF και μια δομή τύπου kringle. αποτελώντας το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (Amino Terminal Fragment, ATF), μέσω του οποίου προσδένεται ο uPA στον υποδοχέα του. Η ελαφρύτερη B αλυσίδα περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η πρόσδεση του uPA στον υποδοχέα του αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητα του (Mondino, et al., 1999; Schmitt et al., 1997).



Εικόνα 10: Δομή του pro-uPA και του πλασμινογόνου. Το **SPD** είναι η δομή πρωτεϊνάσης σερίνης (serine proteinase domain), το **K** δομή τύπου kringle και το **G** δομή τύπου EGF. Τα βέλη δείχνουν τα σημεία διάσπασης προς μετατροπή του ανενεργού pro-uPA με μορφή μονής αλυσίδας και του πλασμινογόνου, στην ενεργή τους μορφή uPA και πλασμίνη (Andreasen, et al., 1997).

Μελέτες έχουν αποδείξει τη σημαντικότητα του uPA στην διεισδυτική και μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (Duffy, 1996). Στην αρχή υπήρχε η άποψη ότι ο uPA επάγει την διασπορά του καρκίνου μόνο μέσω της επαγωγικής του δράσης στον εξωκυττάριο χώρο, επιτρέποντας έτσι τη διείσδυση και μετάσταση των κυττάρων. Αν και η ελεγχόμενη αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου αποτελεί σημαντικό γεγονός για την επαγωγή της μετάστασης, έχει φανεί ότι ο uPA δρα και μέσω άλλων μηχανισμών παίζοντας ακόμη σημαντικότερο ρόλο στη μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Εμπλέκεται στην επαγωγή της αγγειογένεσης, μιτογένεσης και ρυθμίζει την προσκολλητική ικανότητα του κυττάρου (Andreasen, et al., 1997). Επίσης έχει φανεί να καταστέλλει την απόπτωση (Ma, Webb, Jo, & Gonias, 2001), επιτρέποντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, Διάφορες μελέτες καταδεικνύουν τη συσχέτιση του μορίου με την μετάσταση : (α) η χρήση κατασταλτικών αντισωμάτων έναντι του uPA μείωσε ή παρεμπόδισε τη μεταστατική

41

ικανότητα των κυττάρων, (β) παρεμπόδιση της πρόσδεσης του uPA στον υποδοχέα του uPAR, επίσης μείωσαν το σχηματισμό μεταστατικής εστίας, (γ) μη μεταστατικά κύτταρα στα οποία προστέθηκε cDNA για τον uPA αύξησαν τη μεταστατική τους δυνατότητα και (δ) νεοπλασματικές βλάβες σε ποντίκια στα οποία απενεργοποιήθηκε ο uPA ή το πλασμινογόνο παρουσίασαν χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και προαγωγής του όγκου σε σχέση με τα αγρίου τύπου (wild type) ποντίκια.

Ο uPA θεωρείται από διάφορους ερευνητές ως προγνωστικός δείκτης (Duffy, 1987), αφού έχει φανεί ότι αυξημένα επίπεδα του σχετίζονται με την κακή πρόγνωση ασθενών με καρκίνο. Το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (Urokinase type plasminogen activator system) αποτελεί σημαντικό στόχο των ερευνητών για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων με αντιμεταστατική και αντιδιεισδυτική ικανότητα. Τέτοιες θεραπείες μπορεί να περιλαμβάνουν ουσίες που είτε δρουν κατασταλτικά στη ενζυμική δραστικότητα του uPA ή παρεμποδίζουν την πρόσδεσή του στον υποδοχέα του, uPAR.

Ιντικοειδή

Τα ιντικοειδή είναι διμερή παράγωγα του ινδολίου τα οποία είτε απομονώνονται από φυσικές πηγές, είτε προκύπτουν από χημική σύνθεση. Ως προς την απομόνωση χρησιμοποιούνται: α) πάνω από 200 είδη φυτών, όπως είναι τα Isatis tinctoria (Brassicaceae), Indigofera tinctoria (Fabaceae), Indigofera suffruticosa (Fabaceae), Polygonum tinctorium (Polygonaceae) και Baphicacanthus cusia (Acanthaceae), από όπου τα ιντικοειδή απομονώνονται κυρίως από τη ρίζα και τα φύλλα, και β) πάνω από 15 διαφορετικά είδη γαστερόποδων μαλακίων των οικογενειών Murucudae και Thaididae. Αποτελούν μια κατηγορία μορίων που στη δομή τους εμπεριέχουν το ίντικο ή ινδικό και τα ισομερή του. Πρόκειται για διμερή παράγωγα δύο δακτυλίων ινδολίου, η σύνδεση των οποίων γίνεται σε διαφορετικές θέσεις. Είναι έγχρωμα παράγωγα, το χρώμα των οποίων διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσης, οπότε και διαφοροποιείται το χρωμοφόρο (το χρώμα οφείλεται στο συζυγιακό σύστημα των δύο καρβονυλίων και του διπλού δεσμού). Οι βασικοί αντιπρόσωποι των ιντικοειδών είναι το ίντικο (ή ιντιγκοτίνη) και το ισοΐντικο, τα οποία είναι ισομερή μόρια, και η ιντιρουπίνη (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Χημική δομή των ινδολικών δακτυλίων και των οξειδωμένων παραγώγων ινδοξύλιο και ισάτης, μόρια που αποτελούν τα δύο πρόδρομα προϊόντα των ιντικοειδών (ιντιρουπίνη, ίντικο και ισοΐντικο).

Τα ιντικοειδή έχουν ταυτοποιηθεί και από άλλες δύο πηγές: 1) τα ούρα των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου και 2) από ποικιλία φυσικών ή ανασυνδυασμένων βακτηρίων. Ιντικο και ιντιρουπίνη έχουν βρεθεί στα ούρα ασθενών όσο και υγιών ανθρώπων (Adachi et al., 2001). Ο σχηματισμός τους σχετίζεται με τον μεταβολισμό της τρυπτοφάνης. Φαίνεται ότι η τελευταία, με την επίδραση των εντερικών βακτηρίων μετατρέπεται σε ινδόλιο, το οποίο οξειδώνεται στο ήπαρ σε ινδοξύλιο και συζευγνύται με θειϊκό οξύ. Το ινδοξύλιο στη συνέχεια εκκρίνεται στα ούρα με την μορφή του θειϊκού παραγώγου, το οποίο με την επίδραση βακτηρίων των ούρων δίνει εκ νέου ινδοξύλιο και ισατίνη, τα οποία παρουσία αέρα διμερίζονται και δίνουν ιντικοειδή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η παρουσία των ιντικοειδών στα ούρα είναι πολύ μικρή και ποικίλει ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, την ύπαρξη εγκυμοσύνης κτλ. Στην περίπτωση ορισμένων ασθενειών, όπως για παράδειγμα σε νεφρική ανεπάρκεια, ηπατοκαρκίνωμα και νόσο του Crohn, η παραγωγή ιντικοειδών αυξάνεται σημαντικά.

Ιστορική Αναδρομή

Η χρήση χρωστικών ιντικοειδούς φύσης, φυτικής προέλευσης, είναι γνωστή από το το 1700 περίπου π.Χ, με προέλευση τους θαλάσσιους οργανισμούς (κόκκινες χρωστικέςπορφύρα) (Meijer et al., 2003), και με κύρια χρήση τη βαφή υφασμάτων και διαφόρων έργων τέχνης. Η διάσημη, ανθεκτική ακόμη και στην τροπική βροχή, βαφή Maya Blue (MB) περιέχει ίντιγκο και ιντιρουπίνη και προέρχεται από τα φυτά του γένους *Indigofera* (Fabaceae)(Guengerich et al., 2004). Μια άλλη πηγή της χρωστικής, βάση της οποίας είναι τα ιντικοειδή, είναι τα γαστερόποδα μαλάκια των οικογενειών Muricidae και Thaididae. Αυτοί οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα μέρη του κόσμου για την παραγωγή μιας λαμπερής κόκκινης βαφής, γνωστής ως «Πορφύρα της Τύρου» (Tyrian purple) ή «Βασιλική πορφύρα» (Royal purple) στα παράλια της Μεσογείου. Η πρώτη χρήση της χρωστικής αυτής χρονολογείται γύρω στο 17° αιώνα π.Χ. σε τοιχογραφίες που βρέθηκαν στον αρχαιολογικό χώρο του Ακρωτηρίου στη Σαντορίνη, ενώ η παραγωγή της συνεχίζεται μέχρι και σήμερα.

Εκτός από τη χρήση των ιντικοειδών ως χρωστικές ύλες, υπάρχουν αναφορές και για τη φαρμακευτική τους χρήση. Στην Κίνα, Ινδία και Αρχαία Αίγυπτο όπου χρησιμοποιείται μέχρι τώρα η παραδοσιακή μη συμβατική θεραπευτική προσέγγιση, αλλά και από τον Ιπποκράτη, τον Πλίνιο και τον Γαληνό, γινόταν χρήση φυσικών πηγών ιντιρουπίνης, «colour cure», για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων όπως οι οφθαλμικές και δερματολογικές παθήσεις, ο βήχας και τα εντερικά παράσιτα (Balfour-Paul, 1999).

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η ιντιρουπίνη έχει χρησιμοποιηθεί στη Κίνα για την αντικαρκινική της ιδιότητα. Συγκεκριμένα, το φαρμακευτικό σκεύασμα Danggui LongHui Wan, χρησιμοποιήθηκε τη δεκαετία του 1960 για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML). Η συνταγή αυτή συμπεριλάμβανε 11 διαφορετικές ουσίες φυτικής προέλευσης. Η δραστικότητα του σκευάσματος αποδόθηκε σε ένα από τα συστατικά το οποίο προεργόταν από τα φύλλα του φυτού Indigofera tinctoria L. (Fabacea). Περιείγε υψηλές συγκεντρώσεις ίντικο και σε αρκετά χαμηλότερες (0,11%) ιντιρουπίνη, στην οποία και αποδόθηκε η αντι-λευχαιμική δράση του σκευάσματος, βάσει των κλινικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν (Xiao, Hao, Liu, & Qian, 2002). Συγκεκριμένα σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία στους οποίους χορηγήθηκε το φαρμακευτικό σκεύασμα παρατηρήθηκε πλήρης ή μερική αιματολογική ανάνηψη σε σημαντικά ποσοστά της τάξεως του 30% για κάθε περίπτωση. Οι σημαντικές παρενέργειες που παρατηρήθηκαν από το γαστρεντερικό σύστημα των ασθενών, σε συνδυασμό με τη μικρή βιοδιαθεσιμότητα της ιντιρουπίνης σταμάτησε τη θεραπευτική χορήγηση της ουσίας και οδήγησε στην ανάγκη εξεύρεσης και σύνθεσης νέων παραγώγων της ιντιρουπίνης με βελτιωμένες ιδιότητες ("[Clinical and experimental studies in the treatment of chronic granulocytic leukemia with indirubin (author's transl)]," 1979; Xiao, et al., 2002).

Από το 2001, η κυβέρνηση της Κίνας έχει εγκρίνει τη χρήση ενός συνθετικού αναλόγου της ιντιρουπίνης, του meisoindigo, το οποίο εμφάνισε παρόμοια κλινικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της λευχαιμίας με τον αλκυλιωτικό αντικαρκινικό παράγοντα busulfan (σκεύασμα που χρησιμοποιείται για την θεραπεία της CML), με μειωμένες όμως παρενέργειες οι οποίες εξαφανίζονται δύο εβδομάδες μετά την διακοπή χορήγησης του φαρμάκου. Η βελτιωμένη δραστικότητα του meisoindigo και οι μειωμένες παρενέργειες σε σχέση με την ιντιρουπίνη αποδόθηκαν στην αυξημένη βιοδιαθεσιμότητά του (Xiao, et al., 2002) (Xiao et al., 2006).

Μετά τον προσδιορισμό του μοριακού μηχανισμού δράσης της ιντιρουπίνης σχεδιάστηκαν και αναπτύχτηκαν ποικίλα παράγωγά της, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές ή παρασκευάστηκαν μέσω της χημικής οδού. Το μεγαλύτερο πρόβλημα όπως έχει αποδειχθεί, στη χρήση των ιντιρουπινών σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα, είναι η μεγάλη υδροφοβικότητα που παρουσιάζουν, η οποία δεν επιτρέπει την εύκολη χορήγηση και απορρόφησή τους από τους ιστούς και οδηγεί σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα. Η έλλειψη της υδατοδιαλυτότητας μπορεί να οδηγήσει σε αντιφατικά ή εσφαλμένα αποτελέσματα, αφού πολλά από τα παράγωγα αυτά μπορεί να καταβυθιστούν σε υδατικά συστήματα χορήγησης ή

Εδώ και μια δεκαετία, η ιντιρουπίνη και τα παράγωγα της έχουν χαρακτηριστεί ως φαρμακολογικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, με κυριότερο στόχο τις κυκλοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) (Nam et al., 2005; Perabo et al., 2006; Yamaguchi et al., 2002). Οι CDKs είναι μόρια σημαντικά σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου και δυσλειτουργία αυτών όπως και των ρυθμιστών τους, έχουν συσχετιστεί με την καρκινογένεση (Vermeulen, Van Bockstaele, & Berneman, 2003). Βάσει αυτών, οι CDKs, αποτελούν πρωταρχικό στόχο για το σχεδιασμό και ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Μία μελέτη της ανασταλτικής δράσης των ιντιρουπινών ενάντια στις CDKs καθόρισε το IC₅₀ της στα 50-100 nM και για άλλες κινάσες στα 1-10 μ M (Hoessel et al., 1999). OI Leclerc και συνεργάτες αναφέρουν ότι οι ιντιρουπίνες παρουσιάζουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης συνθετάση του γλυκογόνου (GSK-3b) με IC₅₀ 5-50 nM (Leclerc, et al., 2001). Οι κινάσες GSK-3b αποτελούν σημαντικό στοιχείο του μονοπατιού μετάδοσης wint (Wnt). Εμπλέκονται διάφορες φυσιολογικές σήματος σε διεργασίες συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού κύκλου μέσω της ρυθμιστικής τους δράσης στην κυκλίνη D1 και τη β-κατενίνη. Μία πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι με καταστολή της GSK-

3b σε ποντίκια με πολλαπλό μυέλωμα, παρατηρήθηκε αναστολή της επαγόμενης οστεοανάπλασης και της ανάπτυξης οστεολυτικών βλαβών στα οστά (Wang et al., 2009). Η GSK-3b όπως και η CDK5 παίζουν σημαντικό ρόλο στην νόσο του Alzheimer επάγοντας τη δημιουργία των νευροϊνιδιακών δικτύων (NFT). Η χρήση αναστολέων των κινασών, όπως είναι τα παράγωγα της ιντιρουπίνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη νόσο του Alzheimer (Leclerc, et al., 2001). Εκτός από αυτά, τα παράγωγα ιντιρουπινών αναστέλλουν και τη σηματοδοτική οδό του STAT-3 και του NF-κB, δύο μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και στον αντι-αποπτωτικό τους χαρακτήρα (Nam, et al., 2005). Το μονοπάτι STAT είναι γνωστός ρυθμιστής σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η ανοσοαπάντηση. Ένα ανάλογο της ιντιρουπίνης, το E804, εμποδίζει την φωσφορυλίωση, άρα και την ενεργοποίηση των STAT-3 πρωτεϊνών, οδηγώντας στη μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών survivin και Mcl-1 και στη συνέχεια στον κυτταρικό θάνατο (Nam, et al., 2005). Ο συνδυασμός του E804 με το ABT-869 (έναν αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης), προκάλεσε την ανάκτηση της ευαισθησίας των ανθεκτικών στο ABT-869, MV4-11 κύτταρων, καταστέλλοντας την ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού STAT, και αναστέλλοντας την έκφραση της πρωτεΐνης survivin (Nam, et al., 2005). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα ανάλογα της ιντιρουπίνης ευαισθητοποιούν ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα σε στοχευμένες αντικαρκινικές θεραπείες.

Ως δραστικότερα παράγωγα της ιντιρουπίνης χαρακτηρίστηκαν αυτά που φέρουν υδρόφιλες ομάδες στη 3΄ θέση, χωρίς αυτό να αντιστοιχεί σε απόλυτο κανόνα (Meijer, et al., 2003; Ribas et al., 2006). Βέβαια πολλές φορές η αυζημένη κυτταροτοξικότητα που παρατηρήθηκε *in vitro*, δεν παρατηρήθηκε και *in vivo* λόγω της μειωμένης πρόσληψης των παραγώγων από τα κύτταρα και τους ιστούς. Παρόλα τα θετικά και ελπιδοφόρα *in vitro* αποτελέσματα που δημοσιεύονται, δεν υπάρχουν πολλές *in vivo* μελέτες για τη δράση της ιντιρουπίνης και των παραγώγων της. Σε μία μελέτη σε αρουραίους Sprague-Dawley εξέτασαν την αντικαρκινική δράση 3 παραγώγων της ιντιρουπίνης σε επαγόμενο καρκίνο των νεφρών, και διαπιστώθηκε μείωση της ανάπτυξης του όγκου μετά από δέκα ημέρες χορήγησης των ουσιών (Kim et al., 2007). Όπως έχει αποδειχθεί, το μεγαλύτερο πρόβλημα με την χρήση των ιντιρουπινών *in vitro* και *in vivo*, είναι η μεγάλη υδροφοβικότητα που παρουσιάζουν, με αποτέλεσμα την μειωμένη βιοδιαθεσιμότητά τους.

Στο εργαστήριο του συνεργάτη μας Καθηγητή Δρ. Λ. Σκαλτσούνη (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών), συντέθηκαν παράγωγα της ιντιρουπίνης με κυριότερο στόχο να διερευνηθεί η σχέση δομήςδράσης, να αυξηθεί η δραστικότητα και η εκλεκτικότητα της μοριακής τους στόχευσης και να διατηρηθεί η δράση αυτή *in vivo*, ώστε να μπορέσουν τα μόρια αυτά να αποκτήσουν αξία στην κλινική καθημερινή πρακτική. Συντέθηκαν δύο ανάλογα της ιντιρουπίνης, τα 6bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) και 7-bromo-indirubin-3'-oxime (7BIO), με υδρόφιλες υποκαταστάσεις στη θέση 3' και διαπιστώθηκε ότι πραγματικά βελτιώθηκε η διαλυτότητά τους όπως και η απορροφητικότητά τους. Επίσης αξιολογήθηκε η κυτταροτοξική τους δράση έναντι καρκινικών κυττάρων όπως επίσης και η βελτιωμένη ανασταλτική τους δραστικότητα στις κινάσες CDKs και GSK-3 (Ribas, et al., 2006).



Εικόνα 12: Η χημική δομή των μορίων (A) 6BIO και (B) 7BIO (Nicolaou et al., 2012)

Αν και οι διαφορές μεταξύ τους όσο αφορά την χημική τους δομή είναι πολύ μικρές, η βιολογική τους δράση διαφέρει πάρα πολύ. Φαίνεται ότι τα δύο συνθετικά ανάλογα ενεργοποιούν διαφορετικά μοριακά μονοπάτια και έτσι διαφέρει και η απαντητικότητα των καρκινικών κυττάρων στα δύο αυτά μόρια. Το 6BIO είναι ένας ισχυρός αναστολέας της CDK1/Cyclin B (IC₅₀=0,320 μM), CDK5/P25 (0,083 μM) και GSK-3 (0,005 μM), ενώ αντίθετα το 7-BIO είναι ένας ασθενής αναστολέας με IC₅₀ 22 μM, 33 μM και 32 μM, αντίστοιχα για κάθε υπόστρωμα που προαναφέραμε (Ribas, et al., 2006). Με βάση τη δομή της, η 6BIO έχει προταθεί ότι μπορεί να δράσει ως αναστολέας της (PDK1) και αυτό επιβεβαιώθηκε με *in vitro* δοκιμασία ελέγχου της δραστικότητας της κινάσης, όπου παρατηρήθηκε καταστολή της ενδοκυττάριας φωσφορυλίωσης των PDK1 υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα την καταστολή της μετάστασης ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία είναι άμεσα εξαρτώμενη από την PDK1 (Zahler et al., 2007).

Το 6BIO και 7BIO έχουν χαρακτηριστεί στο να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο σε ποίκιλες καρκινικές σειρές, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν έχει προσδιοριστεί, Επίσης, μέχρι σήμερα υπάρχει αντιφατικότητα σχετικά με τα μοριακά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από την κάθε ουσία. Το 6ΒΙΟ δρά αποπτωτικά σε ποικίλες καρκινικές σειρές, όπως εντέρου (HT-29, HCT116), μαστού (MDA-MB-231), πνεύμονα (A549), προστάτη (PC3), ήπατος (5L, BP8, F1, Huh7), νευροβλαστώματος (SHSY5Y) και μελανώματος (A2058) (Ferandin et al., 2006; L. Liu et al., 2011; Meijer, et al., 2003; Ribas, et al., 2006; Vougogiannopoulou et al., 2008). Αντιθέτως, το 7BIO έχει αναφερθεί να επάγει ραγδαία τον κυτταρικό θάνατο σε ποικίλες καρκινικές σειρές όπως είναι του νευροβλαστώματος (SH-SY5Y), λευχαιμίας (Jurkat) και μαστού (MDA-MB-231) (Ribas, et al., 2006; Ribas et al., 2008), ο οποίος όμως δεν έχει τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης. Ο επαγόμενος από την 7ΒΙΟ κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μεγάλου πυκνωτικού πυρήνα και δεν συνοδεύεται από απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ούτε από ενεργοποίηση των κασπασών. Επιπλέον, η διαδικασία θανάτου δεν ανατρέπεται με την προσθήκη αναστολέων των κασπασών, ούτε με υπερέκφραση των Bcl-2 και Bcl-XL, προτείνοντας ότι το 7BIO επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης (Ribas, et al., 2006; Ribas, et al., 2008).

Επιστημονική υπόθεση και ειδικοί στόχοι της διατριβής

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση δομικών αναλόγων φαρμακευτικών σκευασμάτων με μειωμένη τοξικότητα στον άνθρωπο, καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα *in vivo* και αυξημένη αντικαρκινική δραστικότητα αποτελούν ένα ερευνητικό πεδίο με άμεσες φαρμακολογικές εφαρμογές. Η ιντιρουπίνη ανήκει σε αυτή την ομάδα σκευασμάτων, όπου οι έντονες παρενέργειες, σε συνδυασμό με τη μικρή βιοδιαθεσιμότητά της οδήγησαν στην ανάγκη εξεύρεσης και σύνθεσης νέων παραγώγων της.

Στο εργαστήριο του συνεργάτη μας Καθηγητή Δρ. Λ. Σκαλτσούνη συντέθηκαν δύο ανάλογα της ιντιρουπίνης, τα 6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) και 7-bromo-indirubin-3'-oxime (7BIO), με βελτιωμένη διαλυτότητα στο νερό και καλύτερη απορροφητικότητα (Ribas, et al., 2006). Επίσης τα δύο ανάλογα παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και βελτιωμένη ανασταλτική δράση στις κινάσες CDKs και GSK-3 (Leclerc, et al., 2001; Meijer, et al., 2003; Ribas, et al., 2006). Βάσει των στοιχείων που έχουμε φαίνεται πως οι ουσίες 6BIO και 7BIO επάγουν αντικαρκινική δράση χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς, οι οποίοι δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί. Σκοπός μας λοιπόν ήταν να μελετήσουμε την δραστικότητα των ουσιών αυτών έναντι καρκινικών κυττάρων του προστάτη, οστεοσαρκώματος και μαστού, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, διερευνώντας τους ακριβείς μηχανισμούς της αντικαρκινικής τους δράσης.

Υποθέσαμε ότι ένα ή περισσότερα ανάλογα της ιντιρουπίνης παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση, η οποία οφείλεται είτε στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ή στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε αυτά ή στην αναστολή της διείσδυσης και μετάστασής τους ή συνδυασμό αυτών των φαινομένων. Προς εξέταση της υπόθεσής μας τέθηκαν 5 στόχοι που αφορούσαν την διερεύνηση:

- του μηχανισμού αναστολής του πολλαπλασιασμού και επαγωγής κυτταρικού θανάτου σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PC3 και DU145 και οστεοσαρκώματος KHOS από τις ουσίες 6BIO και 7BIO,
- (2) του μηχανισμού αναστολής της διεισδυτικής και μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3 και DU145 και οστεοσαρκώματος KHOS από τις ίδιες ουσίες,

- (3) της πιθανής ικανότητας των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ να αναστρέφουν την ανθεκτικότητα των υπό μελέτη καρκινικών σειρών έναντι χημικοθεραπευτικών ουσιών,
- (4) της δράσης των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ, των αποπτωτικών ουσιών TRAIL και Apomab, καθώς και των συνδυασμό αυτών σε καρκινικά κύτταρα προστάτη και της δράσης των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε δύο διαφορετικά *in vivo* πειραματικά μοντέλα (ι) Μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό μαστού ποντικού (mammary fat pat mouse model) και (ιι) Μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών στην κνήμη ποντικού (osteosarcoma intratibial mouse model).

