ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
Ογκολογία
….απο την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΟΓΙΚΟΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
Δρ. Αλέξανδρος Πίντζας, Διευθυντής Ερευνών, ΙΧΒ/ΕΙΕ

ΣΥΝΤΙΧΑΚΗ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ
Α.Μ.: 1140047
ΑΘΗΝΑ, 2023

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERISTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES IN ONCOLOGY

Ογκολογία
ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΕΩΣ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

MASTER THESIS

RATIONAL COMBINATIONS OF ANTICANCER DRUGS

SUPERVISOR:
Dr. Alexander Pintzas, Research Director, ICB/NHRF

SYNTICHAKI ANNA-MARIA

1140047
ATHENS, 2023

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης που απονέμει το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε από τη κάτωθι τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ **ΒΑΘΜΙΔΑ**

Δρ. Αλέξανδρος Πίντζας ΔιευθυντήςΕρευνών, ΙΧΒ/ΕΙΕ

Δρ. Δήμητρα Μήτσιου Κύρια Ερευνήτρια, ΙΧΒ/ΕΙΕ

Δρ. Όλγα Παπαδόδημα Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας, ΙΧΒ/ΕΙΕ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγγραφή αυτής της διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί το τέλος μίας επιστημονικής εμπειρίας, δύσκολης και απαιτητικής, αλλά συνάμα ενδιαφέρουσας και συναρπαστικής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου, με βοήθησαν και με δίδαξαν. Πρωτίστως, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, κ. Αλέξανδρο Πίντζα, που άνοιξε τις πόρτες του εργαστηρίου του για μένα, με επίβλεψε, με δίδαξε και με στήριξε στην προσπάθεια μου να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες μέσω αυτού του μεταπτυχιακού. Ευχαριστώ θερμά, την κα Δήμητρα Μήτσιου για την πολύτιμη βοήθεια της όλους αυτούς τους μήνες, για την διάθεση της να με διδάξει, για τις γνώσεις, την εμπειρία και το μεράκι της. Χωρίς την συμβολή και την υποστήριξη της αυτή η διπλωματική εργασία δεν θα είχε στεφθεί με επιτυχία. Ευχαριστώ επίσης, την κα Όλγα Παπαδόδημα, που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή και να αφιερώσει τον χρόνο της στην αξιολόγηση της προσπάθειας μου. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την Βιβή Κοσμίδου για τις γνώσεις, την βοήθεια, την συνεργασία και την συντροφιά που μου προσέφερε στο διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης την Βένια Γάνου για την πολύτιμη βοήθεια της, τον χρόνο που αφιέρωσε για να με βοηθήσει στην αντιμέτωπιση των προβλημάτων που προέκυψαν κατά τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού και για την πίστη της στις ικανότητες μου. Δεν ξεχνώ την Παναγιώτα Στάμου για την βοήθεια που μου προσέφερε στον τομέα της εξειδίκευσης της, για την θετική ενέργεια και την διάθεση της για συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που με στήριξαν όλο αυτό το διάστημα και με βοήθησαν να επιμείνω έως το τέλος, και δεν με εγκατέλειψαν στις δύσκολες στιγμές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....10

1.1 Πρωτεΐνη BRAF.....10

1.1.1 Εξέλιξη του καρκίνου παχέος εντέρου και του μελανώματος.....10

1.1.2 BRAF μεταλλάξεις.....10

1.1.3 BRAF αναστολείς.....12

1.1.4 BRAF paradox.....13

1.1.5 BRAF paradox breakers.....15

1.2 Υποδοχείς Οιστρογόνων (ER).....16

1.2.1 ERα στο μαστό.....16

1.2.2 ERβ στο μαστό.....18

1.2.3 ERα και ERβ στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....20

1.2.4 Ταμοξιφαίνη.....21

1.3 ER-ERK crosstalk.....23

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....25

2.1 Κυτταροκαλλιέργεια.....25

2.1.1 Διαχωρισμός κυττάρων.....25

2.1.2 Πάγωμα κυττάρων.....26

2.1.3 Ξεπάγωμα κυττάρων.....26

2.1.4 Προσθήκη αναστολέων.....26

2.2 Αναστολείς..... 27

2.3 Κυτταρική βιωσιμότητα (Cell viability assay using SRB).....27

2.4 Οπτικό μικροσκόπιο.....28

2.5 Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....28

2.6 Ανοσοχημική ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western.....29