Αναλυτικότερα, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε αφορούσε:

Για την επίτευξη του πρώτου στόχου, καρκινικά κύτταρα προστάτη (DU145 και PC3), οστεοσαρκώματος (KHOS) και μαστού (MDA-MB-231-TXSA) επωάστηκαν με τις ουσίες 6BIO και 7BIO και στη συνέχεια με τις τεχνικές χρώσης κρυσταλικού ιώδους (Crystal Violet) και MTT καθορίστηκε η κυτταροτοξικότητά τους ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο επώασης. Στη συνέχεια, με τη χρήση μορφολογικών κριτηρίων, χρησιμοποιώντας χρώση DAPI, με μεθόδους ανίχνευσης της δραστικότητας της κασπάσης-3, ELISA για την ανύχνευση κυτταρικού θανάτου, Κυτταρομετρία ροής και ανοσοδοκιμασία Western Blot διερευνήσαμε τον ακριβή μηχανισμό επαγωγής του κυτταρικού θανάτου.

Για την επίτευξη του δεύτερου στόχου, οι κυτταρικές σειρές KHOS, PC3 και DU145 επωάστηκαν με τις ουσίες 6BIO και 7BIO και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* μέθοδοι ταυτοποίησης της διεισδυτικότητας των κυττάρων, όπως το invasion assay. Επίσης με Western blot προσδιορίστηκε η έκφραση πρωτεασών MMPs και του uPA, και με τεστ χρωμογονικού υποστρώματος (chromogenic substrate assay) η ενεργότητα του uPA συστήματος.

Για τον τρίτο στόχο, κύτταρα από καρκίνο του μαστού τα οποία είναι ανθεκτικά στα υπό κλινική αξιολόγηση αντικαρκινικά φάρμακα Apomab και TRAIL (κυτταρική σειρά MDA-MB-231-TXSA-R) επωάστηκαν με τις ουσίες μας σε συνδυασμό με το Apomab και το TRAIL αντίστοιχα, για να δούμε κατά πόσο επανακτάται η ευαισθησία τους στα φάρμακα αυτά.

Για τον τέταρτο στόχο, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του προστάτη PC3, DU145 και LNCaP που επωάστηκαν με τις ουσίες μας σε συνδυασμό με το Apomab και το TRAIL, για να διαπιστωθεί κατά πόσο ενισχύεται η αντικαρκινική τους δράση με τον συνδυασμό. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική MTT για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων, και τη

χρώση DAPI, μεθόδους ανίχνευσης της δραστικότητας της κασπάσης-3 και ανοσοδοκιμασία Western Blot για τον προσδιορισμό της αποπτωτικής δράσης των ουσιών.

Τέλος, για τον πέμπτο στόχο, πραγματοποιήθηκε *in vivo* μελέτη των ουσιών μας χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό μαστού ποντικού.

Υλικά και μέθοδοι

Το πρόγραμμα εκπονήθηκε σε δύο εργαστήρια: (ι) στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου και Χημειοπροφύλαξης του Τμήματος Βιολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κύπρου, και σε συνεργασία (ιι) στο Εργαστήριο μελέτης καρκίνου του μαστού και καρκίνου στα οστά (Bone and breast cancer research laboratoyry), του Adeilaide University στην Αυστραλία, τα οποία διαθέτουν την υποδομή, την κατάλληλη τεχνογνωσία, εξειδικευμένα συστήματα ελέγχου μηχανισμών καρκινογένεσης και αποκρίσεων σε νέες μεθόδους παρέμβασης, καθώς και την εμπειρία για να εκπονηθούν οι αντίστοιχες ενότητες εργασίας, όπως αναφέρονται πιο κάτω.

Κρυοδιατήρηση

Εξαιτίας των μεταβολών που πιθανόν να παρουσιάσουν τα υπό καλλιέργεια καρκινικά κύτταρα, είναι απαραίτητο το πάγωμα και η αποθήκευσή τους ώστε η κάθε κυτταροκαλλιέργεια να μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί. Για την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων και καταστροφής των μεμβρανών χρησιμοποιείται το κρυοπροστατευτικό μέσο διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO). Τα κύτταρα φυλάσσονται στο διάλυμα ψύξης που περιέχει 90% πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και 10% DMSO. Τα κύτταρα τοποθετούνται στους -196 °C στο υγρό άζωτο.

Κυτταροκαλλιέργεια

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές σειρές προστάτη PC3, LNCaP και DU145, οστεοσαρκώματος KHOS και μαστού (MCF-7, ZR75, MDA-MB-231, MDA-MB-468 και MDA-MB-231-TXSA, MDA-MB-231-TXSA-R). Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε φλάσκες εμβαδού 75 cm². Οι καρκινικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο "Dulbecco's modified Eagle's medium" (D-MEM) με ερυθρό φαινόλης (phenol red) (Gibco, ή Invitrogen), το οποίο εμπλουτίζεται με 1% L-γλουταμίνη (Gibco, Invitrogen), 1% πενικυλίνη/αμπικυλίνη και 10% φυσιολογικού ζωϊκού ορού FBS, το οποίο αποτελεί πλήρες θρεπτικό υλικό. Η προσθήκη φυσιολογικού ζωϊκού ορού είναι σημαντική γιατί υποκαθιστά πολλά από τα ορμονικά και θρεπτικά στοιχεία τα οποία υπάρχουν στο περιβάλλον των κυττάρων *in vivo*. Τα κύτταρα αφήνονται για ανάπτυξη σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C και 5% CO₂.

Μέτρηση κυττάρων

Αρχικά τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS (Phosphate-Buffered Saline, 8 g/l NaCL, 0,2 g/l KCL, 1,44 g/l Na₂HPO₄.2H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄), και στην συνέχεια αποκολλώνται με την χρήση θρυψίνης. Τα κύτταρα συλλέγονται με την βοήθεια μικρής ποσότητας θρεπτικού μέσου (με ορό) που βοηθά στην απενεργοποίηση της θρυψίνης. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται μέσω της χρώσης με κυανό του τρυπανίου (trypan blue) σε αναλογία 1:1, με την χρήση αιμοκυτταρομέτρου (haemocytometer) και την άμεση μέτρησή τους στο μικροσκόπιο. Το trypan blue έχει την ικανότητα να χρωματίζει κύτταρα με κατεστραμμένες μεμβράνες, και έτσι ελέγχεται η συγκέντρωση νεκρών ή αποπτωτικών κυττάρων μέσα στο διάλυμα.

Μέτρηση της βιωσιμότητας κυττάρων

Μέθοδος ΜΤΤ

Για τις κυτταροτοξικές αναλύσεις, τα κύτταρα τοποθετούνται σε μικροπλάκα 96 φρεατίων (96-well plate) σε συγκέντρωση (1 x 10^5 /well), σε πλήρες θρεπτικό και αφήνονται το βράδυ για να επικολληθούν στον πυθμένα του φρεατίου. Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με διάφορες συγκεντρώσεις 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ και με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις TRAIL (100 ng/ml) και Apomab (100 ng/ml), καθώς και τους συνδυασμούς αυτών, για 24 και 48 ώρες. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογείται με την τεχνική ΜΤΤ, ώστε να διαπιστωθεί η μεταβολική ικανότητα των κυττάρων η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης των ζωντανών κυττάρων. Το αντιδραστήριο MTT περιέχει σε συγκέντρωση 10 mg/ml την ουσία 3-(4,5-Dimethyliazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide ή αλλιώς άλας του τετραζολίου, η οποία έχει την ιδιότητα να ανάγεται από τα λειτουργικά ένζυμα του μιτοχονδρίου και να σχηματίζει αδιάλυτους κρυστάλλους της μπλε ουσίας φορμαζάνης (Formazan). Αυτή η ιδιότητα καθιστά το MTT ιδανικό για τον προσδιορισμό των ζωντανών κυττάρων. Ύστερα από επώαση 4 ωρών με το διάλυμα ΜΤΤ, το υδατικό διάλυμα που περιβάλει τα κύτταρα απομακρύνεται και τα τελευταία λύονται με DMSO. Στο διάλυμα αυτό η ουσία Formazan είναι διαλυτή και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να χρωματίζεται το περιεχόμενο κάθε φρεατίου ανάλογα με το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων.

Για να προσδιορίσουμε αν ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων ήταν εξαρτώμενος από τις κασπάσες, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας κασπασών (z.VAD.fmk) σε συγκέντρωση 20 μM,

ο οποίος διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και δρα μη αντιστρεπτά αναστέλλοντας όλες τις κασπάσες του κυττάρου μέσω πρόσδεσης στην καταλυτική τους περιοχή.

Τέλος γίνεται φωτομέτρηση της απορρόφησης στα 570nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.

Μέθοδος με χρήση της χρωστικής κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet)

Επίσης για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική χρώσης με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet staining assay). Μετά την λήξη της επώασης των κυττάρων (1 x 10^5 / well) με τις ουσίες, τα φρεάτια ξεπλένονται με 200 μl PBS και γίνεται προσθήκη 100 μl Φορμαλίνης (10 %) για 5 λεπτά. Η φορμαλίνη μονιμοποιεί τα κύτταρα στον πυθμένα του φρεατίου. Ακολούθως η φορμαλίνη απομακρύνεται και προστίθενται 100 μl χρωστικής Κρυσταλικό Ιώδες για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το κρυσταλλικό ιώδες, είναι χρωστικής Κρυσταλικό Ιώδες για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το κρυσταλλικό ιώδες, είναι χρωστική ουσία η οποία προσδένεται στην ελάσσονα αύλακα του DNA των κυττάρων και με αυτό τον τρόπο χρωματίζει τα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με 200 μl ddH₂O για απομάκρυνση της χρωστικής και η μικροπλάκα αφήνεται να στεγνώσει. Την επόμενη ημέρα προστίθενται 100 μl CH₃COOH (10 %) για 15 λεπτά. Ο σκοπός του CH₃COOH είναι να λυθούν τα κύτταρα και να απελευθερωθεί η χρωστική στο διάλυμα. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε καθαρή μικροπλάκα 96 φρεατίων επιπέδου πυθμένα, στην οποία προσθέτουμε ακόμη 100 μl CH₃COOH. Τέλος γίνεται φωτομέτρηση της απορρόφησης στα 570nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.Ε. από τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.

Χρώση με DAPI

Στον πυθμένα μικροπλάκας 12 φρεατίων (12-well plate) τοποθετούνται καλυπτρίδες ειδικές για την καλλιέργεια κυττάρων. Σε κάθε καλυπτρίδα τοποθετούνται 1X10⁵ καρκινικά κύτταρα PC3, LNCaP, DU145 και MDA-MB-231-TXSA τα οποία αφήνονται στο κλίβανο στους 37 °C, 5% CO₂, για 2 ώρες. Στην συνέχεια τοποθετούνται 500 μl θρεπτικού μέσου και οι πλάκες αφήνονται για 24 ώρες στον κλίβανο. Μετά το πέρας 24 ωρών το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και αντικαθίσταται με φρέσκο θρεπτικό μέσο ή με θρεπτικό μέσο στο οποίο εμπεριέχονται διαλυμένες οι υπο μελέτη ουσίες σε συγκεντρώσεις 15 μM για τις 6BIO και 7BIO και 100 ng/ml για τα TRAIL και Apomab, και συνδυασμούς αυτών. Στην συνέχεια τα κύτταρα αφήνονται για 12 ώρες στο κλίβανο. Μετά το πέρας των 12 ωρών, το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και τα κύτταρα και οι καλυπτρίδες ξεπλένονται με PBS. Στη συνέχεια επωάζονται με 1 μg/ml χρωστικής DAPI (4',6'-diamodino-2-phenylindole) για 10 λεπτά, στο σκοτάδι. Τέλος, οι καλυπτρίδες ξεπλένονται ξανά με PBS και κάθε μία αφαιρείται από το φρεάτιο και τοποθετείται ανάποδα σε αντικειμενοφόρους πλάκες στις οποίες έχουμε τοποθετήσει από πριν μικρή ποσότητα mounting gel (ProLong anti-fade). Η μορφολογία του πυρήνα των κυττάρων παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (ZEISS, Axio Observer. A1, HB100 Microscope Illuminating System), σε μήκος κύματος 350 nm. Η διαδικασία γίνεται με όσο το δυνατό λιγότερο φως.

Ποσοτική μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας της κασπάσης-3:

Η αξιολόγηση της ενζυματικής δραστηριότητας της κασπάσης-3 θεωρείται ως αξιόπιστη μέθοδος για τον έλεγχο της απόπτωσης. Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα της κασπάσης-3 να χρησιμοποιεί μια Cys της σαν πυρηνόφιλο για την εκλεκτική διάσπαση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στο καρβοξυλικό άκρο ενός υπολείμματος Asp. Αρκετά από τα πρωτεϊνικά αυτά υποστρώματα, σχετίζονται άμεσα με τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την επαγωγή απόπτωσης. Για παράδειγμα η διάσπαση της πολυμεράσης PARP οδηγεί στην αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA, ενώ η διάσπαση του αναστολέα ICAD προκαλεί κατακερματισμό DNA που οδηγεί τελικά στην απόπτωση. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματα βασισμένα στην ακολουθία-στόχο της κασπάσης-3 όπως είναι η Asp-Glu-Val-Asp η οποία έχει σημανθεί με την 7-αμινο-4τριφθορομεθυλο-κουμαρίνη (AFC) στο καρβοξυτελικό άκρο του Asp. Η ποσοτική εκτίμηση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του ελευθέρου AFC που παράγεται. Όταν το AFC είναι προσδεδεμένο στο υπόστρωμα, αναδεικνύει κυανό φθορισμό κατά την έκθεση του σε ακτινοβολία UV (400nm). Η κασπάση-3 διασπά το σύμπλοκο AFCυπόστρωμα και απελευθερώνει το AFC, το οποίο αναδεικνύει κίτρινο-πράσινο φθορισμό στα 505 nm όταν εκτίθεται σε ακτινοβολία UV.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μικροπλάκες των 96 φρεατίων και μετά από 24 ώρες επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 24 και 48 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε και απομονώθηκαν τα κύτταρα που επέπλεαν. Τα προσκολλημένα κύτταρα μαζί με το ίζημα των μη προσκολλημένων κύτταρων ξεπλύθηκαν μία φορά με PBS και μεταφέρθηκαν σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που περιείχε 5 mM Tris-HCl, 5 mM

EDTA και 0,5% NP-40C (pH 7,50). Μετά από 30 λεπτά επώασης στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης στους 4⁰C, το αδιάλυτο υλικό φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 4 λεπτά στους 4 ⁰C. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με χρήση BCA (Bicinchoninic Acid solution + Cooper (II) sulfate solution) protein assay kit (Sigma, Taufkirchen, Germany). Ποσότητα 50 μg πρωτεΐνης εξετάστηκε για την ενεργότητα της caspase-3. Κάθε δοκιμασία περιείχε 8 μM του υποστρώματος (zDEVD-AFC), (Kamiya, Seattle, Washington, USA), σε 1 mL του ρυθμιστικού διαλύματος πρωτεασών (50 mM HEPES, 10% σακχαρόζη, 10 mM dithiothreitol [DTT], 0,1% CHAPS, pH 7,40) και \approx 20 μL του κυτταρικού λύματος. Οι αρνητικοί μάρτυρες περιείχαν την ίδια τελική συγκέντρωση DMSO (< 0,1%) με τις υπό μελέτη ουσίες. Μετά από 4 ώρες επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, ο φθορισμός (διέγερση 400 nm, εκπομπή 505 nm) ποσοτικοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση ενός αναγνώστη Perkin-Elmer εξοπλισμένου με λογισμικό Multilabel Counter 3.00. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.

ELISA για την ανίχνευση του κυτταρικού θανάτου

To "Cell Death Detection ELISA^{PLUS} photometric enzyme immunoassay", βασίζεται στην χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι DNA και ιστονών και χρησιμοποιείται για την *in vitro* ποσοτικοποίηση και καθορισμό της ύπαρξης μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων τα οποία προκύπτουν μετά την επαγωγή κυτταρικού θανάτου και κατάτμηση του DNA (cytoplasmic histone-associated DNA fragments (mono- and oligonucleosomes).

Τα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα (1 x 10⁵ κύτταρα/φρεάτιο), αναπτύσσονται σε μικροπλάκες των 96 φρεατίων και μετά από 24 ώρες επωάζονται με τις υπό μελέτη ουσίες. Στην συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 200 μl διάλυματος λύσης και μετά το πέρας των 30 λεπτών το υλικό φυγοκεντρείται στα 200 × g για 10 λεπτά. 20 μl από το υπερκείμενο μεταφέρεται σε μικροπλάκα 96 φρεατίων επικαλυμμένη με στρεπταβιδίνη και προστίθενται 80 μl αντιδραστηρίου το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα επώασης, αντίσωμα έναντι ιστονών συζευγμένο με βιοτίνη, (Anti-histone biotin) και αντίσωμα έναντι του DNA συζευγμένο με υπεροξειδάση (anti-DNA-POD). Η μικροπλάκα καλύπτεται και επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση. Το διάλυμα αφαιρείται και ξεπλένεται με 250–300 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης (Incubation Buffer). Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα ABTS και μετά από 25 λεπτά, η πλάκα φωτομετρείται στα 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.

Εκτίμηση της απόπτωσης με τη μέθοδο TaliTM

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 60-mm² και επωάστηκαν με 6BIO (15 μM) και 7BIO (15 μM) για 24-48 ώρες. Στην συνέχεια με τη χρήση θρυψίνης τα κύτταρα συλλέγονται από το τρυβλίο, ξεπλένονται με PBS, φυγοκεντρώνται και προστίθεται χρωστική annexin-V Alexa Fluor® 488/PI όπως περιγράφεται στο TaliTM apoptosis kit, Invitrogen, (Carlsbad, CA). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το χημειοθεραπευτικό σκεύασμα etoposide (100 μg/ml). Με την χρήση του κυτταρόμετρου TaliTM Image-based Cytometer, προσδιορίζονται τα ποσοστά των ζωντανών, νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων μετά την δράση των υπό μελέτη ουσιών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.

Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

MDA-MB-231-TXSA κύτταρα (3 x 10⁶), επωάζονται παρουσία ή απουσία των 6BIO (15 μM) ή 7BIO (15 μM) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται και μονιμοποιούνται με 70% παγωμένη αιθανόλη για 2 ώρες στον πάγο. Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα χρωστικής Propidium Iodide (PI) (10 μg/ml PI and 0,2 mg/ml RNase A) για 45 λεπτά στους 37 °C και αναλύονται με την χρήση του αναλυτή κυτταρομετρίας ροής (Becton Dickinson Calibur flow cytometer). Το εκατοστιαίο ποσοστό κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου (Sub-G₁, G₀/G₁, S, G₂/M) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CellQuest 3.3 software.

Ανοσοδοκιμασία Western Blot

α. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών:

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες με τις υπό μελέτη ουσίες 6BIO (15μM), 7BIO (15μM), TRAIL (100 ng/ml), Apomab (100 ng/ml) και τους συνδυασμούς αυτών και ακολουθείται απομόνωση των πρωτεϊνών. Αρχικά φυγοκεντρείται το υπερκείμενο, στις 1200 rpm για πέντε λεπτά, ούτως ώστε να συλλεχθούν και τα κύτταρα που δεν ήταν προσκολλημένα στο τρυβλίο. Το ίζημα καθώς και τα προσκολλημένα στο τρυβλίο κύτταρα, αρχικά ξεπλένονται με PBS, και στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα RIPA (+ protease inhibitor 1:50, + PMSF 1:100). Στην συνέχεια με την βοήθεια υπέρηχων, επιτυγχάνεται διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και απελευθέρωση των πρωτεϊνών. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με την τεχνική του BCA (Bicinchoninic Acid solution + Cooper (II) sulfate solution) protein assay kit (Sigma, Taufkirchen, Germany) (όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο).

β: Ηλεκτροφόρηση και μεταφορά πρωτεϊνών:

Ποσότητα 50 μg πρωτεΐνης αραιώνεται σε 2 x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Loading Buffer:2,5% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0,15 Tris, 0,1% bromophenol blue). Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Στις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη 8%, 10% και 12%, με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών αναλόγως του μοριακού τους βάρους. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride). Πριν την προσθήκη του κατάλληλου αντισώματος γίνεται κατάληψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης με την προσθήκη 5% σκόνης γάλακτος διαλυμένης σε TBS-T (Tris-Buffered Saline with 1% Tween 20).

γ: Ανοσοεντοπισμός και Ανοσοεμφάνιση:

Οι πρωτεϊνικές ζώνες εντοπίζονται με την προσθήκη αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι ποικίλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο αποπτωτικό μονοπάτι, όπως είναι οι κασπάσες -3, -8 και -9 (αραίωση 1:1000), PARP (1:1000), Bax, FADD, p21, p53, υποδοχείς TRAIL (DR4 και DR5) και ως μάρτυρας αντίσωμα έναντι της ακτίνης (1:2000) από την εταιρία Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Μετά την προσθήκη του πρώτου αντισώματος, οι μεμβράνες αφήνονται όλο το βράδυ στους 4 ^OC με ανάδευση. Στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος είται έναντι ποντικού ή έναντι κουνελιού ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:5000. Σας μάρτυρας (ladder) χρησιμοποιήθηκε επισημασμένος με βιοτίνη μάρτυρας και για την ανίχνευση του χρησιμοποιήθηκε δευτερεύον αντι-βιοτίνη αντίσωμα σε αραίωση 1:1000. Η ανοσοεμφάνιση γίνεται στο σκοτεινό θάλαμο του μηχανήματος UVP μετά από την προσθήκη του υποστρώματος ECL (Santa-Cruz biotechnology, Germany) σε αναλογία 1:1.

Δοκιμασία διείσδυσης (Invasion assay)

Τα προστατικά καρκινικά κύτταρα PC3 και DU145 όπως επίσης και τα καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS, επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες μας σε συγκεντρώσεις όπου δεν παρουσιάζεται κυτταροτοξικότητα. Με την μέθοδο της δοκιμασίας διείσδυσης και την χρήση των θαλάμων τύπου Boyden (Boyden Chambers) γίνεται καθορισμός της δράσης των ουσιών στην διεισδυτικότητα των κυττάρων in vitro. Οι θαλάμοι τύπου Boyden τοποθετούνται σε μικροπλάκες 12 φρεατίων και επικαλύπτονται με 100 μl matrigel αραιωμένο σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού, (Serum Free (SF) media, $(150 \mu l \text{ Matrigel} + 2.85 \mu l \text{ SF} θρεπτικό μέσο, σε συγκέντρωση 0.5 μg/μl (1:20), το οποίο θα$ αποτελεί το μέσο διαπέρασης και διείσδυσης των κυττάρων. Τα κύτταρα τοποθετούνται στους θαλάμους Boyden και αφήνονται για 18 ώρες στους 37 °C με σκοπό να επικολληθούν στο matrigel. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα επωάζονται με 6BIO ή 7BIO αραιωμένα σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Στο κάτω μέρος των θαλάμων τοποθετούμε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 1% FBS, με σκοπό την προσέλκυση των κυττάρων ώστε να διαπεράσουν το matrigel. Μετά από 20 ώρες στους 37 °C προσδιορίζεται η διαφορά του αριθμού των καρκινικών κυττάρων τα οποία διείσδυσαν και διαπέρασαν την μεμβράνη του θαλάμου σε σχέση με τον μάρτυρα που είναι μη επωασμένα με τις ουσίες κύτταρα. Ο καθορισμός του αριθμού των κυττάρων αυτών γίνεται με την χρώση Κρυσταλικό Ιώδες και μέτρηση του εναιωρήματος σε φωτόμετρο στα 570nm.

Δοκιμασία ενεργότητας του uPA (uPA activity assay)

Το CHEMICON uPA Assay Kit, χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ενεργότητας του uPA στο υπερκείμενο καλλιεργημένων κυττάρων και την αξιολόγηση πιθανών καταστολέων του uPA. Βασίζεται στην ικανότητα του uPA να διασπά ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα το οποίο είναι σημασμένο με χρωμογόνο. Παρουσία του uPA στο δείγμα παράγεται χρώμα, το οποίο ανιχνεύεται με τη χρήση φωτόμετρου στα 405 nm.

Η τεχνική εφαρμόζεται στα κύτταρα DU145, PC3 και KHOS. Τα κύτταρα επωάζονται με τις υπό μελέτη ουσίες σε μικροπλάκα 96 φρεατίων για 24 και 48 ώρες. Στην συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται στις 1200 x rpm για 5 λεπτά. 120 μl από το υπερκείμενο μεταφέρεται σε μια μικροπλάκα 96 φρεατίων και προστίθεται 40 μl ddH₂O και 20 μl ρυθμιστικό διάλυμα. Στην συνέχεια προστίθεται 20 μl χρωμογόνο υπόστρωμα, και επωάζεται στους 37 °C για 10 min έως 24 h ανάλογα με το δείγμα που

χρησιμοποιείται. Όση περισσότερη ώρα επωαστεί τόσο πιο δυνατό είναι το σήμα. Τέλος μετριέται η απορρόφηση στα 405 nm.

Κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη έκφρασης των υποδοχέων θανάτου (DRs) στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του κυτταρομέτρου FACScan της εταιρείας Becton and Dickinson και του προγράμματος LYSIS II software. Οı γραφικές παραστάσεις δημιουργήθηκαν με την χρήση του WinMDI 2.8 software package. Τα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145, PC3 και LNCaP καλλιεργήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Την επόμενη μέρα ξεπλένονται με PBS και αποκολλώνται χρησιμοποιώντας 2 mM EDTA σε PBS σε θερμοκρασία 37°C για 5 λεπτά. Για την κυτταρομετρία ροής όλες οι επακόλουθες διαδικασίες πραγματοποιούνται στον πάγο και οι φυγοκεντρήσεις στους 4°C. Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS μέσω φυγοκέντρησης στα 200xg για 5 λεπτά. Για την ανάλυση της έκφρασης των υποδοχέων, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε συγκέντρωση 10⁷ κύτταρα/ml σε 2% παραφορμαλδεύδης σε PBS και επωάστηκε για 5 λεπτά. Προστέθηκε στην συνέχεια 10 ml PBS και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με (PBS + 0,1% αζίδιο). Με τη χρήση μονιμοποιητικού ρυθμιστικού διαλύματος τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν και επωάστηκαν για 10 λεπτά. Τα κύτταρα στην συνέγεια αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 2 x 10^6 κύτταρα/ml σε διάλυμα δέσμευσης (10% BSA/PBS + 0.1% Azide). 50 μl από το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο (polypropylene FACS tubes) και προστέθηκαν 50 μl διάλυματος μονοκλωνικού αντισώματος (monoclonal antibody mAbs). Μετά από 45 λεπτά τα κύτταρα ξεπλένονται και προστίθενται στο ίζημα 50 μl σημασμένων με FITC-F(ab')2 αντισωμάτων έναντι Ιg ποντικού που έχουν παραχθεί σε πρόβατο ή σημασμένων με PE αντισωμάτων έναντι Ig ποντικού που έχουν παραχθεί σε αραιωμένα σε διάλυμα δέσμευσης (1/50). Στην συνέχεια τα κύτταρα κατσίκα επωάζονται για αλλά 45 λεπτά σε σκοτεινές συνθήκες, ξεπλένονται και αραιώνονται σε 0,5 ml κρύας 1% w/v παραφορμαλδεΰδης για ανάλυση στο κυτταρόμετρο ροής.

In vivo πειραματικό μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό μαστού ποντικού (mammary fat pat mouse model)

Στόχος είναι να διερευνηθεί αν το 6BIO ή 7BIO μετά τη δημιουργία όγκου στο μαστικό αδένα, επιδρούν στην ανάπτυξη του καρκινικού όγκου και στη μετάστασή τους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια.

Ανοσοκατασταλμένα θηλυκά ποντίκια Balb/c Nu/Nu, ηλικίας τεσσάρων μέχρι έξι εβδομάδων, χρησιμοποιήθηκαν σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο, με σταθερή θερμοκρασία 23°C, και ρυθμιζόμενο φωτισμό εφαρμόζοντας ένα κύκλο 12 ωρών φως/σκοταδιού, σύμφωνα με το εγκεκριμένο από το IMVS Animal Research Committee πρωτόκολλο. Ακολουθήθηκαν όλοι οι εγκεκριμένοι κανονισμοί Ηθικής από την κυβέρνηση της Αυστραλίας. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων τα ποντίκια παρακολουθούνταν συνεχώς από ειδικό προσωπικό και εφαρμόζονταν δύο φορές την ημέρα παυσίπονες ενέσεις.

Μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στο λιπώδη ιστό μαστού ποντικού

Καρκινικά κύτταρα MB-231-TXSA-SFG τα οποία είναι επισημασμένα με φθορίζουσα πρωτεΐνη SFG καλλιεργούνται και στη συνέχεια τοποθετούνται σε εναιώρημα PBS σε συγκέντρωση 0,8x10⁶ κύτταρα/10 μl για την ένεση. Χρησιμοποιήθηκαν 15 Balb/c Nu/Nu ποντίκια ηλικίας 5 εβδομάδων και χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: (α) την ομάδα–μάρτυρα, όπου θα παρέχεται μόνο PBS, (β) την ομάδα του 6BIO, όπου θα χορηγείται η ουσία ενδοπεριτοναϊκά (ip) σε συγκέντρωση 30 mg/kg/δόση, και (γ) την ομάδα του 7BIO, όπου θα χορηγείται η ουσία με τον ίδιο τρόπο σε συγκέντρωση 30 mg/kg/δόση.

Οι χορηγήσεις των φαρμάκων γίνονται μία φορά την ημέρα, 5 μέρες την εβδομάδα. Κάθε εβδομάδα παρακολουθείται η πορεία των πειραματόζωων με την χρήση φθορισμού χορηγώντας τους το υπόστρωμα Λουσιφερίνη (0,03 g/ml, 30 mg/20g βάρους ποντικού) και μετά από μισή ώρα βάζουμε τα αναισθητοποιημένα με ισοφλουράνιο (isoflurane) ποντίκια σε μια συσκευή που μας επιτρέπει την άμεση παρακολούθηση των επισημασμένων κυττάρων και καταγραφή των μεταβολών του καρκινικού όγκου. Πριν την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη θανάτωση των ζώων, γίνεται συλλογή του πλάσματος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των 6BIO και 7BIO στον ορό του αίματος. Στη συνέχεια συλλέγονται όλα τα όργανα και ακολουθεί ανοσοϊστοχημεία για διερεύνηση πιθανών αλλαγών στην ιστολογία άλλων οργάνων. Επίσης συλλέγονται τα οστά από τα πόδια, στα οποία πρώτα γίνεται αξονική τομογραφία για να δούμε πιθανές οστεολυτικές ίσως και οστεοβλαστικές βλάβες. Στη συνέχεια τα οστά υπόκεινται σε ανοσοϊστοχημικό έλεγχο.

Στατιστικές προσεγγίσεις:

Οι αντινεοπλασματικές ιδιότητες των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ εκφράζονται ποσοτικά και τα αποτελέσματα αναλύονται με Student's t-test και ANOVA.

Αποτελέσματα

Για λόγους διευκόλυνσης, η ανάλυση των αποτελεσμάτων χωρίζεται σε τρεία μέρη με βάση τον μελετούμενο τύπο καρκίνου Οι ενότητες αφορούν:

- (α) τον καρκίνο του προστάτη,
- (β) τον καρκίνου του μαστού και

(γ) το οστεοσάρκωμα

Καρκίνος του προστάτη

3.1. Τα 6BIO και 7BIO προκαλούν μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3, LNCaP και DU145.

Για την διερεύνηση της ικανότητας των δύο παραγώγων της ιντιρουπίνης (6BIO και 7BIO) και των αποπτωτικών πρωτεϊνών (TRAIL και Apomab) να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και να προκαλούν κυτταρικό θάνατο στις ανθρώπινες προστατικές σειρές εφαρμόστηκε η τεχνική MTT ώστε να υπολογιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την επώαση τους με τις υπό μελέτη ουσίες για 24 και 48 ώρες. Η απόκριση των τριών προστατικών καρκινικών σειρών (PC3, LNCaP και DU145) στις διάφορες ουσίες και στους συνδυασμούς αυτών φαίνονται στα σχήματα 1.1, 1.2, 1.3. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα 6BIO και 7BIO ήταν 15 μM, και για το TRAIL και Apomab 100 ng/ml. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Όπως παρατηρούμε, το 6BIO (15 μM) και το 7BIO (15 μM) επάγουν μια χρονοεξαρτώμενη αντι-πολλαπλασιαστική δράση των καρκινικών κυττάρων, συγκριτικά με τον μάρτυρα τόσο στα κύτταρα PC3 (σχήμα 1.1), όσο και στα κύτταρα LNCaP (σχήμα 1.2) και DU145 (σχήμα 1.3). Αντίθετα το TRAIL και το Apomab, στην επιλεγμένη συγκέντρωση των 100 ng/ml μόνα τους παρουσιάζουν ελαφρά αντιπολλαπλασιαστική δράση. Ειδικότερα, μετά από επώαση των καρκινικών κυττάρων **PC3** με 6BIO για 24 ώρες παρατηρείται μείωση στην βιωσιμότητα τους σε ποσοστό 41%, ενώ στις 48 ώρες το ποσοστό αυξάνεται στο 72%. Για τα ίδια κύτταρα η δράση του 7BIO μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 36% στις 24 ώρες και κατά 55% στις 48 ώρες. Το TRAIL προκαλεί ελαφρά μείωση κατά 17% για 24 ώρες και κατά 21% στις 48 ώρες. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στην δράση του Apomab, όπου τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες δεν παρατηρείται εμφανής μείωση στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων PC3 (σχήμα 1.1, A, B). Ο έλεγχος της συνδυασμένης δράσης των ουσιών για 24 ώρες κάνει εμφανή την συνεργιστική δράση ορισμένων από τους συνδυασμούς των ουσιών. Στην περίπτωση του 6BIO/TRAIL στις 24 ώρες, παρατηρούμε μείωση της βιωσιμότητας κατά 74% και για το 7BIO/TRAIL παρατηρούμε μείωση 66%. Για το 6BIO/Apomab η μείωση της βιωσιμότητας ήταν 67% και για το 7BIO/Apomab 64% (σχήμα 1.1, A). Και στις τέσσερις περιπτώσεις συνδυασμών των μελετούμενων ουσιών, στην κυτταρική σειρά PC3 είναι εμφανής η συνεργιστική τους δράση.

Μετά από επώαση των καρκινικών κυττάρων LNCaP με 6BIO για 24 ώρες, παρατηρείται μείωση στην βιωσιμότητά τους σε ποσοστό 70%, ενώ στις 48 ώρες το ποσοστό αυξάνεται στο 88%. Η δράση του 7BIO μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 83% στις 24 ώρες, ποσοστό που δεν αυξάνεται σε μετέπειτα στάδιο. Το TRAIL, όπως και στα PC3, προκαλεί ελαφρά μείωση της τάξης του 12% για 24 ώρες και 17% στις 48 ώρες. Το Apomab και σε αυτή την κυτταρική σειρά παρουσιάζει χαμηλή δραστικότητα, αφού στις 24 ώρες παρατηρείται μείωση 12% η οποία αυξάνεται στο 23% στις 48 ώρες (σχήμα 1.2, A, B). O έλεγχος του συνδυασμού των 6BIO, 7BIO, TRAIL και Apomab δείχνει την προσθετική τους δράση, αφού το ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας των LNCaP στον συνδυασμό είναι περίπου ίδιο με το σύνολο των επί μέρους ποσοστών αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της καθεμιάς από αυτές μεμονωμένα. Ο συνδυασμός των 6BIO/TRAIL, 7BIO/TRAIL, 6BIO/Apomab και 7BIO/Apomab για 24 ώρες, παρουσιάζει προσθετική δράση με ποσοστά μείωσης 86%, 88%, 85% και 87% αντίστοιχα. Η προσθετική δράση των ουσιών στην κυτταρική σειρά LNCaP παρατηρείται και στις 48 ώρες (Σχήμα 1.2, B).

Στα καρκινικά κύτταρα **DU145**, η επώαση τους με 6BIO για 24 ώρες οδηγεί σε μείωση στην βιωσιμότητα τους σε ποσοστό 43%, ενώ στις 48 ώρες το ποσοστό αυξάνεται στο 84%. Η δράση του 7BIO μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 30% στις 24 ώρες, ποσοστό που αυξάνεται ελαφρώς στο 44% στις 48 ώρες. Το TRAIL προκαλεί ελαφρά μείωση της τάξης του 21% για 24 ώρες και περίπου το ίδιο (24%) στις 48 ώρες. Το Apomab και σε αυτή την κυτταρική σειρά δεν επιδρά σχεδόν καθόλου, αφού τόσο στις 24 (3%) όσο και στις 48 (8%) ώρες δεν παρουσιάζεται εμφανής μείωση της βιωσιμότητας (σχήμα 1.3, Α, Β). Ο συνδυασμός των 6BIO/TRAIL, 7BIO/TRAIL, 6BIO/Apomab και 7BIO/Apomab, για 24 ώρες, προκαλεί ποσοστά μείωσης 85%, 80%, 79% και 57% αντίστοιχα, γεγονός που δηλώνει την συνεργιστική δράση των ουσιών.

Αν και στις τρεις αυτές καρκινικές σειρές προστάτη, το 6BIO και 7BIO παρουσιάζουν εμφανή αντιπολλαπλασιαστική δράση, ωστόσο η κυτταρική σειρά LNCaP είναι η πιο ευαίσθητη στις ουσίες αυτές (σχήμα, 1.2A,). Επιπλέον, και στις τρείς αυτές σειρές οι αποπτωτικές ουσίες TRAIL και Apomab δεν παρουσιάζουν ισχυρή δράση. Στην περίπτωση επώασης με τους συνδυασμούς των ουσιών, για 24 ώρες, παρουσιάζεται συνεργιστική δράση στις κυτταρικές σειρές PC3 και DU145, ενώ αντίθετα στην σειρά LNCaP η συνδυασμένη δράση τους φαίνεται να είναι προσθετική. Πιο ευαίσθητη στην επώαση με των συνδυασμό ουσιών συνεχίζει να είναι η κυτταρική σειρά LNCaP (σχήμα 1.2 A,B).





ricatilicitis, 40 li

Σχήμα 1.1: Δράση των ουσιών 6BIO, 7BIO, TRAIL και Apomab και των συνδυασμών αυτών, στην βιωσιμότητα της προστατικής καρκινικής σειράς PC3. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις ουσίες για 24 (A) και 48 ώρες (B). Ως μάρτυρας ελέγχου (untreated) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων.







Σχήμα 1.2: Δράση των ουσιών 6BIO, 7BIO, TRAIL και Apomab και των συνδυασμών αυτών, στην βιωσιμότητα της προστατικής καρκινικής σειράς LNCaP. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις ουσίες για 24 (A) και 48 ώρες (B). Ως μάρτυρας ελέγχου (untreated) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 1.3: Δράση των ουσιών 6BIO, 7BIO, TRAIL και Apomab και των συνδυασμών αυτών, στην βιωσιμότητα της προστατικής καρκινικής σειράς DU145. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις ουσίες για 24 (A) και 48 ώρες (B). Ως μάρτυρας ελέγχου (untreated) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων. Προκειμένου να διευκρινιστεί αν ασκείται αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και για να εξεταστεί περαιτέρω η προσθετική ή συνεργιστική δράση των συνδυασμένων ουσιών, αντίστοιχα πειράματα έγιναν με χαμηλότερες συγκεντρώσεις όλων των μελετώμενων παραγόντων.

Συγκεκριμένα, στην κυτταρική σειρά **PC3** η μείωση της συγκέντρωσης των 6BIO και 7BIO στα 5 μM οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 30% και στις δύο περιπτώσεις (σχήμα 2.1.1). Παρόμοια δράση παρατηρείται χρησιμοποιώντας 10 μM 6BIO ,ενώ τα 10 μM 7BIO έδωσαν ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας ίσο με 43% (σχήμα 2.1.2). Το TRAIL και το Apomab χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 25 ng/ml και 50 ng/ml, αντίστοιχα. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι στα PC3, η συνδυασμένη δράση των ουσιών φαίνεται να είναι προσθετική, σε αντίθεση με τη συνεργιστική δράση που φανέρωναν στα παραπάνω αποτελέσματα, πράγμα που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συνεργιστική δράση των ουσιών στα κυττάρα PC3 επιτυγχάνεται μόνο στις ψηλότερες συγκεντρώσεις των ουσιών.

Η κυτταρική σειρά LNCaP συνεχίζει να είναι ευαίσθητη στις ουσίες 6BIO και 7BIO ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (5 και 10 μM). Για τα 5 μM 6BIO, η μείωση της βιωσιμότητας είναι 42% και αντίστοιχα για το 7ΒΙΟ είναι 66% (σχήμα 3.1.1). Για τα 10 μΜ 6BIO, η μείωση της βιωσιμότητας ήταν 61% και αντίστοιγα για το 7BIO 89% (σχήμα 3.1.2). Σε αυτή την κυτταρική σειρά, η μείωση της συγκέντρωσης οδηγεί σε παρόμοια ποσοστά μείωσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά από επώαση με τις ουσίες TRAIL και Apomab. Τα αποτελέσματα από την συνδυασμένη δράση αποδεικνύουν ότι και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η δράση των ουσιών συνεχίζει να είναι προσθετική. Τέλος, στην κυτταρική σειρά DU145, παρουσιάστηκαν τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Στις περιπτώσεις επώασης με 5 μM 6BIO ή 5 μM 7BIO παρατηρείται μικρή μείωσης της βιωσιμότητας με ποσοστά 14% και 7%, αντίστοιγα (σγήμα 4.1.1). Η δράση των 10 μΜ 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ ήταν ακριβώς η ίδια με αυτή του προηγούμενου πειράματος όπου χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 15 μM (σχήμα 4.1.2). Τόσο το TRAIL όσο και το Apomab επίσης συμφωνούν με τα προηγούμενα αποτελέσματα. Το ενδιαφέρον στο πείραμα αυτό ήταν ότι στους συνδυασμούς ουσιών με το 6ΒΙΟ (5μΜ) και 7ΒΙΟ (5μΜ) παρόλο που η δράση τους μεμονωμένα παρουσιάστηκε αρκετά μειωμένη, στους συνδυασμούς τους, τα ποσοστά παρουσιάζουν ισχυρή συνεργιστική δράση. Συγκεκριμένα στους συνδυασμούς, 6BIO (5µM)/TRAIL (25ng/ml), 6BIO (5µM)/TRAIL (50ng/ml), 7BIO (5µM)/TRAIL

(25ng/ml), 7BIO (5µM)/TRAIL (25ng/ml), 6BIO (5µM)/Apomab (50ng/ml), 7BIO (5µM)/Apomab (50ng/ml) παρατηρήθηκε μείωση 77%, 78%, 60%, 63%, 40% και 12% αντίστοιχα (σχήμα 4.1.1). Η δράση των ουσιών στην κυτταροσειρά DU145 φαίνεται να είναι συνεργιστική αφού σύμφωνα με τα πιο πάνω αποτελέσματα, το ποσοστό επιπλέον μείωσης της βιωσιμότητας ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις (εκτός του συνδυασμού 7BIO (5µM)/Apomab (50ng/ml)) περίπου στο 30%. Η συνεργιστική δράση των ουσιών που παρουσιάζεται στο πείραμα αυτό επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος (σχήμα 1.3, A) και επιπλέον τα ενισχύει αφού η συνεργιστική δράση των ουσιών γίνεται ακόμη πιο έντονη.



Σχήμα 2.1.1: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στην βιωσιμότητα των PC3 κυττάρων. Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO (5 μM), 7BIO (5 μM), TRAIL (25 και50 ng/ml) και Apomab (50 ng/ml) και των συνδυασμών αυτών στην καρκινική σειρά προστάτη PC3 για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (untreated) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 2.1.2: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στην βιωσιμότητα των PC3 κυττάρων. Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO (10μM), 7BIO (10μM), TRAIL (25,50 ng/ml) και Apomab (50ng/ml) και των συνδυασμών αυτών στην προστατική καρκινική σειρά PC3 για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.



Σχήμα 3.1.1: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στην βιωσιμότητα των LNCaP κυττάρων. Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO (5μM), 7BIO (5μM), TRAIL (25,50 ng/ml) και Apomab (50ng/ml) και των συνδυασμών αυτών στην προστατική καρκινική σειρά LNCaP για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.



Σχήμα 3.1.2: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στην βιωσιμότητα των LNCaP κυττάρων. Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO (10μM), 7BIO (10μM), TRAIL (25,50 ng/ml) και Apomab (50ng/ml) και των συνδυασμών αυτών στην προστατική καρκινική σειρά LNCaP για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.


Σχήμα 4.1.1: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στην βιωσιμότητα των DU145 κυττάρων. Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO (5μM), 7BIO (5μM), TRAIL (25,50 ng/ml) και Apomab (50ng/ml) και των συνδυασμών αυτών στην προστατική καρκινική σειρά DU145 για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.Ε τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.



Σχήμα 4.1.2: Επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ουσιών, στην βιωσιμότητα των DU145 κυττάρων. Αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ουσιών 6BIO (10μM), 7BIO (10μM), TRAIL (25,50 ng/ml) και Apomab (50ng/ml) και των συνδυασμών αυτών στην προστατική καρκινική σειρά DU145 για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.

3.2. Τα 6BIO και 7BIO καθώς και οι συνδυασμοί τους με TRAIL και Apomab επάγουν αποπτωτικά χαρακτηριστικά σε καρκινικά κύτταρα προστάτη.

Η ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων μετά την επώαση με τις υπό μελέτη ουσίες έγινε δυνατή με την τεχνική χρώσης DAPI. Το DAPI είναι ένας παράγοντας που μπορεί να προσδένεται και να χρωματίζει τις έλικες DNA. Αρχικά τα κύτταρα επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 24 ώρες άλλα λόγω της υψηλής θνησιμότητάς τους, τα κύτταρα κατακερματίστηκαν και ήταν αδύνατο να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Έτσι το πείραμα επαναλήφθηκε με τις ίδιες συγκεντρώσεις των ουσιών, αλλά η επώαση έγινε για 12 ώρες, ώστε να διερευνηθεί αν παρατηρούνται αποπτωτικά χαρακτηρίστηκα στα επωασμένα με τις ουσίες κύτταρα.

Στην κυτταρική σειρά **PC3**, όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρούνται αρκετά κύτταρα με αποπτωτικά χαρακτηριστικά στους συνδυασμούς ουσιών και λιγότερα στα κύτταρα που επωάστηκαν με μια μόνο ουσία. Όπως παρατηρούμε στο σχήμα 5.1, σε κύτταρα PC3 τα οποία δεν επωάστηκαν με κάποια ουσία (control) παρατηρούμε ελάχιστα κύτταρα με αποπτωτικά χαρακτηριστικά. Στις περιπτώσεις επώασης με 6BIO και 7BIO παρατηρούμε αρκετά κύτταρα με αποπτωτικά γαρακτηριστικά ενώ στις περιπτώσεις επώασης με τα TRAIL και Apomab παρατηρούμε λιγότερα, πράγμα αναμενόμενο αφού, όπως απέδειξαν και οι κυτταροτοξικές μελέτες, η δράση των ουσιών αυτών στα PC3 κύτταρα δεν είναι έντονη ούτε και στις 24 ώρες. Παρατηρούμε έντονα αποπτωτικά χαρακτηριστικά στις περιπτώσεις συνδυασμού των 6BIO/Apomab και 7BIO/Apomab, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αποπτωτική δράση των συνδυασμών αυτών γίνεται εμφανής και στις πρώτες 12 ώρες (σχήμα 5.1). Στην κυτταρική σειρά LNCaP, όπως και στην PC3, περισσότερα κύτταρα με αποπτωτικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στους συνδυασμούς των ουσιών. Παρατηρούμε επίσης αρκετά αποπτωτικά γαρακτηριστικά στα κύτταρα που επωάστηκαν με 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ, αποτέλεσμα αναμενόμενο αφού στις κυτταροτοξικές μελέτες παρατηρείται έντονη δράση των ουσιών αυτών στην κυτταροσειρά LNCaP. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω κύτταρα με χαρακτηριστικά απόπτωσης παρουσιάζονται κυρίως στους συνδυασμούς ουσιών (σχήμα 5.2).

Στην κυτταρική σειρά **DU145** έντονη αποπτωτική δραστηριότητα παρατηρούμε κυρίως στους συνδυασμούς του 6BIO και 7BIO με το Apomab. Σε αυτή την κυτταρική σειρά φαίνεται ότι η δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO από μόνες τους δεν είναι έντονη και αυτό ανταποκρίνεται στην αδύνατη δράση των ουσιών αυτών στην συγκεκριμένη κυτταροσειρά. (σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.1: Ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων PC3 με χρώση DAPI. Τα κύτταρα PC3 επωάστηκαν με τις ουσίες 6BIO και 7BIO (15 μM) και TRAIL και Apomab (100 ng/ml) και τους συνδυασμούς αυτών για 12 ώρες. Με την χρώση DAPI έγινε δυνατή η αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων τα οποία παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Σχήμα 5.2: Ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων LNCaP με χρώση DAPI. Τα κύτταρα LNCaP επωάστηκαν με τις ουσίες 6BIO και 7BIO (15 μM) και TRAIL και Apomab (100 ng/ml) και τους συνδυασμούς αυτών για 12 ώρες. Με την χρώση DAPI έγινε δυνατή η αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων τα οποία παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Σχήμα 5.3: Ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων DU145 με χρώση DAPI. Τα κύτταρα DU145 επωάστηκαν με τις ουσίες 6BIO, 7BIO (15μM) και TRAIL, Apomab (100 ng/ml) και τους συνδυασμούς αυτών για 12 ώρες. Με την χρώση DAPI έγινε δυνατή η αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων τα οποία παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

3.3. Η επώαση με τις υπο μελέτη ουσίες προκαλεί ενεργοποίηση πρωτεϊνών σημαντικών στην διαδικασία της απόπτωσης.

Αρχικός στόχος του παρόντος πειράματος ήταν ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων που έπρεπε να τοποθετηθούν σε κάθε πιάτο καλλιέργειας ούτως ώστε τα προϊόντα από την λύση των κυττάρων να περιέχουν αρκετή πρωτεΐνη ώστε να είναι διακριτή μετά την ανοσοεμφάνιση. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις υπο μελέτη ουσίες μας και στην συνέχεια μετά τη λύση τους, αναλύθηκαν με την τεχνική Western Blot. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν την κασπάση (cas)-9 (caspase-9), cas-8 (caspase-8), cas-3 (caspase-3), PARP και ως δείκτης φορτώματος των πηκτωμάτων με ίση ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε περίπτωση, αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ακτίνη.

Στα PC3 μετά την επώαση με τις ουσίες 6BIO (15μM), 7BIO (15μM), TRAIL (100ng/ml) και Apomab (100ng/ml) μεμονωμένα δεν προκαλεί κάποια σημαντική διαφορά όσον αφορά την cas-9, ωστόσο στον συνδυασμό 6BIO/TRAIL προκαλείται εμφανής μείωση της προκασπάσης-9 όπου παρατηρούνται και τα δύο προϊόντα διάσπασης της cas-9, τα p35/p37 (σχήμα 6.1). Όσον αφορά την cas-3 παρατηρούμε κάποια προϊόντα διάσπασης της cas-3 (p17/19) μετά τις επωάσεις σε σύγκριση με το μάρτυρα (control). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στους συνδυασμούς ουσιών παρατηρείται σημαντική μείωση της ολικής κασπάσης, δηλ. της προκασπάσης-3, πράγμα που σημαίνει και την ενεργοποίησή της. Επίσης, παρατηρείται διάσπαση της cas-8 ιδιαίτερα στους συνδυασμούς 6BIO/TRAIL, 7BIO/TRAIL και 6BIO/Apomab, όπου η προκασπάση-8 σχεδόν εξαφανίζεται. Επιπλέον, η διάσπαση του PARP (p89), επιβεβαιώνει την δράση των κασπασών. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις 6BIO/TRAIL και 6BIO/Apomab παρατηρούμε εμφανή μείωση του ολικού PARP (σχήμα 6.1).

Στα κύτταρα LNCaP η επώαση με 6BIO (15 μM) και σε μικρότερο βαθμό το 7BIO (15 μM), προκαλεί διάσπαση άρα και ενεργοποίηση της cas-9, που συνοδεύεται από ενεργοποίηση της cas-3 και επακόλουθη ενεργοποίηση του PARP (σχήμα 6.2). Όσον αφορά το TRAIL και το Apomab, επάγουν τη διάσπαση της cas-9 και της cas-3 αλλά όχι του PARP που φαίνεται να είναι μη ενεργό (σχήμα 6.2). Σε όλους τους συνδυασμούς παρατηρούμε μείωση των προκασπασών και διάσπαση αυτών, που δηλώνει την ενεργοποίησή τους.

Στην περίπτωση των κυττάρων **DU145** παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της cas-9 με το ενδιαφέρον να παρατηρείται στην περίπτωση του 6BIO/Apomab όπου η προκασπάση-9

σχεδόν εξαφανίζεται, και τα προϊόντα της διάσπασης της είναι πιο έντονα. Στην περίπτωση της cas-8 παρατηρούμε έντονη διάσπαση στις περιπτώσεις επώασης με το 6BIO και το TRAIL. Σε όλους τους συνδυασμούς ουσιών παρατηρούμε διάσπαση της cas-8, με εντονότερη αυτήν του 6BIO/Apomab (σχήμα 6.3). Επίσης στον συνδυασμό των ουσιών παρατηρείται αποικοδόμηση της πρωτεΐνης PARP και αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων θανάτου DR4 και DR5.

Τέλος μελετήθηκε η δράση των ουσιών στην ενεργότητα της κασπάσης-3 στα PC3, LNCaP και DU145 κύτταρα (Σχήμα 6.1-6.3). Τα κύτταρα επωάστηκαν με 6BIO (15 μM), 7BIO (15 μM), TRAIL (100 ng/ml) και Apomab (100 ng/ml) και των συνδυασμών αυτών για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό και ως θετικός μάρτυρας κύτταρα επωασμένα με την επαγωγική της απόπτωσης ουσία etoposide. Το 6BIO και όχι το 7BIO αυξάνει την ενεργότητα της κασπάσης-3 στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η ενεργότητα αυξάνεται σημαντικά όταν συνδυαστούν οι ουσίες. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ενώ το 7BIO από μόνο του δεν επάγει καμία ενεργοποίηση της κασπάσης -3, ο συνδυασμός του με το TRAIL και το Apomab αυξάνει σημαντικά την ενεργότητα, φτάνοντας τα επίπεδα του θετικού μας μάρτυρα το etoposide. Με αυτό το αποτέλεσμα καταλαβαίνουμε την σημαντικότητα της συνδυασμένης δράσης των ουσιών μας.

Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η μείωση που παρατηρούμε στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από τις κασπάσες μονοπατιού της απόπτωσης.



Σχήμα 6.1: Ανάλυση κατά Western για την ανίχνευση πρωτεϊνών της απόπτωσης σε PC3 κύτταρα και προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3. Τα κύτταρα PC3 επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες και τους συνδυασμούς τους για 24 ώρες. Παρατηρείται η εξαρτώμενη από τις κασπάσες αποπτωτική δράση στο συνδυασμό των ουσιών, φτάνοντας τα επίπεδα του θετικού μας μάρτυρα etoposide. (p values: Treatments vs. control $\leq 0.01^{**}$)



Σχήμα 6.2: Western blot analysis για την ανίχνευση πρωτεϊνών της απόπτωσης σε LNCaP κύτταρα και προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 24 ώρες. Παρατηρείται η κασπασοεξαρτώμενη αποπτωτική δράση στον συνδυασμό των ουσιών φτάνοντας τα επίπεδα του θετικού μας μάρτυρα etoposide. (p values: Treatments vs. control $\leq 0,01^{**}$)



DU145



Σχήμα 6.3: Western blot analysis για την ανίχνευση πρωτεϊνών της απόπτωσης σε DU145 κύτταρα και προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ουσίες για 24 ώρες. Παρατηρείται η κασπασοεξαρτώμενη αποπτωτική δράση στον συνδυασμό των ουσιών ξεπερνώντας τα επίπεδα του θετικού μας μάρτυρα etoposide. (p values: Treatments vs. control $\leq 0.01^{**}$)

3.4. Προσδιορισμός της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου στις καρκινικές σειρές του προστάτη

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η αποπτωτική δράση διαφόρων ουσιών παρουσιάζει διαφορετική ισχύ, ανάλογα με την κυτταρική σειρά που δρουν. Υπάρχουν αναφορές και σχετικά με το TRAIL, όπου ο ακριβής μηχανισμός της διαφορετικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων ή ακόμη και καρκινικών κυττάρων ιδίου τύπου καρκίνου στο TRAIL δεν έχει ξεκαθαριστεί. Πιστεύεται όμως ότι η διαφορετική έκφραση των DR (Degli-Esposti, Dougall, et al., 1997; Griffith, et al., 1998; Keane, et al., 1999; X. D. Zhang, Franco, et al., 2000; X. D. Zhang, Nguyen, et al., 2000), η υπερέκφραση ενδοκυττάριων αποπτωτικών πρωτεϊνών (FLIP) και κατασταλτικών πρωτεϊνών της απόπτωσης (IAPs) σε κάθε κυτταρική σειρά μεταβάλλει και την ευαισθησία τους (Suliman, et al., 2001). Στα δικά μας αποτελέσματα παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο, όπου οι τρεις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στις ουσίες μας. Αυτό μας οδήγησε στην διερεύνηση της έκφρασης των υποδοχέων θανάτων στις καρκινικές σειρές DU145, LNCaP και PC3 γρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Σκοπός μας ήταν να διευκρινιστεί αν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των DRs μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Στα αποτελέσματα μας παρατηρούμε αυξημένη έκφραση των DR4 και DR5 στις σειρές DU145 και, LNCaP, σε σχέση με τα PC3 κύτταρα (Σχήμα 7). Αυτό φαίνεται να συσχετίζεται με την αυξημένη ευαισθησία που παρουσιάζουν αυτές οι δύο καρκινικές σειρές στις υπό μελέτη ουσίες μας, σε σχέση με την PC3 σειρά.



Σχήμα 7: Προσδιορισμός της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου (DRs), στα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145, LNCaP και PC3 με την χρήση κυτταρομετρίας ροής. Στα LNCaP και DU145 παρατηρείται αυξημένη έκφραση των DR4 και DR5 σε σχέση με τα PC3, γεγονός που ίσως δικαιολογεί και την αυξημένη ευαισθησία τους στις υπό μελέτη ουσίες.

3.5 Κατασταλτική δράση του 6BIO αλλά όχι του 7BIO στη διεισδυτική ικανότητα καρκινικών κυττάρων του προστάτη και σε επαγωγικούς παράγοντες της μετάστασης

Τα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και PC3 επωάστηκαν για είκοσι ώρες με 6BIO και 7BIO σε συγκεντρώσεις που δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων. Στη συνέχεια με την χρήση της τεχνικής προσδιορισμού της διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων και των θαλάμων τύπου Boyden, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία, μελετήσαμε την αντι-διεισδυτική ικανότητα των ουσιών μας. Σαν θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε ττην αμυλορίδη (Amyloride), η οποία είναι γνωστός καταστολέας της πρωτεάσης uPA (Demetriou & Cress, 2004). Τα αποτελέσματα μας (Σχήμα 8), δείχνουν ότι το 6BIO και όχι το 7BIO, μειώνει την διεισδυτική ικανότητα των DU145 και PC3 κυττάρων. Σε συγκέντρωση 1 μM και 5 μM, το 6BIO μειώνει κατά 30% και 54% την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων PC3 αντίστοιχα. Στην περίπτωση των DU145 κυττάρων, η μείωση της διεισδυτικότητας που παρατηρείται μετά από επώαση με το 6BIO ανέρχεται στο 40% για την συγκέντρωση του 1 μM και στο 47% για την συγκέντρωση των 5 μM (Σχήμα 8.1). Τα επίπεδα μείωσης και στις δυο κυτταρικές σειρές ήταν σχεδόν στα επίπεδα του θετικού μας μάρτυρα.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στη μελέτη της δράσης των 6BIO και 7BIO στην ενεργότητα της πρωτεάσης uPA, η οποία όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την διείσδυση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Markus, 1988). Σημαντική ήταν η μείωση που παρατηρήθηκε στην ενεργότητα του uPA, στα επωασμένα με 6BIO, PC3 και DU145 κύτταρα. Ιδιαίτερα στα DU145, η μείωση ανέρχεται σε ποσοστό 30% και 42% για τις συγκεντρώσεις των 1 μΜ και 5 μΜ αντίστοιχα, φτάνοντας σε παρόμοια ποσοστά μείωσης με αυτά του θετικού μας μάρτυρα. Στα PC3 κύτταρα, η μείωση ανέρχεται στο 21% και 29% συγκριτικά με τα μη επωασμένα κύτταρα, για τις συγκεντρώσεις των 1 μΜ και 5 μΜ αντίστοιχα, φτάνοντας συγκεντρώσεις των 1 μΜ και 5 μΜ αντίστοιχα (Σχήμα 8.2). Το 7BIO όπως αναμενόταν, δεν παρουσίασε καμία δράση στην ενεργότητα της πρωτεάσης. Τα αποτελέσματα μας, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αντι-διεισδυτικής ικανότητας των υπό μελέτη ουσιών, προτείνουν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις το 6BIO, αλλά όχι το 7BIO, δρα κατασταλτικά στη διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων PC3 και DU145, η οποία ίσως να οφείλεται και στην άμεση κατασταλτική ικανότητα της ουσίας 6BIO στην ενεργότητα της πρωτεάσης uPA.



Σχήμα 8.1: Το 6BIO μειώνει τη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων DU145 (α) και PC3 (β). Μετά από επώαση των κυττάρων με 6BIO για 20 ώρες σε συγκεντρώσεις που δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων (1 και 5 μM) και με τη χρήση των θαλάμων τύπου Boyden(Boyden Chambers), παρατηρήσαμε ότι μόνο το 6BIO μειώνει τη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων όταν τα συγκρίνουμε με τα μη επωασμένα με την ουσία κύτταρα. (p values: 6BIO vs. control $\leq 0.01^{**}$, 6BIO vs. control $\leq 0.05^*$).



Εικόνα 8.2: Το 6ΒΙΟ αλλά όχι το 7ΒΙΟ μειώνει τη ενεργότητα της πρωτεάση uPA στα κύτταρα PC3 και DU145. Μετά από επώαση των κυττάρων με 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε συγκεντρώσεις που δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων (1 και 5 μM) και με τη χρήση μεθόδου προσδιορισμού της ενεργότητας της πρωτεάσης uPA. Παρατηρήσαμε ότι μόνο το 6ΒΙΟ μειώνει την ενεργότητα της πρωτεάσης uPA συγκριτικά με τα μη επωασμένα με την ουσία κύτταρα. (p values: 6ΒΙΟ vs. control $\leq 0.05^*$).

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας για την δράση των υπό μελέτη ουσιών στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, κατέδειζαν ότι τα ιντικοειδή 6BIO και 7BIO επάγουν ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση στις καρκινικές σειρές PC3, LNCaP και DU145. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από τις κυτταροτοζικές αναλύσεις, αφού επώαση των παραπάνω καρκινικών σειρών με τις ουσίες 6BIO και 7BIO προκαλεί σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με την κυτταροσειρά LNCaP να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τις άλλες δύο. Η δράση των ουσιών αυτών παρουσιάζεται δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη (σχήματα τμήματος 3.1.). Επιπλέον, ο συνδυασμός των 6BIO και 7BIO με τις αποπτωτικές ουσίες TRAIL και Apomab, κατέδειξε την συνεργιστική τους δράση στις κυτταρικές σειρές PC3 και DU145 και προσθετική στα LNCaP. Φαίνεται ότι ο συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων επάγει σημαντική αποπτωτική δράση, ενεργοποιώντας το εξωγενές εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το 6BIO, αλλά όχι το 7BIO, φαίνεται να παρουσιάζει αντιδιεισδυτικές ικανότητες, μειώνοντας σημαντικά την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων PC3 και DU145, όπως επίσης και την ενεργότητα της πρωτεάσης uPA, η οποία παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη διείσδυση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Ενότητα 4: Καρκίνος του μαστού

4.1 Αντιπολλαπλασιαστική δράση των ιντικοειδών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα καρκινικά κύτταρα μαστού

Για να συγκρίνουμε τα δυο συνθετικά ανάλογα της ιντιρουπίνης 6BIO και 7BIO, για την ικανότητα τους να επάγουν κυτταρικό θάνατο σε καρκινικές σειρές μαστού προσδιορίσαμε την βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες επώασης με τις ουσίες χρησιμοποιώντας σειρά συγκεντρώσεων (0 - 50 μΜ). Η απόκριση των πέντε καρκινικών σειρών μαστού (MCF-7, ZR75, MDA-MB-231, MDA-MB-468 και MDA-MB-231-TXSA) στα δυο ανάλογα παρουσιάζονται στο Σχήμα 9. Παρατηρείται ότι το 6BIO και 7ΒΙΟ επάγουν μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της βιοσιμότητας των κυττάρων (Σχήμα 9Α-9Ε). Η δράση του 7BIO είναι σχεδόν η ίδια με το 6BIO στα MCF-7 και MDA-MB-231 κύτταρα (Σχήμα 9Α και 9Γ), ενώ στις άλλες τρεις καρκινικές σειρές το 7ΒΙΟ παρουσίασε ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση (Σχήμα 9Β, 9Δ και 9Ε). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται και ως τιμές ΙC₅₀ που αναγράφονται στον Πίνακα 1. Τα πιο ευαίσθητα στην δράση των υπό μελέτη ουσιών, παρατηρήθηκε να είναι τα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα (Σχήμα 9E), με IC₅₀ 9,2 μM (\pm 3,56) για το 6BIO και 2,3 μM για το 7BIO (Πίνακας 1). Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μια παραλλαγή των κυττάρων MDA-MB-231 τα οποία απομονώθηκαν μετά από διαδοχικές ενοφθαλμίσεις σε ανοσοκαταστελμένα ποντίκια και επιλεκτική in vitro συλλογή των κυττάρων που μετανάστευσαν στα οστά (Thai le et al., 2006). Ο λεπτομερής μηχανισμός δράσης των δύο ουσιών μελετήθηκε αναλυτικότερα χρησιμοποιώντας την ευαίσθητη στις ουσίες κυτταρική σειρά, MDA-MB-231-TXSA.



Σχήμα 9: Δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO στην βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 (A), ZR75 (B), MDA-MB-231 (Γ), MDA-MB-468 (Δ) και MDA-MB-231-TXSA (Ε). Τα κύτταρα εκτέθηκαν για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των 6BIO και 7BIO. Προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με τη χρήση των τεχνικών MTT και χρώση με κρυσταλικό Ιώδες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. τιμών τριών επαναλήψεων (p values: 6BIO/7BIO vs. control \leq 0,01**).(Nicolaou, et al., 2012).

Κυτταρική σειρά	Επώ	Επώαση με		
	6BIO	7BIO		
MCF-7	21.2 (±5.7)	20.0 (±3.1)		
ZR75	22.3 (±2.5)	16.7 (±2.9)		
MDA-MB-231	17.0 (±3.6)	17.4 (±4.2)		
MDA-MB-468	17.4 (±3.3)	6.6 (±1.0)		
MDA-MB-231-TXSA	9.2 (±3.5)	2.3 (±4.6)		

Οι τιμές έχουν μονάδα μέτρησης τα μΜ και υπολογίστηκαν βάση των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 9. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. από τιμών τριών επαναλήψεων (Nicolaou, et al., 2012).

4.2 Τα 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ δρουν αποπτωτικά στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231-TXSA

Ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από τις υπό μελέτη ουσίες αρχικά μελετήθηκε με την χρήση της δοκιμασίας ELISA, η οποία ανιχνεύει θραύσματα του DNA (cytoplasmic histone-associated DNA-fragments) τα οποία παράγονται μετά τον κυτταρικό θάνατο. Μετά την επώαση των κυττάρων MDA-MB-231-TXSA με 6BIO και 7BIO σε συγκέντρωση 15 μM, και οι δυο ουσίες παρουσίασαν σημαντική αποπτωτική δράση στις 24 ώρες η οποία παρέμεινε σταθερή μέχρι και τις 48 ώρες (Σχήμα 10A). Η αποπτωτική δράση των ουσιών μελετήθηκε επίσης και με την χρήση της μεθόδου Tali καθορίζοντας έτσι το ποσοστό των κυττάρων τα οποία οδηγήθηκαν σε απόπτωση. Τα αποτελέσματά μας δηλώνουν ότι το 6BIO (15 μM) και το 7BIO (15 μM), αύξησαν σημαντικά το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (θετικών για Αννεξίνη V) συγκριτικά με τα μη επωασμένα με τις ουσίες κύτταρα (Σχήμα 10B).

Στη συνέχεια για να προσδιορίσουμε αν η αποπτωτική δράση των ουσιών σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, τα κύτταρα μας επωάστηκαν με τις ουσίες σε διάφορες συγκεντρώσεις για 24 ώρες και μετρήσαμε την ενεργότητα της κασπάσης-3 (Σχήμα 10Γ). Σημαντική αύξηση της ενεργότητας παρατηρήθηκε μετά την επίδραση του 6BIO στη συγκέντρωση των 10 μM, συγκριτικά με το μάρτυρα μας ($p \le 0,01$). Αντιθέτως το 7BIO δεν παρουσίασε σημαντική δράση στην ενεργότητα της κασπάσης-3 μετά από 24 ώρες επώασης (Σχήμα 10Γ). Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3Γ, στις 48 ώρες το 7BIO παρουσίασε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης 3 ($p \le 0.05$), όμως η δράση του 6BIO ήταν ακόμη εντονότερη, αυξάνοντας κατά 6 φορές, την ενεργότητα της κασπάσης-3 ($p \le 0.01$) (Σχήμα 10Γ).

Στην συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε ένα γενικό αναστολέα των κασπασών, το Z-VAD (OMe)-FMK με σκοπό να διευκρινίσουμε αν η αποπτωτική δράση των ουσιών είναι εξαρτώμενη από τις κασπάσες. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι με τη χρήση του αναστολέα κασπασών, η δράση του 6BIO καταστέλλεται, αυξάνοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων έως και 89,3% μετά από επώαση με 6BIO σε συγκεντρώσεις 15 μM (Σχήμα 11A). Το Z-VAD (OMe)-FMK είχε μια μικρή (47,5%) αλλά στατιστικώς σημαντική δράση στην αποτροπή του επαγόμενου από το 7BIO κυτταρικό θάνατο (Σχήμα 11A).

Τα αποτελέσματα μας δηλώνουν ότι ενώ και οι δύο ουσίες επάγουν αποπτωτική δράση και αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3, το 6BIO είναι ισχυρότερος ενεργοποιητής του εξαρτώμενου από τις κασπάσες μονοπατιού συγκριτικά με το 7BIO. Η

αποπτωτική δράση των ουσιών επιβεβαιώθηκε και μορφολογικά με τη χρήση της χρωστικής DAPI (Σχήμα 11B).



Σχήμα 10: Δράση του 6BIO (15 μM) και 7BIO (15 μM) στην απόπτωση και ενεργότητα της κασπάσης-3 στα MDA-MB-231-TXSA καρκινικά κύτταρα. (A) Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις ουσίες για 24 και 48 ώρες και μελετήθηκαν για την ύπαρξη νουκλεοσωμάτων με την χρήση ELISA, (p values: 6BIO/7BIO vs. control $\leq 0,01^{**}$) (B) Δράση των 6BIO και 7BIO μετά από 24 ώρες επώασης στη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιώντας χρώση με Annexin-V Alexa FluorR 488/PI. Το ποσοστό ζωντανών και αποπτωτικών κυττάρων αναλύθηκε με την χρήση της δοκιμασίας TaliTM και ανάλυση σε κυτταρόμετρο. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το etoposide (100 μg/ml). (Γ) Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις ουσίες για 0-48 ώρες και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της κασπάσης-3 χρησιμοποιώντας το φθορισμογόνο υπόστρωμα της κασπάσης-3, zDEVD-AFC, (p values: 6BIO/7BIO vs. control $\leq 0,01^{**}$, 6BIO/7BIO vs. control $\leq 0.05^*$) (Nicolaou, et al., 2012).



Σχήμα 11: Ο επαγώμενος θάνατος από 6BIO ή 7BIO αναστέλλεται από αναστολείς κασπασών (A) Τα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231-TXSA εκτέθηκαν σε 15 μM 6BIO και 7BIO για 48 ώρες και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την προσθήκη του αναστολέα κασπασών Z-VAD (OMe)-FMK σε συγκέντρωση 50 μM. (p values: 6BIO vs. 6BIO+Z-VAD < 0,01**, 7BIO vs. 7BIO+Z-VAD < 0.05*). (B) Ανίχνευση επαγώμενου κυτταρικού θανάτου από 6BIO και 7BIO με χρώση DAPI. Τα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231-TXSA επωάστηκαν με τις ουσίες για 24 ώρες και παρατηρήθηκαν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά μετά από χρώση DAPI χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού (Nicolaou, et al., 2012).

4.3 Επίδραση των 6BIO και 7BIO σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου

Για να προσδιορίσουμε το μηγανισμό της αποπτωτικής δράσης των υπό μελέτη ουσιών, αξιολογήσαμε τα επίπεδα έκφρασης ρυθμιστικών πρωτεϊνών του αποπτωτικού μονοπατιού στα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα. Εφαρμόστηκε η τεχνική Western blot για διάφορα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στις 0 ώρες (μάρτυρας), 6, 12, 24 36 και 48 ώρες μετά την επώασή τους με τις ουσίες, χρησιμοποιώντας ποικίλα αντισώματα όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 12. Το 6ΒΙΟ σε συγκέντρωση 15 μΜ προκάλεσε κατάτμηση και συνεπώς ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η οποία ήταν ορατή από το σημείο των 6 ωρών, και χρονοεξαρτώμενη κατάτμηση και ενεργοποίηση της κασπάσης-9, που ήταν ορατή στις 12-48 ώρες. Επίσης παρατηρήθηκε και κατάτμηση της πρωτεΐνης PARP, που διακρίνεται στο διάστημα μεταξύ 24-48 ωρών (Σχήμα 12Α). Ενδιαφέρον παρουσίασαν και τα αποτελέσματα μετά την επώαση με 15 μΜ 7ΒΙΟ, όπου παρατηρήσαμε μια χρονοεξαρτώμενη κατάτμηση της κασπάσης-8, ορατή από τις 12 ώρες, και της PARP και αύξηση στη πρωτεϊνική έκφραση της κασπάσης-3 και κασπάσης-9. Επιπλέον, το 7BIO αύξησε τα επίπεδα των πρωτεϊνών FADD και Bax (Σχήμα 12B), όπως επίσης των πρωτεϊνών p53 και p21 στις 12-48 ώρες. Αντιθέτως το 6ΒΙΟ παρουσίασε μια αμελητέα αυξητική δράση στην p53 και καμία δράση στην πρωτεΐνη p21 (μεταξύ 12 και 48 ωρών) (Σχήμα 12 Γ και 12 Δ).

Για να προσδιορίσουμε αν η αποπτωτική δράση που παρατηρείται από τα 6BIO και 7BIO γίνεται μέσω της ενεργοποίησης του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού, μελετήσαμε επίσης τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων θανάτου (DR)4 and DR5 στα επωασμένα με τις ουσίες MDA-MB-231-TXSA κύτταρα. Τα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης των υποδοχέων θανάτου αυξήθηκαν σημαντικά μετά την δράση του 7BIO (p < 0.05) (Σχήμα 12B και 12Δ), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αύξηση με το 6BIO (Σχήμα 12A, 12Γ). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η έκφραση των DR4 και DR5 ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (Evdokiou et al., 2002; Yoneda, Williams, Hiraga, Niewolna, & Nishimura, 2001).

Τέλος, καθορίσαμε τη δράση των ουσιών στον κυτταρικό κύκλο των υπό μελέτη κυττάρων (Πίνακας 2). Το 6BIO επάγει μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση στο ποσοστό των κυττάρων που έχουν σταματήσει στην φάση G₀/G₁ (G₀/G₁ DNA content), από 41,0 % στο χρόνο 0 στο 53,6% μετά από 24 ώρες επώασης. Αυτό συνοδεύτηκε από μείωση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση G₂/M, από 31,8% στο χρόνο 0 στο 11,1 % μετά από 24

ώρες επώασης. Παρατηρήθηκε μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση sub-G₁, από το 3,7 % στο χρόνο σημείο 0 σε 25,0 % στις 24 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει την αποπτωτική δράση της ουσίας 6BIO (Πίνακας 2A). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η επαγόμενη από το 6BIO καταστολή του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων αυτών στη φάση G₀/G₁, είναι ανεξάρτητη του p21, αφού όπως προαναφέραμε δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην πρωτεϊνική της έκφραση (Σχήμα 12A).

Αντιθέτως με το 6BIO, το 7BIO επάγει μια χρονοεξαρτώμενη μείωση του ποσοστού των κυττάρων στην G₀/G₁, από 46,8% στο χρόνο 0 στο 28,6% και 34,6% μετά από 12 και 24 ώρες επώασης, αντίστοιχα. Αυτό το γεγονός συνοδεύτηκε με αύξηση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G₂/M, η οποία από 38,6% ανέβηκε στο 54,4% μετά από 12 ώρες επώασης με το 7BIO. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια σημαντική χρονοεξαρτώμενη αύξηση στη φάση sub-G₁, από 1,9% στο 39,4% μετά από 24 ώρες επώασης, υποδηλώνοντας και σε αυτή την περίπτωση την αποπτωτική δράση της ουσίας 7BIO (Πίνακας 2B).

Τα αποτελέσματά μας για την δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, MDA-MB-231-TXSA δηλώνουν ότι το 6ΒΙΟ επάγει καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση Go/G1 και απόπτωση, ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Το 7ΒΙΟ δρα αρχικά καταστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M με κορύφωση τις 12 ώρες επώασης και στη συνέχεια, επάγει απόπτωση η οποία είναι ορατή στις 24 ώρες. Η αποπτωτική δράση του 7ΒΙΟ, επάγεται μέσω ενεργοποίησης του εξαρτώμενου από τις κασπάσες αλλά και του ανεξάρτητου των κασπασών αποπτωτικό μονοπάτι.



Σχήμα 12: Δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε πρωτεΐνες-κλειδιά του αποπτωτικού μονοπατιού και του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα MDA-MB-231-TXSA επωάστηκαν με 15 μΜ 6ΒΙΟ (A) ή 15 μΜ 7ΒΙΟ (B) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 48 h) και οι μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκαν με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων σε ανάλυση κατά Western (Western Blot) (Nicolaou, et al., 2012).



Σχήμα 12: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των εικόνων 11A και 11B μετά την επώαση των MDA-MB-231-TXSA με 6BIO (Γ) και 7BIO (Δ) χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Image Quant 5.2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων (Nicolaou, et al., 2012).

Πίνακας 2. Δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στον κυτταρικό κύκλο των MDA-MB-231-TXSA κυττάρων.

(A)

DNA Content (%)						
Hour Phase	0	6	12	24		
Sub-G1	3.7 (± 0.7)	5.7 (± 7.7)	21.1 (± 1.7)	25.0 (± 1.0)		
G0/G1	41.0 (± 1.3)	43.0 (± 2.1)	48.8 (± 0.2)	53.6 (± 0.6)		
S	22.2 (± 0.9)	21.0 (± 0.3)	8.8 (± 1.2)	9.0 (± 1.9)		
(B) G2/M	31.8 (± 0.7)	29.2 (± 0.4)	19.2 (± 1.8)	11.1 (± 0.6)		

Content (%)

Hour Phase	0	6	12	24		
Sub-G1	1.9 (± 1.4)	2.5 (± 0.4)	5.5 (± 0.7)	39.4 (± 2.4)		
G0/G1	46.8 (± 2.0)	38.3 (± 1.7)	28.6 (± 1.3)	34.6 (± 1.4)		
S	12.0 (± 0.1)	9.6 (± 1.3)	10.1 (± 0.8)	7.5 (± 1.9)		
G2/M	38.6 (± 0.7)	47.9 (± 0.3)	54.4 (± 0.9)	16.0 (± 2.7)		

Τα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα επωάστηκαν με 15 μM 6BIO (A) ή 15 μM 7BIO (B) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 24 h) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό της κατανομής των κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. τιμών τριών επαναλήψεων (Nicolaou, et al., 2012).

4.3 Αντιπολλαπλασιαστική δράση του 6BIO και 7BIO σε ανθεκτικά στο Apomab καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA-R

Όπως αναφερθήκαμε και πιο πάνω ένας από τους στόχους τις ερευνητικής μας διατριβής, ήταν ο προσδιορισμός της δράσης των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην επαναφορά της χημειοευαισθησίας κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ανθεκτικά στο Apomab καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA-R (TXSA-R), τα οποία επωάσαμε με 100 ng/ml Apomab, 6ΒΙΟ ή 7ΒΙΟ σε διάφορες συγκεντρώσεις όπως επίσης και συνδυασμό αυτών για 24 και 48 ώρες και στην συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιώντας την μέθοδο MTT, όπως περιγράφεται στην μεθοδολογία.

Όπως αναμενόταν το Apomab δεν παρουσίασε καμία δράση στην βιωσιμότητα των κυττάρων αλλά παρατηρήσαμε μία δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του 6BIO (10 μM) και 7BIO (10 μM), μειώνοντας μετά από 48 ώρες επώασης, κατά 18% και 25% αντίστοιχα την βιωσιμότητα των κυττάρων. Σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα στον συνδυασμό των ουσιών 6BIO και 7BIO με το Apomab (100 ng/ml) στις 48 ώρες. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση στην βιωσιμότητα των ΤΧSA-R κυττάρων, της τάξεως του 82% μετά το συνδυασμό 6BIO (10 μM) με 100 ng/ml Apomab, και 53% στον συνδυασμό 7BIO (10 μM) με 100 ng/ml Apomab (Σχήμα 13).



A

Σχήμα 13: Επίδραση του 6BIO και 7BIO στον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στο Apomab TXSA-R κυττάρων. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις 6BIO (A) και 7BIO (B) όπως επίσης και σε συνδυασμό με 100 ng/ml Apomab για 24 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων.



Επίδραση του 6BIO και 7BIO στον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στο Apomab TXSA-R κυττάρων. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις 6BIO (Γ) και 7BIO (Δ) όπως επίσης και σε συνδυασμό με 100 ng/ml Apomab για 48 ώρες. Ως μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επωάστηκαν με ουσία παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα στις γραφικές εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. τιμών τριών επαναλήψεων των πειραμάτων (p values: 6BIO/7BIO + Apomab vs. control \leq 0,01**, 7BIO vs. control \leq 0.05*).

4.4 Ο συνδυασμός του 6BIO με το Apomab επάγει το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι στα ανθεκτικά στο Apomab MDA-MB-231-TXSA-R κύτταρα

Για να προσδιορίσουμε την εμπλοκή των κασπασών στον επαγόμενο από τις υπό μελέτη ουσίες κυτταρικό θάνατο των TXSA-R κυττάρων, μελετήσαμε τη δράση τους στην ενεργότητα της κασπάσης-3 (Σχήμα 14A). Παρατηρήσαμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3, κατά 7 φορές, στο συνδυασμό του 6BIO (10 μM) με το Apomab (100 ng/ml) μετά από 48 ώρες επώασης ($p \le 0,01$). Το 7BIO (10 μM), όταν συνδυάστηκε με το Apomab (100 ng/ml) παρουσίασε κάποια αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό συγκριτικά με το 6BIO.

Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας τον γενικό αναστολέα κασπασών Z-VAD (OMe)-FMK, παρατηρήσαμε πλήρη καταστολή της δράσης του συνδυασμού 6BIO (10 μM) με το Apomab (100 ng/ml) μετά από 48 ώρες επώασης, όπου η βιωσιμότητα των κυττάρων αυξήθηκε κατά 98% ($p \le 0,01$) (Σχήμα 14B). Αντιθέτως ο αναστολέας παρουσίασε μικρή, αλλά όχι σημαντική, δράση στην αποτροπή του επαγόμενου από το 7BIO σε συνδυασμό με το Apomab κυτταρικό θάνατο των TXSA-R κυττάρων (Σχήμα 14B).

Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώθηκαν και με την τεχνική Western blot, όπου αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης ρυθμιστικών πρωτεϊνών του αποπτωτικού μονοπατιού στα TXSA-R κύτταρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 6BIO (10 μM) ή 7BIO (10 μM) σε συνδυασμό με Apomab (100 ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0-48 ώρες) και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν κατά Western χρησιμοποιώντας ποικίλα αντισώματα όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 15. Ο συνδυασμός του 6BIO με το Apomab, προκαλεί χρονοεξαρτώμενη κατάτμηση και ενεργοποίηση της κασπάσης-3, όπως επίσης και της πρωτεΐνης PARP, που είναι ορατές ήδη από το χρονικό διάστημα των 6 ωρών. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αύξηση των υποδοχέων θανάτου DR4 και DR5. Αντιθέτως, στο συνδυασμό του 7BIO με το Apomab δεν παρουσιάστηκε κατάτμηση της κασπάσης-3, όμως παρατηρήθηκε μια μικρή ενεργοποίηση της PARP (από τις 12 ώρες) και αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα θανάτου DR5 (από τις 24 ώρες).

Τα αποτελέσματα μας για την δράση των ουσιών στα ανθεκτικά στο Apomab καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA-R, υποδηλώνουν ότι όταν τα 6BIO και 7BIO συνδυαστούν με το Apomab, επάγουν μια δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση. Ο συνδυασμός του 6BIO, αλλά όχι του 7BIO με το Apomab, δρα αποπτωτικά στα κύτταρα αυτά ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι.



Σχήμα 14: Προσδιορισμός της δράσης του συνδυασμού των 6BIO ή 7BIO με το Apomab στην ενεργότητα της κασπάσης-3 στα TXSA-R κύτταρα. (A) Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις ουσίες 6BIO (10 μM), 7BIO (10 μM) και στο συνδυασμό τους με το Apomab (100 ng/ml) για 48 ώρες και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της κασπάσης-3. (B) Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 6BIO ή 7BIO σε συνδυασμό με το Apomab για 48 ώρες και μετρήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την προσθήκη του αναστολέα κασπασών Z-VAD (OMe)-FMK σε συγκέντρωση 50 μM. (p values: 6BIO+Apomab vs. 6BIO+Apomab +Z-VAD < 0,01**).



Σχήμα 15: Δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO σε συνδυασμό με το Apomab σε πρωτεΐνες-κλειδιά του αποπτωτικού μονοπατιού και του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα TXSA-R επωάστηκαν με 15 μM 6BIO (A) ή 15 μM 7BIO (B) μαζί με 100 ng/ml Apomab για διάφορα χρονικά διαστήματα (0-48 h). Οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν μετά από ανάλυση κατά Western (Western Blot) χρησιμοποιώντας ειδικά για κάθε πρωτεΐνη αντισώματα.

105

5.1 Αντιπολλαπλασιαστική δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS

Για να καθορίσουμε την δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS, προσδιορίσαμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες επώασης με τις ουσίες, χρησιμοποιώντας σειρά συγκεντρώσεων (0 - 50 μM). Η απόκριση των καρκινικών κυττάρων KHOS στα δυο ανάλογα παρουσιάζονται στο Σχήμα 16Α. Παρατηρείται μια χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με το 7ΒΙΟ να παρουσιάζει μια ελαφρώς ισχυρότερη δράση.

5.2 Τα 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ δεν παρουσιάζουν σημαντική αποπτωτική δράση στην καρκινική σειρά KHOS

Ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από τις υπό μελέτη ουσίες μελετήθηκε αρχικά με την χρήση του "Tali Apoptosis Kit" (AnnexinV), καθορίζοντας έτσι το ποσοστό των κυττάρων τα οποία οδηγήθηκαν σε απόπτωση. Μετά την επώαση των KHOS με 6BIO ή 7BIO σε συγκέντρωση 15 μM, και οι δυο ουσίες παρουσίασαν μικρή ικανότητα να επάγουν απόπτωση στις 24 ώρες (12 %), η οποία αυξήθηκε στις 48 ώρες (30 %) (Σχήμα 16B). Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνονται και με την χρήση της χρώσης DAPI, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης μετά την επώαση των KHOS για 24 ώρες με τις υπό μελέτη ουσίες (Σχήμα 17A).

Στη συνέχεια, για να προσδιορίσουμε αν η μικρή αποπτωτική δράση των ουσιών σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, τα κύτταρα KHOS επωάστηκαν με τις ουσίες για διάφορα χρονικά διαστήματα (0-48 ώρες) και μετρήθηκε η ενεργότητα της κασπάσης-3 (Σχήμα 17B). Αύξηση της ενεργότητας παρατηρήθηκε μετά τη δράση του 6BIO στην συγκέντρωση των 15 μM, συγκριτικά με το μάρτυρα (0 h) ($p \le 0.05$). Το 7BIO παρουσίασε μια μικρότερη ενίσχυση της ενεργότητας της κασπάσης-3 μετά από 24 ώρες επώασης (Σχήμα 17B).

Στην συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε τον γενικό αναστολέα κασπασών, Z-VAD (OMe)-FMK με σκοπό να προσδιορίσουμε αν η δράση των ουσιών είναι εξαρτώμενη ή όχι από τις κασπάσες. Παρατηρούμε ότι με τη χρήση του αναστολέα κασπασών, η δράση του 6BIO καταστέλλεται μερικώς, αφού 48 ώρες επώαση με 15 μM 6BIO αύξησαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων KHOS μέχρι 72% (Σχήμα 17Γ). Το Z-VAD (OMe)-FMK είχε μια μικρή (34%), αλλά στατιστικώς σημαντική δράση στην αποτροπή του επαγόμενου από το 7BIO κυτταρικού θανάτου (Σχήμα 17Γ).

Τα αποτελέσματα μας δηλώνουν ότι και οι δύο ουσίες παρουσιάζουν μικρή αποπτωτική δράση, η οποία εξαρτάται μερικώς από τις κασπάσες.



Σχήμα 16: (A) Δράση των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στην βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων KHOS. Τα κύτταρα εκτέθηκαν για 48 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ. Προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με την χρήση των τεχνικών MTT (p values: 6ΒΙΟ/7ΒΙΟ vs. control $\leq 0,01^{**}$). (B) Επώαση των κυττάρων με 15 μM 6ΒΙΟ ή 15μM 7ΒΙΟ για 24 και 48 ώρες και προσδιορισμός του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων χρησιμοποιώντας χρώση Annexin-V Alexa FluorR 488/PI. Το ποσοστό ζωντανών, νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων αναλύθηκε με την χρήση κυτταρόμετρου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το etoposide (100 μg/ml). Οι παρουσιαζόμενες τιμές αποτελούν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

(A)


Σχήμα 17: Προσδιορισμός της δράσης του 6BIO (15 μM) και 7BIO (15 μM) στην απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS. (A) Τα καρκινικά κύτταρα επωάστηκαν με τις ουσίες για 24 ώρες και παρατηρήθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους μετά από χρώση DAPI χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού. (B) Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις ουσίες για 0-48 ώρες και προσδιορίστηκε η ενεργότητα της κασπάσης-3 χρησιμοποιώντας το φθορισμογόνο υπόστρωμα της κασπάσης-3, zDEVD-AFC. (Γ) Τα καρκινικά κύτταρα KHOS εκτέθηκαν σε 15 μM 6BIO και 7BIO μM για 48 ώρες και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την προσθήκη του αναστολέα κασπασών Z-VAD (OMe)-FMK σε συγκέντρωση 50 μM. (p values: 6BIO vs. 6BIO+Z-VAD < 0,01**, 7BIO vs. 7BIO+Z-VAD < 0,05*). Οι παρουσιαζόμενες τιμές στις B και Γ αποτελούν τον μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

5.3 Επίδραση των 6BIO και 7BIO σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα KHOS

Για να προσδιορίσουμε το μηχανισμό της αποπτωτικής δράσης των υπό μελέτη ουσιών, αξιολογήσαμε τα επίπεδα έκφρασης ρυθμιστικών πρωτεϊνών του αποπτωτικού μονοπατιού στα KHOS κύτταρα. Εφαρμόστηκε η τεχνική Western blot για διάφορα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στις 0 ώρες (μάρτυρας), 6, 12, 24 36 και 48 ώρες μετά την επώασή τους με τις ουσίες χρησιμοποιώντας ποικίλα αντισώματα όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 18. Το 6BIO και το 7BIO σε συγκέντρωση 15 μΜ προκάλεσαν μερική κατάτμηση και συνεπώς ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PARP (Σχήμα 18 A, B). Επίσης μετά την επώαση με το 6BIO, παρατηρήθηκε μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση της κασπάσης-3 και κασπάσης-8. Επιπλέον, και οι δυο ουσίες αύξησαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21, το 6BIO στις 36 και 48 ώρες, ενώ το 7BIO από τις 6 ώρες και μετά. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR), όπου παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση της p21 σε επίπεδο mRNA και μείωση των επιπέδων της κυκλίνης Ε, στοιχεία που υποδηλώνουν πιθανή κατασταλτική δράση των ουσιών στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων KHOS (Σχήμα 18Γ).

Τα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης του DR5 αυξήθηκαν σημαντικά μετά την δράση του 6BIO (Σχήμα 17Α), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή μετά από επώαση των KHOS με το 7BIO (Σχήμα 18B).

Τέλος, μελετήσαμε τη δράση των ουσιών στον κυτταρικό κύκλο των υπό μελέτη KHOS κυττάρων (Πίνακας 3). Το 6BIO επάγει μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση στο ποσοστό των κυττάρων που σταματάνε στην φάση G₀/G₁ (G₀/G₁ DNA content), από 46,6% (± 1,6) στο χρόνο 0 στο 67,1% (± 1,1) μετά από 24 ώρες επώασης. Αυτό συνοδεύτηκε με μείωση του ποσοστού των κυττάρων στην φάση G₂/M, από 31,9% (± 0,9) στο χρόνο 0 στο 15,8 % (± 3,1) μετά από 24 ώρες επώασης. Παρατηρήθηκε μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση sub-G₁, από 3,2 % (± 2,0) στο χρόνο 0 σε 10,3 % στις 24 ώρες, γεγονός που δηλώνει αποπτωτική δράση της ουσίας. Το 7BIO επάγει μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στην φάση G₂/M, η οποία από 31,9% (± 0,9) μειώθηκε στο 23,7% (± 2,7) μετά από 24 ώρες επώασης με το 7BIO. Επιπλέον όπως και με το 6BIO, παρατηρήθηκε μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση στο 23,7% (± 2,7) μετά από 24 ώρες επώασης στην φάση Sub-G₁ από 3,2% (± 2,0) στο 2,1%

(± 1,7) μετά από 24 ώρες επώασης, υποδηλώνοντας και σε αυτή την περίπτωση, την αποπτωτική δράση της 7BIO.

Τα αποτελέσματα μας για την δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO στα κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS δηλώνουν ότι το 6BIO και το 7BIO παρουσιάζουν μικρή αποπτωτική δράση, ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες, αλλά και το ανεξάρτητο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Η κύρια αντικαρκινική τους δράση φαίνεται να ασκείται μέσω άρσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G_0/G_1 , η οποία εξαρτάται από την αύξηση της πρωτεΐνης p21 και τη μείωση των επιπέδων της κυκλίνης Ε.



Σχήμα 18: Δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO σε πρωτεΐνες-κλειδιά του αποπτωτικού μονοπατιού και του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα KHOS επωάστηκαν με 15 μM 6BIO (A) ή 15 μM 7BIO (B) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 48 ώρες) και οι μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών ανιχνέυθηκαν με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων σε ανάλυση κατά Western (Western Blot). (Γ) Δράση των ουσιών στην έκφραση του p21 και της κυκλίνης E σε επίπεδο mRNA μέσω ανάλυσης με Real-Time PCR (p values: 6BIO/7BIO vs. control \leq 0,01**). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επίπεδα αύξησης συγκριτικά με τον μάρτυρα που είναι τα μη επωασμένα με τις ουσίες κύτταρα.

Treatments

Treatments

Πίνακας 3. Δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στον κυτταρικό κύκλο των ΚΗΟS κυττάρων.



DNA Content (%)				
Control	7BIO 12h	7BIO 24h	6BIO 12h	6BIO 24h
3.2 (± 2.0)	4.8 (± 0.9)	12.1 (± 1.7)	7.3 (± 0.9)	10.3 (± 2.9)
46.6 (± 1.6)	49.1 (± 1.6)	56.7 (± 1.1)	50.2 (± 1.8)	67.1 (± 1.1)
10.9 (± 0.7)	7.4 (± 2.0)	5.9 (± 0.5)	8.9 (± 1.3)	6.5 (± 1.6)
31.9 (± 0.9)	37.1 (± 1.3)	23.7 (± 2.7)	32.8 (± 0.6)	15.8 (± 3.1)
	Control 3.2 (± 2.0) 46.6 (± 1.6) 10.9 (± 0.7) 31.9 (± 0.9)	Control7BIO 12h $3.2 (\pm 2.0)$ $4.8 (\pm 0.9)$ $46.6 (\pm 1.6)$ $49.1 (\pm 1.6)$ $10.9 (\pm 0.7)$ $7.4 (\pm 2.0)$ $31.9 (\pm 0.9)$ $37.1 (\pm 1.3)$	DNA Content (%)Control7BIO 12h7BIO 24h $3.2 (\pm 2.0)$ $4.8 (\pm 0.9)$ $12.1 (\pm 1.7)$ $46.6 (\pm 1.6)$ $49.1 (\pm 1.6)$ $56.7 (\pm 1.1)$ $10.9 (\pm 0.7)$ $7.4 (\pm 2.0)$ $5.9 (\pm 0.5)$ $31.9 (\pm 0.9)$ $37.1 (\pm 1.3)$ $23.7 (\pm 2.7)$	DNA Content (%)Control7BIO 12h7BIO 24h6BIO 12h $3.2 (\pm 2.0)$ $4.8 (\pm 0.9)$ $12.1 (\pm 1.7)$ $7.3 (\pm 0.9)$ $46.6 (\pm 1.6)$ $49.1 (\pm 1.6)$ $56.7 (\pm 1.1)$ $50.2 (\pm 1.8)$ $10.9 (\pm 0.7)$ $7.4 (\pm 2.0)$ $5.9 (\pm 0.5)$ $8.9 (\pm 1.3)$ $31.9 (\pm 0.9)$ $37.1 (\pm 1.3)$ $23.7 (\pm 2.7)$ $32.8 (\pm 0.6)$

Τα KHOS κύτταρα επωάστηκαν με 15 μM 6BIO ή 15 μM 7BIO για διάφορα χρονικά διαστήματα (0 έως 24 ώρες) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό της κατανομής των κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± S.E. τιμών τριών πειραμάτων.

6.1 Δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO στο in vivo πειραματικό μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στον λιπώδη ιστό μαστού ποντικών

Για τον προσδιορισμό της αντικαρκινικής δράσης των ουσιών 6BIO και 7BIO *in vivo*, χρησιμοποιήσαμε τα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα, τα οποία επιμολύναμε χρησιμοποιώντας την τριών γονιδίων αναφοράς ρετροϊική κατασκευή (Triple reporter retroviral gene construct) NES-TGL (Σχήμα 19Α). Ακολούθως, με την βοήθεια κυτταροδιαχωριστή ροής, απομονώσαμε τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν αυξημένα επίπεδα GFP και μελετήσαμε *in vitro* την ενεργότητα της λουσιφεράσης στα συγκεκριμένα κύτταρα (Σχήμα 19B).

Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε PBS σε συγκέντρωση 0,8x10⁶ κύτταρα/10 μλ για να χορηγηθούν στα ζώα. Ο ενοφθαλμισμός των ανοσοκατεσταλμένων Balb/c Nu/Nu ποντικών έγινε όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, με 4 ποντίκια σε κάθε ομάδα, ανάλογα με τη θεραπεία που τους χορηγήθηκε: (α) την ομάδα του μάρτυρα, δηλαδή ζώα στα οποία χορηγήθηκε μόνο PBS, (β) την ομάδα θεραπείας με 6BIO σε συγκέντρωση 30mg/kg/δόση και (γ) την ομάδα θεραπείας με 7BIO σε συγκέντρωση 30mg/kg/δόση. Εκτός της ημέρας 1, πραγματοποιήθηκαν δύο επιπλέον μετρήσεις, την 10^η και την 17^η μέρα θεραπείας, χρησιμοποιώντας το σύστημα ανάλυσης εικόνας Xenogen IVIS 100 Bioluminescence Imaging System. Στο τέλος της θεραπείας αφαιρέθηκαν οι πνεύμονες των ποντικών, με σκοπό την ανίγνευση των καρκινικών κυττάρων που μετανάστευσαν στους πνεύμονες. Στο Σχήμα 20Α, παρουσιάζονται οι εικόνες των ανοσοκατεσταλμένων ποντικών σε κάθε ομάδα, όπου διακρίνεται το σήμα που εκπέμπουν τα επιμολυσμένα κύτταρα μετά την χορήγηση του υποστρώματος της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι μέχρι και την 17^{η} ημέρα μέτρησης, το 6BIO και το 7BIO μειώνουν την ανάπτυξη των όγκων του μαστού κατά 43,25% $(p \le 0.05)$ και 46,5% $(p \le 0.05)$, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 20B, Γ). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι το 7BIO, αλλά κυρίως το 6BIO μειώνουν και το ποσοστό μετάστασης των καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα των ζώων, κατά 18,27% (p \leq 0,05) και 37,25% (p \leq 0,05), αντίστοιγα (Σγήμα 20Δ).

Τα αποτελέσματα από το *in vivo* πειραματικό μας μοντέλο συμφωνούν με τα *in vitro* αποτελέσματά μας, όπου παρατηρούμε την αντικαρκινική δραστικότητα και των δύο ουσιών στο σύστημα ενός ζωντανού οργανισμού. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αντιμεταστατική δράση που εμφανίζει το 6BIO, το οποίο in vivo μειώνει σημαντικά το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που μεταναστεύουν στον πνεύμονα των πειραματοζώων.

114



Σχήμα 19: (A) Η γονιδιακή κατασκευή (Triple reporter retroviral gene construct NES-TGL) με την οποία επιμολύναμε τα MDA-MB-231-TXSA κύτταρα. (B) Απομόνωση με κυτταροδιαχωρισμό ροής των κυττάρων. Τα κύτταρα που επιλέξαμε παρουσιάζουν: αυξημένη έκφραση GFP (ι), εκφράζουν GFP μετά από παρακολούθηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (ιι), έχουν αυξημένα επίπεδα ως προς την ενεργότητα της λουσιφεράσης συγκριτικά με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα (ιιι), επιβεβαιώνοντας ότι η επιμόλυνση και επισήμανση των κυττάρων με GFP είναι επιτυχής.

(A)



Σχήμα 20: Προσδιορισμός της in vivo αντικαρκινικής και αντιμεταστατικής δράσης των ουσιών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στο μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στον λιπώδη ιστό του μαστού ποντικών. (Α) Εικόνες των ανοσοκατεσταλμένων ποντικών σε κάθε ομάδα, όπου διακρίνεται το σήμα που εκπέμπουν τα ενοφθαλμισμένα κύτταρα μετά την χορήγηση του υποστρώματος της λουσιφεράσης, λουσιφερίνη. Στις δεξιές στήλες διακρίνονται οι πνευμονικές μεταστάσεις ανά ομάδα πειραματοζώων.





Σχήμα 20: Προσδιορισμός της in vivo αντικαρκινικής και αντιμεταστατικής δράσης των ουσιών 6BIO και 7BIO στο μοντέλο ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στον λιπώδη ιστό μαστού ποντικών. (B) Μέτρηση της ανάπτυξης των όγκων κατά τη διάρκεια του πειράματος (την 1η, 10η και 17η ημέρα) με την χρήση του Xenogen IVIS 100 Bioluminescence Imaging System, μετά από ποσοτικοποίηση του σήματος ως φωτόνια /δευτερόλεπτο (photons counts/second). (Γ) Προσδιορισμός του ποσοστού μείωσης του καρκινικού φορτίου την 17η ημέρα της θεραπείας των ποντικών με 6BIO και 7BIO (Δ) Προσδιορισμός του ποσοστού μείωσης των μεταστατικών εστιών στους πνεύμονες των ποντικών, την 17η ημέρα της θεραπείας με 6BIO και 7BIO. (p values: 6BIO/7BIO vs. control $\leq 0,05^*$).

Συζήτηση

Οι ουσίες 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ως ανάλογα της δραστικής αντικαρκινικής ουσίας ιντιρουπίνης, η οποία θεωρείται το ενεργό συστατικό εκχυλίσματος από 11 διαφορετικές ουσίες φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιείτο πριν από δεκαετίες για την αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (Xiao, et al., 2002). Αυτά τα ανάλογα αποτελούν βελτιωμένη μορφή του αρχικού μορίου με πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση και καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα (Ribas, et al., 2006; Xiao, et al., 2002). Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, οι 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ μελετήθηκαν σε ένα σύνολο βιολογικών συστημάτων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, τα οποία μας επέτρεψαν να εξετάσουμε όχι μόνο την αποτελεσματικότητα, αλλά και το μηχανισμό δράσης τους. Στοχεύσαμε στην διερεύνηση μηχανισμών που σχετίζονται με: (ι) την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και επαγωγή της απόπτωσής τους και (ιι) την καταστολή μεταστατικών οδών μεταγωγής μηνυμάτων και κατά συνέπεια, αναστολή της παραγωγής παραγόντων, κρίσιμων για τη διεισδυτική και μεταστατική δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων.

Η συγκριτική ανάλυση της επίδρασης των υπό εξέταση ουσιών στις τρεις βασικές φάσεις της καρκινογένεσης καταλήγει σε μια ολοκληρωμένη εκτίμηση των χημικών, βιολογικών και κυτταρικών αλλαγών που επάγονται από τα 6BIO και 7BIO, έτσι ώστε να προσδιοριστούν νέοι βιολογικοί δείκτες ανταπόκρισης. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης βελτιωμένων δομικών αναλόγων φυτικών ουσιών στην ενίσχυση της αποπτωτικής, αντικαρκινικής και αντιμεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων, στοιχεία ιδιαίτερα χρήσιμα για την πρόληψη και τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου. Η αναστολή της μετάστασης με μεθόδους μη τοξικές και με φάρμακα που είναι φυσικά παράγωγα, αποτελεί μια επιθυμητή θεραπευτική λύση, αφού με την αναγνώριση του μηχανισμού δράσης των υπό μελέτη μορίων, που αποτελεί τον κυριότερο στόχο αυτής της διδακτορικής διατριβής, όπως επίσης και των μοριακών στόχων των ουσιών αυτών, ίσως αποκαλυφθούν νέοι τρόποι συνδυασμού ουσιών που θα κάνουν την πρόληψη της μετάστασης του καρκίνου ακόμη πιο αποτελεσματική.

Η εξέταση των δύο αναλόγων της ιντιρουπίνης, 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ, τα οποία ενώ έχουν παρόμοια δομή παρουσιάζουν διαφορετική δράση, παρέχει σημαντικές πληροφορίες στους ερευνητές και ειδικότερα στους συνθετικούς χημικούς που ασχολούνται με το σχεδιασμό φαρμάκων (drug design), οι οποίοι συχνά δείχνουν ότι ουσίες με ελάχιστες διαφορές στη

χημική δομή τους, μπορεί να έχουν διαφορετικές, ενισχυμένες ή και ανταγωνιστικές, δραστικότητες.

Η παρούσα διατριβή είναι καινοτόμος και πρωτότυπη, και η πορεία της σχεδιάστηκε έτσι ώστε τελικά να μπορέσει να προσφέρει τουλάχιστον μία, ίσως και δύο, νέες ουσίες στον αγώνα για την καταπολέμηση του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη, μαστού και του οστεοσαρκώματος. Επιπρόσθετα, είναι η πρώτη αναλυτική μελέτη που προσδιορίζει τον πλήρη μηγανισμό δράσης δύο υποσχόμενων ουσιών, των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ, καταδεικνύει για πρώτη φορά την αποπτωτική δράση του 7ΒΙΟ στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, όπως επίσης και υποδεικνύει ότι η δράση των ουσιών δεν είναι κοινή σε όλες τις καρκινικές σειρές, αλλά είναι μάλλον κυτταροειδική. Για πρώτη φορά επίσης, μελετάται η συνδυαστική δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO με τα αποπτωτικά μόρια TRAIL και Apomab, αναλύοντας τον υποκείμενο μηγανισμό δράσης και τονίζοντας τη σημαντικότητα της συνδυασμένης τους δραστικότητας, δηλαδή της συνέργειάς τους. Η εξεύρεση μιας ουσίας με την ικανότητα να δρα αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης, μετανάστευσης και μετάστασης των καρκίνων του προστάτη, του μαστού όπως επίσης και του οστεοσαρκώματος, είναι ανεκτίμητης αξίας, λόγω του γεγονότος ότι με τα μέσα που διαθέτει σήμερα η κλινική ιατρική πρακτική, πολλοί ασθενείς βρίσκονται ήδη σε προχωρημένο στάδιο της νόσου προτού αυτή καν διαγνωστεί. Σε αρκετούς καρκινοπαθείς, η μετάσταση των νεοπλασματικών κυττάρων έχει ήδη αρχίσει πριν διαγνωστεί η νόσος, και ο καρκίνος, στη μεταστατική του μορφή, αποτελεί ουσιαστική απειλή για την ζωή τους.

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η αντικαρκινική δράση των συνθετικών αναλόγων της ιντιρουπίνης 6BIO και 7BIO σε τρεις από τους πλέον κοινούς τύπους καρκίνου, στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού και στο οστεοσάρκωμα.

Οι ανεπιθύμητες επιπτώσεις από τις διάφορες θεραπείες που χρησιμοποιούνται σήμερα ενάντια στον καρκίνο του προστάτη, οδηγούν στην ανάγκη ανεύρεσης και σχεδιασμού νέων βιολογικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Στην έρευνα κατά του καρκίνου γενικά, αλλά και ειδικότερα στον καρκίνο του προστάτη, σημαντικό ρόλο μπορούν να διαδραματίσουν ουσίες που έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν απόπτωση. Μελετήσαμε, συνεπώς, τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3, LNCaP και DU145 μετά την επώαση τους με τις ουσίες 6BIO και 7BIO, καθώς επίσης και το μηχανισμό πρόκλησης του κυτταρικού θανάτου. Οι ουσίες συνδυάστηκαν επίσης με τις αποπτωτικές πρωτεΐνες TRAIL και Apomab. Τα αποτελέσματα μας κατέδειξαν ότι τα ιντικοειδή 6BIO και 7BIO ασκούν ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση στα υπό μελέτη καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήξαμε μετά από in vitro κυτταροτοξικές αναλύσεις, όπου μετά την έκθεση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε 6BIO και 7BIO, παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με την κυτταρική σειρά LNCaP να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τις άλλες δύο (Σχήματα 1.1, 1.2, 1.3). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι μετά τον συνδυασμό των 6BIO και 7BIO με τις αποπτωτικές ουσίες TRAIL (100 ng/ml) και Apomab (100 ng/ml), παρατηρήθηκε ακόμα πιο έντονη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα PC3, LNCaP και DU145 εκτέθηκαν σε σειρά χαμηλότερων συγκεντρώσεων των υπό μελέτη ουσιών, δηλαδή σε 5-10 μM 6BIO και 7BIO, 25-50 ng/ml TRAIL και 50 ng/ml Apomab. Παρατηρήσαμε ότι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπου η δράση των ουσιών όταν χορηγηθούν μεμονωμένες μειώνεται, ο συνδυασμός τους συνεχίζει να επάγει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Σχήματα 1.2.1, 3.1.1, 3.1.2, 4.1.1, 4.1.2). Τα 6BIO και TRAIL, και σε μικρότερο βαθμό το 7BIO μαζί με το TRAIL, επάγουν αποπτωτική δράση, ενώ η δραστικότητα του Apomab είναι σχεδόν αμελητέα. Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται στις πιο κάτω παρατηρήσεις: (1) επώαση με τα 6BIO και 7BIO προκαλεί στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη μορφολογικές αλλαγές, γαρακτηριστικές της απόπτωσης, όπως είναι το μειωμένο μέγεθος του πυρήνα τους, η συμπύκνωση της χρωματίνης και η ανίχνευσή της στην περιφέρεια της πυρηνικής μεμβράνης, και αυτά τα χαρακτηριστικά παρατηρούνται εντονότερα στα LNCaP (Σχήμα 5.2), και (2) μετά από επώαση με τα 6BIO και 7BIO επάγεται ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (Σχήμα 6). Η πρόκληση κυτταρικού θανάτου από τα 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ συμβαίνει διαμέσου του εξαρτώμενου από τις κασπάσες αποπτωτικού μονοπατιού, καθότι παρατηρούμε ενεργοποίηση και διάσπαση των κασπασών-9 και -3, καθώς επίσης και του τελικού αποδέκτη της διαδικασίας, της πρωτεΐνης PARP. Το TRAIL επίσης δρα αποπτωτικά στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, ενεργοποιώντας το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, μετά την κατάτμηση και ενεργοποίηση της κασπάσης-8, της κασπάσης-3 και της πρωτεΐνης PARP. Το Apomab παρουσιάζει μικρή δράση σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο συνδυασμός των παραγώγων της ιντιρουπίνης με τις αποπτωτικές ουσίες TRAIL και Apomab προκαλεί εντονότερη αποπτωτική δράση, αυξάνοντας σημαντικά την ενεργότητα της κασπάσης-3, συγκριτικά με τις ουσίες 6BIO και 7BIO μεμονωμένα (Σχήμα 6). Επίσης, από το συνδυασμό φαίνεται να ενεργοποιούνται παράλληλα και το εξωγενές και το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι, συμπέρασμα που υποστηρίζεται από: (ι) τα αυξημένα μορφολογικά αποπτωτικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν μετά τον ποιοτικό έλεγχο των πυρήνων των κυττάρων του προστάτη με τη χρωστική DAPI (Σχήμα 5), και (ιι) την εντονότερη διάσπαση των κασπασών σε σχέση με την δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO μεμονωμένα (Σχήμα 6).

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματά μας για την δράση των 6BIO και 7BIO στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, δηλώνουν ότι τα δύο ανάλογα της ιντιρουπίνης δρουν αντιπολλαπλασιαστικά αλλά και αποπτωτικά επάγοντας την ενεργοποίηση του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού. Το TRAIL επίσης δρα αποπτωτικά αλλά ενεργοποιώντας το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, ενώ το Apomab παρουσιάζει αμελητέα δράση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Ο συνδυασμός των ουσιών ενισχύει σημαντικά την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση και επάγει ισχυρότερη αποπτωτική δράση, ενεργοποιώντας ταυτόχρονα και το εξωγενές και το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με το TRAIL, το οποίο παρουσιάζει διαφορετική δράση ανάλογα με του τύπο της καρκινικής σειράς στη οποία δρα, ή ακόμη και σε καρκινικά κύτταρα ιδίου τύπου καρκίνου, όμως δεν έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός επαγωγής της διαφορετικής κυτταρικής απόκρισης. Πιστεύεται όμως, ότι η διαφορετική έκφραση των υποδοχέων θανάτου-DRs (Degli-Esposti, Smolak, et al., 1997; Griffith, et al., 1998; Keane, et al., 1999; X. D. Zhang, Franco, et al., 2000; X. D. Zhang, Nguyen, et al., 2000) και η υπερέκφραση ενδοκυττάριων αποπτωτικών πρωτεϊνών (FLIP) και κατασταλτικών πρωτεϊνών της απόπτωσης (IAPs) σε κάθε καρκινική σειρά μεταβάλλει και την ευαισθησία των κυττάρων έναντι του TRAIL (Suliman, et al., 2001). Στα δικά μας αποτελέσματα παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο, όπου οι τρεις υπό μελέτη σειρές καρκίνου του προστάτη παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στις ουσίες μας. Μελετήσαμε λοιπόν, με την βοήθεια κυτταρομέτρου ροής, τη φυσιολογική έκφραση των DR4 και DR5 στα καρκινικά κύτταρα PC3, LNCaP και DU145 (Σχήμα 7). Παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση των DR4 και DR5 στις σειρές DU145 και LNCaP, σε σχέση με τα PC3 κύτταρα. Αυτό φαίνεται να σχετίζεται με την αυξημένη ευαισθησία που παρουσιάζουν οι δύο πρώτες καρκινικές σειρές προστάτη στις υπό μελέτη ουσίες μας σε σχέση με τα PC3. Γενικά είναι γνωστό ότι το TRAIL και το Apomab ενεργοποιούν το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης, αφού δεσμεύονται στους υποδοχείς θανάτου-DRs (Adams, et al., 2008; MacFarlane, 2003).

Επίσης, σύμφωνα με τους Nimmanapalli και συνεργάτες, η δράση του TRAIL για 24 ώρες σε καρκινικά κύτταρα προστάτη αποδείχθηκε να ποικίλει, ανάλογα με την κυτταρική σειρά (Nimmanapalli et al., 2001). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η αποπτωτική δράση του TRAIL σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη μπορεί να ενισχυθεί όταν αυτή συνδυαστεί με άλλες χημειοθεραπευτικές ουσίες (Shankar, et al., 2005). Για παράδειγμα, οι Valen και συνεργάτες απέδειξαν ότι ο συνδυασμός του TRAIL με etoposide (VP16) και άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, όπως η ActD και το CDDP σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (OS, Saos-2, SJSA-1, U20S), ενίσχυσε την αποπτωτική του δράση αυξάνοντας την έκφραση των υποδοχέων θανάτου-DRs και μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl2, Bcl-xL, XIAP), με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων στο TRAIL (Van Valen et al., 2003). Επίσης, η ερευνητική ομάδα του Cuello και συνεργατών, μελέτησε τη συνδυαστική δράση του TRAIL με διάφορα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, όπως είναι η cis-πλατίνα (cisplatin), η δοξορουβικίνη (doxorubicin) και το paclitaxel σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών (Cuello, Ettenberg, Nau, & Lipkowitz, 2001). Τα αποτελέσματα έδειξαν ενισχυμένη αποπτωτική δράση του συνδυασμού των ουσιών, η οποία ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία των DRs. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο συνδυασμός των ουσιών 6BIO και 7BIO με τα TRAIL και Apomab, αυξάνουν την έκφραση των DRs, γεγονός το οποίο να φαίνεται να συσχετίζεται με την αυξημένη δραστικότητα που παρατηρείται (Σχήμα 6.3). Η συνδυαστική δράση του 6BIO με άλλα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα όπως η μεθοτρεξάτη (methotrexate), έχει επίσης πρόσφατα μελετηθεί από τους Berndt και συνεργάτες. Παρατήρησαν ότι με το συνδυασμό των ουσιών ενεργοποιείται το μονοπάτι της β-κατενίνης στα καρκινικά κύτταρα μελανώματος Α375, το οποίο δρα αντιπολλαπλασιαστικά. Άλλα συνθετικά ανάλογα της ιντιρουπίνης που έχουν μελετηθεί σε συνδυασμό με το TRAIL, όπως το 8-Rha-β, αποδείγθηκαν να αυξάνουν την ευαισθησία των ανθεκτικών στο TRAIL καρκινικών κυττάρων, μέσω αύξησης της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου όπως επίσης και την ταυτόχρονη ενεργοποίηση του εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης (A. Berger et al.). Σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, το TRAIL έχει επίσης μελετηθεί σε συνδυασμό με το γνωστό χημειοπροστατευτικό μόριο ρεσβερατρόλη (Resveratrol), από τους Ganapathy και συνεργάτες (Ganapathy, Chen, Singh, Shankar, & Srivastava). Ο συνδυασμός επάγει ισχυρή αποπτωτική δράση, επίσης μέσω σημαντικής αύξησης των υποδοχέων θανάτου, DR4 και DR5. Το Apomab είναι γνωστό ότι επάγει απόπτωση ενεργοποιώντας το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι μέσω του DR5 (Adams, et al., 2008). Ο συνδυασμός του με

άλλες ουσίες, όπως είναι η ταξόλη (Taxol), και διάφορα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, όπως η καρβοπλατίνα (carboplatin), σε κύτταρα NCI-H460 από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (non small cell lung canreinoma), προκάλεσε ενισχυμένη αποπτωτική δράση *in vitro*, αλλά και *in vivo*, μειώνοντας την εξέλιξη και ανάπτυξη του όγκου (Jin, et al., 2008). Η ενισχυμένη δράση συσχετίστηκε με τη ταυτόχρονη ενεργοποίηση του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού από την ταξόλη (Taxol) και τα άλλα χημειοθεραπευτικά (Jin, et al., 2008). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει και τα δικά μας αποτελέσματα, όπου βλέπουμε ταυτόχρονη ενεργοποίηση του ενδογενούς και εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού μετά το συνδυασμό των 6BIO και 7BIO με το TRAIL και το Apomab, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντικαρκινικής τους δράσης.

Εκτός από την αποπτωτική τους δράση, τα 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ μελετήθηκαν και για τις αντιμεταστατικές τους ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και PC3. Οι δύο ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις που βρέθηκαν να μην επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων (1 και 5 μΜ) και μελετήθηκε η δράση τους στη διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων, όπως επίσης και στην ενεργότητα της πρωτεάσης uPA. Σε συγκέντρωση 1 μΜ και 5 μΜ, το 6ΒΙΟ μειώνει σημαντικά, φτάνοντας μέχρι και περίπου 50%, την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων PC3, αλλά και των DU145 (Σχήμα 8.1). Μάλιστα, τα επίπεδα μείωσης της διείσδυσης των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών ήταν αντίστοιχα με τα επίπεδα του θετικού μας μάρτυρα (etoposide). Σημαντική ήταν επίσης η μείωση που παρατηρήθηκε στην ενεργότητα του uPA στα επωασμένα με 6BIO, PC3 και DU145 κύτταρα. Ιδιαίτερα στα DU145, η μείωση ήταν και πάλι ιδιαίτερα σημαντική για τις πιο πάνω συγκεντρώσεις, φτάνοντας σε παρόμοια ποσοστά μείωσης με αυτά του θετικού μας μάρτυρα (etoposide). Αντίθετα, στα PC3 κύτταρα, η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν της τάξης του 25% συγκριτικά με τα μη επωασμένα με 6BIO κύτταρα (Σχήμα 8.2). Το 7BIO, όπως αναμενόταν, δεν παρουσίασε καμία δράση στην ενεργότητα της πρωτεάσης uPA. Τα αποτελέσματα μας, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αντι-διεισδυτικής δραστικότητας των υπό μελέτη ουσιών, προτείνουν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις το 6BIO, αλλά όχι το 7BIO, δρα κατασταλτικά στη διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων PC3 και DU145, η οποία ίσως να οφείλεται και στην άμεση κατασταλτική ικανότητα της ουσίας 6BIO στην ενεργότητα της πρωτεάσης uPA.

Το 6BIO έχει μελετηθεί και σε άλλες καρκινικές σειρές, παρουσιάζοντας σημαντικές αντιμεταστατικές ιδιότητες. Οι Williams και συνεργάτες, χρησιμοποιώντας ένα τρισδιάστατο σύστημα δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης (3D spheroid migration assay) σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87, απέδειξαν ότι το 6BIO, όπως και άλλα συνθετικά ανάλογα της ιντιρουπίνης, επάγουν μια δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη μείωση της διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων σε συγκέντρωση 5 μM (Williams et al.), το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Επίσης, το 6ΒΙΟ εμπόδισε κατά 48% τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος GBM9 (glyoblastoma-derived neurosphere-initiating cells) (Williams, et al.). In vivo, σε αθυμικά ποντίκια τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με τα GBM9, έχει παρατηρηθεί μείωση κατά 40% της μετάστασης των κυττάρων συγκριτικά με το μάρτυρά τους. Η αντιμεταστατική ικανότητα του 6BIO έχει θεωρηθεί ότι οφείλεται στην καταστολή που ασκεί στην GSK3β, επηρεάζοντας έτσι το μονοπάτι της β-κατενίνης. Το 6ΒΙΟ καταστέλλει και τη διεισδυτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, που είναι κύτταρα σημαντικά για την αγγειογένεση (Williams, et al.). Όπως είναι γνωστό, μία από τις σημαντικές διαφορές του 6BIO από το 7BIO, είναι η ισχυρή κατασταλτική δράση του 6BIO στην GSK3β, ενώ αντίθετα, το 7BIO παρουσιάζει ασθενή κατασταλτική δράση στην ίδια κινάση (Leclerc, et al., 2001). Συνεπώς, ίσως η παρατηρούμενη κατασταλτική δράση του 6ΒΙΟ, αλλά όχι του 7ΒΙΟ, στην μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να οφείλεται στην διαφορετική δράση των ουσιών στην GSK3_β.

Συμπερασματικά, στη διατριβή αυτή παρουσιάσαμε τους πιθανούς μηγανισμούς δράσης των ιντικοειδών 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, οι οποίοι προσδίδουν στις ουσίες αυτές την ικανότητα να δρουν αποπτωτικά. Κυρίως το 6ΒΙΟ, αλλά και το 7ΒΙΟ σε λιγότερο έντονο βαθμό, φαίνεται να δρουν μέσω του εξαρτώμενου από τις κασπάσες μονοπατιού. Παράλληλα ο συνδυασμός τους με τις αποπτωτικές ουσίες TRAIL και Apomab ενισχύει τη δράση τους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ουσίες δρουν συνεργιστικά. Η σημαντικότητα του αποτελέσματος αυτού έγκειται στο γεγονός ότι μείωση χορηγούμενης δοσολογίας των ουσιών εξασφαλίζει τη διατήρηση της της αποτελεσματικότητας που παρουσιάζουν οι συνδυασμοί, παρέχοντας έτσι το πλεονέκτημα της μειωμένης τοξικότητας κατά τη συνδυαστική χρήση τους. Ο συνδυασμός φαρμακευτικών ουσιών χρησιμοποιείται ευρέως στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, γιατί έχει πολλά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις συνδυασμού θεραπευτικών ουσιών με συνεργιστική δράση επιτυγχάνεται ενίσχυση του θεραπευτικού αποτελέσματος. Αυτό μπορεί να συμβαίνει για δύο λόγους: (1) ο

συνδυασμός των ουσιών ενισχύει τη μεμονωμένη δράση τους έναντι ενός συγκεκριμένου στόχου, ή (2) ο συνδυασμός των ουσιών εξασφαλίζει τη σύγχρονη στόχευση πολλαπλών μορίων-στόχων (Chou, 2006). Σημαντικό πλεονέκτημα του συνδυασμού είναι επίσης και η μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τα καρκινικά κύτταρα, έναντι των ουσιών (Chou). Τα αποτελέσματα αυτά δίνουν σημαντικά στοιχεία για μια βιολογική, στοχευμένη θεραπεία ενάντια στον καρκίνο του προστάτη, με μειωμένη δραστικότητα ενάντια στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού. Επιπλέον, η ιδέα του συνδυασμού ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενδυνάμωση της δράσης άλλων γνωστών αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως τα TRAIL και Apomab, σε προστατικά καρκινικά κύτταρα.

Εκτός από τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, η δράση των 6BIO και 7BIO μελετήθηκε και σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Αρχικά, προσδιορίσαμε τη δραστικότητα των υπό μελέτη ουσιών σε πέντε καρκινικές σειρές μαστού (MCF-7, ZR75, MDA-MB-231, MDA-MB-468 και MDA-MB-231-TXSA) και αποδείξαμε ότι τα 6BIO και 7BIO μειώνουν, με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο, τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Πινακας 1) (Nicolaou, et al., 2012). Για την ανάλυση του μηχανισμού δράσης των ουσιών, χρησιμοποιήσαμε τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA, τα οποία ήταν και τα πιο ευαίσθητα στις ουσίες. Για πρώτη φορά αποδεικνύουμε ότι σε αυτή την κυτταρική σειρά, τα δύο συνθετικά ανάλογα της ιντιρουπίνης επάγουν κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, ενεργοποιώντας όμως διαφορετικά μοριακά μονοπάτια. Αν και το 6ΒΙΟ έχει αναφερθεί να δρα αποπτωτικά σε διάφορες καρκινικές σειρές (Ferandin, et al., 2006; Ribas, et al., 2006), στο πλαίσιο αυτής της διατριβής αναλύσαμε πλήρως το μοριακό μηχανισμό δράσης του. Όσον αφορά το 7ΒΙΟ, οι μέχρι τώρα αναφορές σε άλλες καρκινικές σειρές, είχαν προσδιορίσει ότι δεν δρα αποπτωτικά, αλλά επάγει νέκρωση (Ribas, et al., 2006; Ribas, et al., 2008). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ είναι ίδια σε όλες τις καρκινικές σειρές (Ribas, et al., 2006). Σε αυτή τη διατριβή, για πρώτη φορά, αποδείξαμε ότι το 7BIO επάγει αποπτωτικό θάνατο στην καρκινική σειρά MDA-MB-231-TXSA, ενεργοποιώντας κυρίως το ανεξάρτητο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Συγκεκριμένα, το 6BIO επάγει δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (Σχήμα 10) (Nicolaou, et al., 2012). Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι το 6BIO επάγει την κατάτμηση και ενεργοποίηση της κασπάσης-9, της κασπάσης-3 και της πρωτεΐνης PARP (Σχήμα 12), επιβεβαιώνοντας έτσι και τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ενεργότητας της κασπάσης-3. Μετά από χρήση του γενικού αναστολέα των κασπασών Ζ-

VAD (OMe)-FMK, παρατηρήσαμε σημαντική αναστολή του επαγόμενου από το 6BIO κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρου μαστού, σε αντίθεση με το 7ΒΙΟ, όπου, παρουσία του αναστολέα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της δράσης του (Σχήμα 11) (Nicolaou, et al., 2012). Αυτό στοιχειοθετεί τη διαφορετικότητα στη δράση αυτών το δύο ουσιών, όπου φαίνεται ότι το 6ΒΙΟ δρα αποπτωτικά μέσω των κασπασών, ενώ το 7ΒΙΟ δρα κυρίως ανεξάρτητα από τις κασπάσες. Ενδιαφέρων είναι και το αποτέλεσμα ότι μετά από επώαση των κυττάρων με το 7ΒΙΟ παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση της κασπάσης-3 και των p21, p53, FADD, DR4 και DR5, όπως επίσης και χρονοεξαρτώμενη κατάτμηση της κασπάσης-8, ορατή ήδη από τις πρώτες 12 ώρες (Σχήμα 12) (Nicolaou, et al., 2012). Μετά από ενεργοποίηση του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού, οι υποδοχείς θανάτου-DR συνδέονται μέσω των λειτουργικών τους κυτταροπλασματικών μοτίβων-περιοχών θανάτου (cytoplasmic death-domain motifs), με την περιοχή θανάτου της σχετιζόμενης με το Fas πρωτεΐνης FADD. Η FADD εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (Chen & Goeddel, 2002), όποτε η αυξημένη έκφραση των υποδοχέων θανάτου DR4 και DR5, στα επωασμένα με 7BIO καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA (Σχήμα 12), πιθανώς να συσχετίζεται με την παρατηρούμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Η έκφραση των DRs και της πρωτεΐνης p21, ρυθμίζεται μεταγραφικά από την p53 (X. Liu, Yue, Khuri, & Sun, 2004; Pistritto, Puca, Nardinocchi, Sacchi, & D'Orazi, 2007). Στα συγκεκριμένα κύτταρα, η πρωτεΐνη p53 είναι μεταλλαγμένη (Olivier et al., 2002; Pistritto, et al., 2007), οπότε η παρατηρούμενη αύξηση της πρωτεΐνης p21 από το 7BIO, είναι ανεξάρτητη από την p53. Διάφορες μελέτες έχουν ήδη αναφέρει την ενεργοποίηση της p21 (Datto, Li, et al., 1995; Datto, Yu, et al., 1995) ή την αύξηση της σταθερότητας της p21 (Archambault & Glover, 2009; Seo et al.), με μηγανισμό ανεξάρτητο της πρωτεΐνης p53.

Το 7ΒΙΟ επάγει τη στάση των MDA-MB-231-TXSA κυττάρων στην φάση G₂/M του κυτταρικού κύκλου και τη μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G₀/G₁, η οποία συσχετίζεται με την παρατηρούμενη αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p21. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p21, επάγει στάση στη φάση G₂ του κυτταρικού κύκλου (Flatt, Tang, Scatena, Szak, & Pietenpol, 2000). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω καταστολής της ενεργότητας του συμπλόκου Cdc2/Cyclin B1 από την πρωτεΐνη p21 και από το GADD45, το οποίο προσδένεται στο Cdc2 εμποδίζοντας την συμπλοκοποίησή του με τη Cyclin B1. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η μετάβαση του κυττάρου στη φάση της μίτωσης (Flatt, et al.,

2000). Βάσει αυτών των δεδομένων, η επαγόμενη από το 7ΒΙΟ καταστολή του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων MDA-MB-231-TXSA στη φάση G₂/M, συνδέεται άμεσα με την p21. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, όπου βλέπουμε στάση των κυττάρων στη φάση G₂/M, η οποία είναι ορατή ήδη από τις 6 ώρες επώασής τους με το 7ΒΙΟ (Πίνακας 2). Στις 24 ώρες, παρατηρούμε σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην πρώιμη G₁ (SubG₁) φάση του κύκλου, επιβεβαιώνοντας την αποπτωτική δράση του 7ΒΙΟ στα κύτταρα αυτά (Nicolaou, et al., 2012).

Τα αποτελέσματα μας δηλώνουν ξεκάθαρα ότι οι δύο ουσίες προκαλούν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού μέσω ενεργοποίησης διαφορετικών μηχανισμών: το 6BIO ασκεί εξαρτώμενη από τις κασπάσες αποπτωτική δράση, ενεργοποιώντας το ενδογενές (μιτοχονδριακό) μονοπάτι της απόπτωσης. Αντιθέτως, το 7BIO επάγει αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση της p21, η οποία συνοδεύεται με στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂/M. Επίσης, επάγει απόπτωση ενεργοποιώντας δύο διαφορετικά μονοπάτια της. Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, μέσω αύξησης της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου DR4/DR5 και ενεργοποίησης της κασπάσης-8, η οποία όμως δεν συνοδεύεται από ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Αν και υπάρχει μερική ενεργοποιήση του εξαρτώμενου από τις κασπάσες αποπτωτικού μονοπατιού, μετά την προσθήκη του γενικού αναστολέα των κασπασών, Z-VAD, μόνο τα μισά περίπου κύτταρα διασώζονται από τον κυτταρικό θάνατο (Σχημα 11), υποδηλώνοντας ότι το 7BIO επάγει απόπτωση και μέσω του ανεξάρτητου από τις κασπάσες μονοπατιού (Nicolaou, et al., 2012).

Οι ουσίες μελετήθηκαν σε μεταστατικά κύτταρα μαστού, τα οποία είναι ανθεκτικά στο Apomab, τα MDA-MB-231-TXSA-R (TXSA-R). Σκοπός μας ήταν να δούμε κατά πόσο οι ουσίες μας μπορούν να επαναφέρουν την ευαισθησία των κυττάρων αυτών στο Apomab, αναστρέφοντας την ανθεκτικότητά τους. Τα αποτελέσματα μας είναι εντυπωσιακά. Σε προσδιορισμού κυτταροτοξικότητας πειράματα της των ουσιών, το Apomab χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100ng/ml, που δεν παρουσίαζε καμία δραστικότητα στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντίθετα παρατηρήσαμε μία δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του 6BIO (10 μM) και του 7BIO (10 μM), τα οποία μείωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από 48 ώρες επώασης, κατά 18% και 25%, αντίστοιχα. Σημαντικότερα ήταν τα αποτελέσματα μετά από συνδυασμό των ουσιών 6BIO και 7BIO με το Apomab (100 ng/ml) στις 48 ώρες, όπου παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση στη βιωσιμότητα των TXSA-R κυττάρων, της τάξεως του 82%, με το

συνδυασμό 10 μM 6BIO με 100 ng/ml Apomab, και 53% με τον συνδυασμό 10 μM 7BIO με 100 ng/ml Apomab (Σχήμα 13). Η αντιπολλαπλασιαστική δράση που παρατηρείται στο συνδυασμό των ουσιών οφείλεται στην απόπτωση των κυττάρων, και επάγεται ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Με την προσθήκη του γενικού αναστολέα των κασπασών Z-VAD (OMe)-FMK, παρατηρήσαμε πλήρη καταστολή της δράσης του συνδυασμού 6BIO (10 μM) με το Apomab (100 ng/ml) μετά από 48 ώρες επώασης, όπου η βιωσιμότητα των κυττάρων αυξήθηκε στο 98% και η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική (p ≤ 0,01, Σχήμα 14B). Αντίθετα, η παρουσία του ίδιου αναστολέα παρουσίασε μικρή και όχι σημαντική, δράση στην αποτροπή του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου των TXSA-R κυττάρων, από το 7BIO σε συνδυασμό με το Apomab (Σχήμα 14B). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώθηκαν και με ανάλυση κατά Western, όπου αξιολογήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης ρυθμιστικών πρωτεϊνών του αποπτωτικού μονοπατιού στα TXSA-R κύτταρα, μετά από επώασή τους με 6BIO (10 μM) ή 7BIO (10 μM) σε συνδυασμό με Apomab (100 ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0-48 ώρες) (Σχήμα 15). Ο συνδυασμός του 6BIO με το Apomab, προκαλεί χρονοεξαρτώμενη κατάτμηση και ενεργοποίηση της κασπάσης-3, όπως επίσης και της πρωτεΐνης PARP, που είναι ορατές ήδη από το χρονικό διάστημα των 6 ωρών. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αύξηση των υποδοχέων θανάτου DR4 και DR5. Αντιθέτως, στο συνδυασμό του 7BIO με το Apomab δεν παρουσιάστηκε κατάτμηση της κασπάσης-3, όμως παρατηρήθηκε μια μικρή ενεργοποίηση της PARP (από τις 12 ώρες) και αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα θανάτου DR5 (από τις 24 ώρες). Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι ο συνδυασμός κυρίως του 6BIO με το Apomab στα ανθεκτικά κύτταρα καρκίνου του μαστού TXSA-R, αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στο Apomab, η οποία οφείλεται στην επαγόμενη από τις ουσίες αύξηση των υποδοχέων θανάτου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού.

Η δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ μελετήθηκε και σε ένα τρίτο τύπο καρκίνου, σε κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS. Μετά την επώαση των KHOS με 6ΒΙΟ ή 7ΒΙΟ σε συγκέντρωση 15 μΜ, παρατηρήσαμε ότι και οι δυο ουσίες παρουσίασαν μικρή ικανότητα να επάγουν απόπτωση στις 24 ώρες (12 %), η οποία αυξήθηκε στις 48 ώρες (30 %) (Σχήμα 16Β). Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση της χρώσης DAPI, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης μετά την επώαση των KHOS για 24 ώρες με τις υπό μελέτη ουσίες (Σχήμα 17Α). Στη συνέχεια, μετά από

έκθεση των κυττάρων στις ουσίες 6BIO και 7BIO για διάφορα χρονικά διαστήματα (0-48 ώρες), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 μετά τη δράση του 6BIO στην συγκέντρωση των 15 μM, συγκριτικά με το μάρτυρα ($p \le 0,05$), ενώ το 7BIO παρουσίασε μικρότερη ενίσχυση της ενεργότητας της κασπάσης-3 μετά από 24 ώρες επώασης (Σχήμα 17B). Συνολικά, παρατηρήσαμε ότι η αύξηση στην ενεργότητα της κασπάσης-3 στα κύτταρα KHOS, ήταν πολύ χαμηλότερη σε σχέση με την αύξηση που παρατηρήσαμε στις άλλες κυτταρικές σειρές από καρκίνο του προστάτη και του μαστού.

Μετά την προσθήκη του γενικού αναστολέα Z-VAD (OMe)-FMK παρατηρούμε ότι η δράση του 6BIO καταστέλλεται μερικώς, αφού μετά από 48 ώρες επώαση με 15 μM 6BIO, η βιωσιμότητα των κυττάρων KHOS αυξήθηκε στο 72% (Σχήμα 17Γ). Το Z-VAD (OMe)-FMK είχε μια μικρή (34%), αλλά στατιστικώς σημαντική δράση στην αποτροπή του επαγόμενου από το 7BIO κυτταρικού θανάτου (Σχήμα 17Γ). Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι και οι δύο ουσίες 6BIO και 7BIO, παρουσιάζουν μικρή αποπτωτική δράση στα KHOS, η οποία εξαρτάται μερικώς από τις κασπάσες.

Σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα που λάβαμε μετά από ανάλυση κατά Western. Το 6BIO και το 7BIO σε συγκέντρωση 15 μM προκάλεσαν μερική κατάτμηση και συνεπώς ενεργοποίηση, της πρωτεΐνης PARP (Σχήμα 18 A, B). Επίσης το 6BIO, φάνηκε να επάγει μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση στην πρωτεΐνική έκφραση της κασπάσης-3 και της κασπάσης-8. Επιπλέον, και οι δυο ουσίες, αύξησαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21, το μεν 6BIO στις 36 και 48 ώρες, ενώ το 7BIO από τις 6 ώρες και μετά. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR), όπου παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση της p21 σε επίπεδο mRNA και μείωση των επιπέδων της κυκλίνης Ε, στοιχεία που υποδηλώνουν πιθανή κατασταλτική δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων KHOS (Σχήμα 18Γ).

Τα αποτελέσματά μας για την δράση των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα κύτταρα οστεοσαρκώματος KHOS, υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον το 6ΒΙΟ έχει χαμηλή αποπτωτική δράση ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Η δράση όμως και των δύο ουσιών βασίζεται κυρίως στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου, με στάση σημαντικού ποσοστού των κυττάρων στη φάση G₁/G₀ (46,6% στο χρόνο 0, 56,7% μετά από 24 ώρες), η οποία εξαρτάται από την αύξηση της πρωτεΐνης p21 και τη μείωση των επιπέδων της κυκλίνης Ε. Όπως είναι γνωστό η p21, δεσμεύει και αναστέλλει τη δράση των συμπλόκων CDK4-CyclinD1, CDK2-Cyclin E, CDK2-Cyclin A, καθώς και CDK2-Cyclin B, αποτελώντας έτσι σημαντικό αναστολέα των CDKs (Serrano, et al., 1993). Μεταλλάξεις του γονιδίου p21 δεν ανιχνεύονται συχνά, ενώ ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης της πρωτεΐνης, φαίνεται να γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής, κυρίως από το γονίδιο p53. Έχει ήδη αναφερθεί ότι σε περίπτωση βλάβης του DNA, η φυσιολογική p53 επάγει την έκφραση της p21, με συνέπεια την αναστολή της δράσης των CDKs, παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης της pRb και απελευθέρωσης του παράγοντα E2F, με τελικό αποτέλεσμα την παραμονή των κυττάρων στη φάση G₁ (el-Deiry, et al., 1993). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι λειτουργεί και ανεξάρτητος της p53 μηχανισμός επαγωγής της πρωτεΐνης p21 (Datto, Li, et al., 1995; Datto, Yu, et al., 1995), γεγονός το οποίο ισχύει και στα καρκινικά κύτταρα KHOS, όπου το γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο.

Τέλος, μελετήσαμε την *in vivo* αντικαρκινική δράση των ουσιών 6BIO και 7BIO σε καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231-TXSA. Στο Σχήμα 20Α, παρουσιάζονται εικόνες των ανοσοκατεσταλμένων ποντικών από κάθε ομάδα, όπου διακρίνεται το σήμα που εκπέμπουν τα επιμολυσμένα με το γονίδιο της λουσιφεράσης καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231-TXSA, μετά την χορήγηση λουσιφερίνης, που είναι το υπόστρωμα της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι μέχρι και τη 17η ημέρα διάρκειας του πρωτοκόλλου και λήψης των τελικών μετρήσεων, το 6BIO και το 7BIO μειώνουν την ανάπτυξη των όγκων του μαστού κατά 43,25% και 46,5%, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα ζώα της ομάδας του μάρτυρα (Σχήμα 20Γ). Η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική, τόσο για το 6BIO ($p \le$ 0,05), όσο και για το 7BIO ($p \le$ 0,05). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι το 7BIO, αλλά κυρίως το 6BIO μειώνουν και το ποσοστό μετάστασης των καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα των ζώων, κατά 18,27% ($p \le$ 0,05) και 37,25% ($p \le$ 0,05), αντίστοιχα (Σχήμα 20Δ).

Τα αποτελέσματα από το *in vivo* πειραματικό μας μοντέλο συμφωνούν με τα *in vitro* αποτελέσματά μας, όπου παρατηρούμε την αντικαρκινική δραστικότητα και των δύο ουσιών 6BIO και 7BIO στο σύστημα ενός ζωντανού οργανισμού. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αντιμεταστατική δράση που εμφανίζει το 6BIO, το οποίο *in vivo* μειώνει σημαντικά το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που μεταναστεύουν στον πνεύμονα των πειραματοζώων.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα μας για την δράση των ουσιών σε κάθε τύπο καρκίνου είναι:

 Οσο αφορά τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη ο συνδυασμός των 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ με τις αποπτωτικές ουσίες TRAIL και Apomab, κατέδειξε την συνεργιστική τους δράση στις κυτταρικές σειρές PC3 και DU145 και προσθετική στα LNCaP. Φαίνεται ότι ο συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων επάγει σημαντική αποπτωτική δράση, ενεργοποιώντας το εξωγενές εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το 6BIO, αλλά όχι το 7BIO, φαίνεται να παρουσιάζει αντιδιεισδυτικές ικανότητες, μειώνοντας σημαντικά την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων PC3 και DU145, όπως επίσης και την ενεργότητα της πρωτεάσης uPA, η οποία παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη διείσδυση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

- Στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, MDA-MB-231-TXSA το 6BIO επάγει καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₀/G₁ και απόπτωση, ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Το 7BIO δρα αρχικά καταστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G₂/M με κορύφωση τις 12 ώρες επώασης και στη συνέχεια, επάγει απόπτωση η οποία είναι ορατή στις 24 ώρες. Η αποπτωτική δράση του 7BIO, επάγεται μέσω ενεργοποίησης του εξαρτώμενου από τις κασπάσες αλλά και του ανεξάρτητου των κασπασών αποπτωτικό μονοπάτι.
- Στα ανθεκτικά στο Apomab καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231-TXSA-R, το 6BIO και 7BIO όταν συνδυαστούν με το Apomab, επάγουν μια δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αντι-πολλαπλασιαστική δράση. Ο συνδυασμός κυρίως του 6BIO, αλλά όχι τόσο του 7BIO με το Apomab, δρα αποπτωτικά στα κύτταρα αυτά ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι.
- Οι ουσίες μας 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ στα κύτταρα οστεοσαρκώματος ΚΗΟS παρουσιάζουν μικρή αποπτωτική δράση, ενεργοποιώντας το εξαρτώμενο από τις κασπάσες, αλλά και το ανεξάρτητο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι. Η κύρια αντικαρκινική τους δράση φαίνεται να ασκείται μέσω άρσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση Go/G1, η οποία εξαρτάται από την αύξηση της πρωτεΐνης p21 και τη μείωση των επιπέδων της κυκλίνης Ε.

Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν την αρχική μας Υπόθεση ότι ένα ή περισσότερα ανάλογα της ιντιρουπίνης παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση, η οποία οφείλεται είτε στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ή στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε αυτά ή στην αναστολή της διείσδυσης και μετάστασής τους ή λόγω συνδυασμού αυτών των φαινομένων. Συμπερασματικά, στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής, αποδείξαμε ότι οι 6ΒΙΟ και 7ΒΙΟ αποτελούν βελτιωμένα ανάλογα της ιντιρουπίνης με σημαντική *in vitro* και *in vivo* δραστικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων του μαστού, του προστάτη και του οστεοσαρκώματος και μπορούν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλους γνωστούς αντικαρκινικούς παράγοντες ως αντικαρκινικά φαρμακευτικά σκευάσματα με αντιμεταστατικό δυναμικό.

Βιβλιογραφία

- Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., et al. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*, 276(34), 31475-31478.
- Adams, C., Totpal, K., Lawrence, D., Marsters, S., Pitti, R., Yee, S., et al. (2008). Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5. *Cell Death Differ*, *15*(4), 751-761.
- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., & Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(18), 8493-8497.
- Aimes, R. T., & Quigley, J. P. (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.
- Allred, D. C., Clark, G. M., Elledge, R., Fuqua, S. A., Brown, R. W., Chamness, G. C., et al. (1993). Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85(3), 200-206.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., et al. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L., & Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*, 72(1), 1-22.
- Archambault, V., & Glover, D. M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(4), 265-275.
- Arellano, M., & Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. Int J Biochem Cell Biol, 29(4), 559-573.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 420-430.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
- Atkins, K. B., & Troen, B. R. (1995). Phorbol ester stimulated cathepsin L expression in U937 cells. *Cell Growth Differ*, 6(6), 713-718.
- Balfour-Paul, J. (1999). Indigo in South and South-East Asia. Text Hist, 30(1), 98-112.
- Bayir, H., & Kagan, V. E. (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*, 12(1), 206.
- Belyanskaya, L. L., Marti, T. M., Hopkins-Donaldson, S., Kurtz, S., Felley-Bosco, E., & Stahel, R. A. (2007). Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol Cancer*, 6, 66.
- Berger, A., Quast, S. A., Plotz, M., Hein, M., Kunz, M., Langer, P., et al. Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative---

Enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Biochem Pharmacol*, 81(1), 71-81.

- Berger, N. A., Sims, J. L., Catino, D. M., & Berger, S. J. (1983). Poly(ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells. *Princess Takamatsu Symp*, 13, 219-226.
- Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*, 64(5 Suppl), 474-484.
- Blasi, F., Vassalli, J. D., & Dano, K. (1987). Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol*, 104(4), 801-804.
- Bramwell, V. H. (2000). Osteosarcomas and other cancers of bone. *Curr Opin Oncol, 12*(4), 330-336.
- Buchkovich, K., Duffy, L. A., & Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58(6), 1097-1105.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., et al. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393), 1497-1501.
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., & Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol*, 48(6), 811-821.
- Butler, L. M., Liapis, V., Bouralexis, S., Welldon, K., Hay, S., Thai le, M., et al. (2006). The histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, overcomes resistance of human breast cancer cells to Apo2L/TRAIL. *Int J Cancer*, *119*(4), 944-954.
- Cai, J., & Jones, D. P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*, 273(19), 11401-11404.
- Camidge, D. R. (2008). Apomab: an agonist monoclonal antibody directed against Death Receptor 5/TRAIL-Receptor 2 for use in the treatment of solid tumors. *Expert Opin Biol Ther*, 8(8), 1167-1176.
- Carnero, A., & Hannon, G. J. (1998). The INK4 family of CDK inhibitors. Curr Top Microbiol Immunol, 227, 43-55.
- Carter, B. S., Bova, G. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B., Isaacs, W. B., et al. (1993). Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*, 150(3), 797-802.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296(5573), 1634-1635.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., et al. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*, 272(51), 32401-32410.
- Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1(1), 5-15.
- Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., et al. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(4), 1754-1759.
- Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70(2), 440-446.
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58(3), 621-681.

- [Clinical and experimental studies in the treatment of chronic granulocytic leukemia with indirubin (author's transl)]. (1979). *Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 18*(2), 83-88.
- Cohen, J. J. (1993). Apoptosis. Immunol Today, 14(3), 126-130.
- Croucher, P. I., & Apperley, J. F. (1998). Bone disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*, *103*(4), 902-910.
- Cuello, M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., & Lipkowitz, S. (2001). Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, *81*(3), 380-390.
- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., & Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5545-5549.
- Datto, M. B., Yu, Y., & Wang, X. F. (1995). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem*, 270(48), 28623-28628.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, 7(6), 813-820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., et al. (1997). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*, 186(7), 1165-1170.
- Demetriou, M. C., & Cress, A. E. (2004). Integrin clipping: a novel adhesion switch? J Cell Biochem, 91(1), 26-35.
- Devita, V. T., Jr. Breast cancer screening and mortality. Nat Rev Clin Oncol, 7(2), 65.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.
- Duffy, M. J. (1987). Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis? *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23(5), 583-589.
- Duffy, M. J. (1996). The biochemistry of metastasis. Adv Clin Chem, 32, 135-166.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev, 12*(15), 2245-2262.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., et al. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817-825.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
- Etzioni, R., Tsodikov, A., Mariotto, A., Szabo, A., Falcon, S., Wegelin, J., et al. (2008). Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes Control*, 19(2), 175-181.
- Evdokiou, A., Bouralexis, S., Atkins, G. J., Chai, F., Hay, S., Clayer, M., et al. (2002). Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer*, *99*(4), 491-504.
- Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, 276(2), 1071-1077.

- Ferandin, Y., Bettayeb, K., Kritsanida, M., Lozach, O., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., et al. (2006). 3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents. J Med Chem, 49(15), 4638-4649.
- Ferlay, J., Parkin, D. M., & Steliarova-Foucher, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer, 46(4), 765-781.
- Flatt, P. M., Tang, L. J., Scatena, C. D., Szak, S. T., & Pietenpol, J. A. (2000). p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol*, 20(12), 4210-4223.
- Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., et al. (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res*, 60(3), 636-643.
- Ganapathy, S., Chen, Q., Singh, K. P., Shankar, S., & Srivastava, R. K. Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor. *PLoS One*, *5*(12), e15627.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13(9), 1423-1433.
- Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., & Maller, J. L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus. *Cell*, 60(3), 487-494.
- Gerhart, J., Wu, M., & Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in Xenopus laevis oocytes and eggs. *J Cell Biol*, 98(4), 1247-1255.
- Gliniak, B., & Le, T. (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res*, 59(24), 6153-6158.
- Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., & Kubin, M. Z. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. J Immunol, 161(6), 2833-2840.
- Guengerich, F. P., Sorrells, J. L., Schmitt, S., Krauser, J. A., Aryal, P., & Meijer, L. (2004). Generation of new protein kinase inhibitors utilizing cytochrome p450 mutant enzymes for indigoid synthesis. *J Med Chem*, 47(12), 3236-3241.
- Hannon, G. J., & Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, *371*(6494), 257-261.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*, 6(4), 387-400.
- Helin, K., Harlow, E., & Fattaey, A. (1993). Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, *13*(10), 6501-6508.
- Hengst, L., & Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. Curr Top Microbiol Immunol, 227, 25-41.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J. A., Nobel, M. E., Lawrie, A., Tunnah, P., et al. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclindependent kinases. *Nat Cell Biol*, 1(1), 60-67.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53.
- Hong, S. J., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 25(5), 259-264.

- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., et al. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, 39(4), 633-640.
- Ichinose, A., Fujikawa, K., & Suyama, T. (1986). The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem*, 261(8), 3486-3489.
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 277-288.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., et al. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, *376*(6538), 313-320.
- Jin, H., Yang, R., Fong, S., Totpal, K., Lawrence, D., Zheng, Z., et al. (2004). Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. *Cancer Res*, 64(14), 4900-4905.
- Jin, H., Yang, R., Ross, J., Fong, S., Carano, R., Totpal, K., et al. (2008). Cooperation of the agonistic DR5 antibody apomab with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. *Clin Cancer Res*, 14(23), 7733-7740.
- Johnson, L. N., De Moliner, E., Brown, N. R., Song, H., Barford, D., Endicott, J. A., et al. (2002). Structural studies with inhibitors of the cell cycle regulatory kinase cyclindependent protein kinase 2. *Pharmacol Ther*, 93(2-3), 113-124.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554.
- Keane, M. M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., Russell, E. K., & Lipkowitz, S. (1999). Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res*, 59(3), 734-741.
- Kelley, S. K., & Ashkenazi, A. (2004). Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol*, 4(4), 333-339.
- Kelley, S. K., Harris, L. A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., et al. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(1), 31-38.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., & Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8), 2013-2026.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kim, S. A., Kim, Y. C., Kim, S. W., Lee, S. H., Min, J. J., Ahn, S. G., et al. (2007). Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model. *Clin Cancer Res*, 13(1), 253-259.
- King, R. W., Jackson, P. K., & Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell*, 79(4), 563-571.
- Knauper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G., & Murphy, G. (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*, 271(3), 1544-1550.
- Knauper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S. J., Stanton, H., et al. (1996).
 Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem*, 271(29), 17124-17131.

- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., et al. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278(5336), 294-298.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), 3-11.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., & Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*, *171*(9), 4672-4679.
- Kvale, R., Auvinen, A., Adami, H. O., Klint, A., Hernes, E., Moller, B., et al. (2007). Interpreting trends in prostate cancer incidence and mortality in the five Nordic countries. J Natl Cancer Inst, 99(24), 1881-1887.
- Kwaan, H. C. (1992). The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev, 11*(3-4), 291-311.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis-an introduction. Bioessays, 25(9), 888-896.
- LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., et al. (2002). Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med*, 8(3), 274-281.
- LeBlanc, H. N., & Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*, 10(1), 66-75.
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., et al. (2001). Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem*, 276(1), 251-260.
- Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene, 27(48), 6194-6206.
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, *412*(6842), 95-99.
- Liotta, L. A., & Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res, 51*(18 Suppl), 5054s-5059s.
- Liu, L., Nam, S., Tian, Y., Yang, F., Wu, J., Wang, Y., et al. (2011). 6-Bromoindirubin-3'oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells. *Cancer Res*, 71(11), 3972-3979.
- Liu, X., Yue, P., Khuri, F. R., & Sun, S. Y. (2004). p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res*, 64(15), 5078-5083.
- Lu, L., Gunja-Smith, Z., Woessner, J. F., Ursell, P. C., Nissen, T., Galardy, R. E., et al. (2000). Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(2), H601-609.
- Ma, Z., Webb, D. J., Jo, M., & Gonias, S. L. (2001). Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Sci, 114*(Pt 18), 3387-3396.
- MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett, 139*(2-3), 89-97.
- Markus, G. (1988). The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. A review of recent literature. *Enzyme*, 40(2-3), 158-172.
- Marx, J. (1993). How p53 suppresses cell growth. Science, 262(5140), 1644-1645.
- Masui, Y., & Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*, 177(2), 129-145.

Matrisian, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays, 14(7), 455-463.

- McCawley, L. J., & Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*, 13(5), 534-540.
- Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., et al. (2003). GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol*, 10(12), 1255-1266.
- Mignatti, P., & Rifkin, D. B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev*, 73(1), 161-195.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., et al. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. J Biol Chem, 276(19), 16391-16398.
- Mirza, A. N., Mirza, N. Q., Vlastos, G., & Singletary, S. E. (2002). Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*, 235(1), 10-26.
- Mittnacht, S., & Weinberg, R. A. (1991). G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell*, 65(3), 381-393.
- Moller, L. B. (1993). Structure and function of the urokinase receptor. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 4(2), 293-303.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7), 1237-1245.
- Mondino, A., Resnati, M., & Blasi, F. (1999). Structure and function of the urokinase receptor. *Thromb Haemost*, 82 Suppl 1, 19-22.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. Nature, 374(6518), 131-134.
- Mueller, B. M., Yu, Y. B., & Laug, W. E. (1995). Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(1), 205-209.
- Murphy, G., & Knauper, V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*, 15(8-9), 511-518.
- Murphy, G., & Willenbrock, F. (1995). Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol*, 248, 496-510.
- Nagle, R. B., Hao, J., Knox, J. D., Dalkin, B. L., Clark, V., & Cress, A. E. (1995). Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol*, 146(6), 1498-1507.
- Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J. Q., Muehlbeyer, S., et al. (2005). Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(17), 5998-6003.
- Nicolaou, K. A., Liapis, V., Evdokiou, A., Constantinou, C., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., et al. (2012). Induction of discrete apoptotic pathways by bromo-substituted indirubin derivatives in invasive breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun, 425*(1), 76-82.
- Nieuwenhuizen, W., & Traas, D. W. (1989). A rapid and simple method for the separation of four molecular forms of human plasminogen. *Thromb Haemost*, *61*(2), 208-210.
- Nimmanapalli, R., Perkins, C. L., Orlando, M., O'Bryan, E., Nguyen, D., & Bhalla, K. N. (2001). Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res*, 61(2), 759-763.

- Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 41, 367-401.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., & Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, 15(5), 2612-2624.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., & Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19(6), 607-614.
- Ossowski, L. (1988). In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol*, *107*(6 Pt 1), 2437-2445.
- Ossowski, L. (1992). Invasion of connective tissue by human carcinoma cell lines: requirement for urokinase, urokinase receptor, and interstitial collagenase. *Cancer Res*, 52(24), 6754-6760.
- Ossowski, L., & Reich, E. (1983). Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell*, *35*(3 Pt 2), 611-619.
- Overall, C. M., & Kleifeld, O. (2006). Tumour microenvironment opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 6(3), 227-239.
- Ozoren, N., & El-Deiry, W. S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*, 4(6), 551-557.
- Pan, Z. Q., Reardon, J. T., Li, L., Flores-Rozas, H., Legerski, R., Sancar, A., et al. (1995). Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. J Biol Chem, 270(37), 22008-22016.
- Patterson, M. L., Atkinson, S. J., Knauper, V., & Murphy, G. (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.
- Paulovich, A. G., & Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. cerevisiae in response to DNA damage. *Cell*, 82(5), 841-847.
- Perabo, F. G., Frossler, C., Landwehrs, G., Schmidt, D. H., von Rucker, A., Wirger, A., et al. (2006). Indirubin-3'-monoxime, a CDK inhibitor induces growth inhibition and apoptosis-independent up-regulation of survivin in transitional cell cancer. *Anticancer Res*, 26(3A), 2129-2135.
- Peter, M. E., & Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 10(5), 545-551.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. Adv Cancer Res, 66, 181-212.
- Pistritto, G., Puca, R., Nardinocchi, L., Sacchi, A., & D'Orazi, G. (2007). HIPK2-induced p53Ser46 phosphorylation activates the KILLER/DR5-mediated caspase-8 extrinsic apoptotic pathway. *Cell Death Differ*, *14*(10), 1837-1839.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., & Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 271(22), 12687-12690.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., et al. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1), 59-66.
- Rabinovitz, I., Nagle, R. B., & Cress, A. E. (1995). Integrin alpha 6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype in vitro and in vivo. *Clin Exp Metastasis*, 13(6), 481-491.

- Ribas, J., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Knockaert, M., Garrofe-Ochoa, X., Totzke, F., et al. (2006). 7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death. *Oncogene*, 25(47), 6304-6318.
- Ribas, J., Yuste, V. J., Garrofe-Ochoa, X., Meijer, L., Esquerda, J. E., & Boix, J. (2008). 7-Bromoindirubin-3'-oxime uncovers a serine protease-mediated paradigm of necrotic cell death. *Biochem Pharmacol*, 76(1), 39-52.
- Rosen, P. P., Lesser, M. L., Arroyo, C. D., Cranor, M., Borgen, P., & Norton, L. (1995). p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol*, 13(4), 821-830.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., et al. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106(9), 3214-3222.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2861-2874.
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, *391*(6662), 96-99.
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784-788.
- Schimmer, A. D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, 64(20), 7183-7190.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., et al. (1997). Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost*, 78(1), 285-296.
- Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., & Bell, J. I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol*, 7(9), 693-696.
- Seo, Y. J., Kim, B. S., Chun, S. Y., Park, Y. K., Kang, K. S., & Kwon, T. G. Apoptotic Effects of Genistein, Biochanin-A and Apigenin on LNCaP and PC-3 Cells by p21 through Transcriptional Inhibition of Polo-like Kinase-1. J Korean Med Sci, 26(11), 1489-1494.
- Serrano, M., Hannon, G. J., & Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, *366*(6456), 704-707.
- Seynaeve, C. M., Stetler-Stevenson, M., Sebers, S., Kaur, G., Sausville, E. A., & Worland, P. J. (1993). Cell cycle arrest and growth inhibition by the protein kinase antagonist UCN-01 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 53(9), 2081-2086.
- Shankar, S., Chen, X., & Srivastava, R. K. (2005). Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate*, 62(2), 165-186.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. Cell, 79(4), 551-555.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9(10), 1149-1163.
- Shipman, C. M., & Croucher, P. I. (2003). Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res*, 63(5), 912-916.

- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62(1), 10-29.
- Slee, E. A., & Lu, X. (2003). The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicol Lett*, 139(2-3), 81-87.
- Smits, V. A., & Medema, R. H. (2001). Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta*, *1519*(1-2), 1-12.
- Steiner, M. S., & Gingrich, J. R. (2000). Gene therapy for prostate cancer: where are we now? *J Urol*, 164(4), 1121-1136.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., & Srivastava, R. K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 20(17), 2122-2133.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., et al. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 192(4), 571-580.
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803-1815.
- Thai le, M., Labrinidis, A., Hay, S., Liapis, V., Bouralexis, S., Welldon, K., et al. (2006). Apo2l/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand prevents breast cancerinduced bone destruction in a mouse model. *Cancer Res*, 66(10), 5363-5370.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203), 1456-1462.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., et al. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, 9(1), 20-26.
- Van Valen, F., Fulda, S., Schafer, K. L., Truckenbrod, B., Hotfilder, M., Poremba, C., et al. (2003). Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumour cells vs. normal human cells. *Int J Cancer*, 107(6), 929-940.
- Vermeulen, K., Berneman, Z. N., & Van Bockstaele, D. R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, 36(3), 165-175.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif, 36*(3), 131-149.
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827-839.
- Vitovski, S., Phillips, J. S., Sayers, J., & Croucher, P. I. (2007). Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *J Biol Chem*, 282(43), 31601-31609.
- Vougogiannopoulou, K., Ferandin, Y., Bettayeb, K., Myrianthopoulos, V., Lozach, O., Fan, Y., et al. (2008). Soluble 3',6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase -3 alter circadian period. *J Med Chem*, 51(20), 6421-6431.
- Waga, S., Li, R., & Stillman, B. (1997). p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia*, 11 Suppl 3, 321-323.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5(2), 157-163.

- Wang, Y., Huang, W. C., Wang, C. Y., Tsai, C. C., Chen, C. L., Chang, Y. T., et al. (2009). Inhibiting glycogen synthase kinase-3 reduces endotoxaemic acute renal failure by down-regulating inflammation and renal cell apoptosis. *Br J Pharmacol*, 157(6), 1004-1013.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6), 673-682.
- Williams, S. P., Nowicki, M. O., Liu, F., Press, R., Godlewski, J., Abdel-Rasoul, M., et al. Indirubins decrease glioma invasion by blocking migratory phenotypes in both the tumor and stromal endothelial cell compartments. *Cancer Res*, 71(16), 5374-5380.
- Winters, Z. E., Ongkeko, W. M., Harris, A. L., & Norbury, C. J. (1998). p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene*, 17(6), 673-684.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Xiao, Z., Hao, Y., Liu, B., & Qian, L. (2002). Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma*, 43(9), 1763-1768.
- Xiao, Z., Wang, Y., Lu, L., Li, Z., Peng, Z., Han, Z., et al. (2006). Anti-angiogenesis effects of meisoindigo on chronic myelogenous leukemia in vitro. *Leuk Res*, 30(1), 54-59.
- Yamaguchi, H., Paranawithana, S. R., Lee, M. W., Huang, Z., Bhalla, K. N., & Wang, H. G. (2002). Epothilone B analogue (BMS-247550)-mediated cytotoxicity through induction of Bax conformational change in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 62(2), 466-471.
- Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M., & Nishimura, R. (2001). A boneseeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*, 16(8), 1486-1495.
- Yoshida, E., Ohmura, S., Sugiki, M., Maruyama, M., & Mihara, H. (1995). Prostate-specific antigen activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. Int J Cancer, 63(6), 863-865.
- Yu, S. W., Wang, H., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, 14(3), 303-317.
- Zahler, S., Tietze, S., Totzke, F., Kubbutat, M., Meijer, L., Vollmar, A. M., et al. (2007). Inverse in silico screening for identification of kinase inhibitor targets. *Chem Biol*, 14(11), 1207-1214.
- Zhang, B., Cao, X., Liu, Y., Cao, W., Zhang, F., Zhang, S., et al. (2008). Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*, *8*, 83.
- Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Gray, C. P., & Hersey, P. (2000). Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosisinducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol*, 164(8), 3961-3970.
- Zhang, X. D., Nguyen, T., Thomas, W. D., Sanders, J. E., & Hersey, P. (2000). Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett*, 482(3), 193-199.
- Zinonos, I., Labrinidis, A., Lee, M., Liapis, V., Hay, S., Ponomarev, V., et al. (2009). Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 8(10), 2969-2980.