2.7 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)- Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....32

2.8 Ανάλυση δεδομένων 33

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 34

3.1 Οι επιδράσεις των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης ως μονές κατεργασίες στην βιωσιμότητα κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού.....34

3.2 Επίδραση των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στα επίπεδα του pERK……...42

3.3 Επίδραση του συνδυασμού BRAF αναστολέων και 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη βιωσιμότητα κυτταρικών σειρών καρκίνου παχέος εντέρου και μαστού.....45

3.4 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα HT-29 έπειτα από μονές και συνδυαστικές κατεργασίες.....49

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....52

4.1 Επίδραση των BRAF αναστολέων σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού.....52

4.2 Επίδραση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού.....54

4.3 Επίδραση του συνδυασμού των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού.....56

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καρκίνοι του παχέος εντέρου και του μαστού είναι δύο περιπτώσεις καρκίνων που εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό. Το 15% των καρκίνων του παχέος εντέρου φέρει την BRAFV600E μετάλλαξη, καθιστώντας την έτσι έναν ιδανικό θεραπευτικό στόχο. Δυστυχώς όμως, οι αναστολείς που στοχεύουν την BRAFV600E έχουν περιορισμένη δραστικότητα στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στρέφοντας έτσι τις προσπάθειες στην συνδυαστική στόχευση της ασθένειας. Παράλληλα, εδώ και πολλές δεκαετίες η ταμοξιφαίνη χρησιμοποιείται για την στόχευση του ERα(+) καρκίνου του μαστού ενώ ο ERα(-) αποτελεί ακόμη πρόκληση. Παρόλα αυτά, συχνά εμφανίζονται φαινόμενα αντίστασης στην θεραπεία ακόμη και στους ERα(+) καρκίνους που αρχικά ανταποκρίνονταν στην ταμοξιφαίνη. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ελέγθηκε η επίδραση των αναστολέων που στοχεύουν την BRAFV600E μετάλλαξη Encorafenib, Dabrafenib, PLX4720, PLX7904 και PLX8394 και του αντιοιστρογόνου 4-υδροξυταμοξιφαίνη στις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου HT-29, COLO-205 και RKO που φέρουν την BRAV600E μετάλλαξη και στην καρκινική σειρά μαστού MDA-MB-231 που φέρει την BRAFG464V. Όταν ελέγθηκαν μεμονωμένα, όλοι οι παράγοντες φάνηκαν να μειώνουν σημαντικά την βιωσιμότητα των σειρών του παχέος εντέρου, καθώς και τα επίπεδα της pERK, ενώ αποδείχτηκαν λιγότερο αποτελεσματικοί στα MDA-MB-231. Σε δεύτερη φάση, χρησιμοποιήθηκαν ορθολογικοί συνδυασμοί φαρμάκων για την εκάστοτε σειρά. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι συνδυασμοί απέφεραν αθροιστικό αποτέλεσμα σε σχέση με τις μονοθεραπείες, ενώ στην περίπτωση του συνδυασμού PLX7904 και 4-υδροξυταμοξιφαίνη παρατηρήθηκε ακόμη και συνεργιστική δράση των παραγόντων στα MDA-MB-231. Επιπλέον, ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα HT-29 κύτταρα έδειξε ότι οι αναστολείς μπορούν να επηρεάσουν τον κυτταρικό κύκλο καθώς και ότι ορισμένοι συνδυασμοί των BRAF αναστολέων με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη προκαλούν σημαντικές αλλαγές στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με τις μονοθεραπείες. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν για την ανάγκη περαιτέρω μελέτης των συνδυασμών BRAF αναστολέων και 4-υδροξυταμοξιφαίνης, ώστε να ταυτοποιηθούν πιθανές συνεργιστικές δράσεις.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: BRAFV600E αναστολείς, 4-υδροξυταμοξιφαίνη, αντίσταση, μονοθεραπεία, συνδυαστική θεραπεία

ABSTRACT

The colorectal and breast are two examples of cancer with a high prevalence in the population. 15% of colorectal cancer cases possess the BRAFV600E mutation, thus making it an ideal therapeutic target. Unfortunately, inhibitors targeting the BRAFV600E have a limited effect on colorectal cancer, thus the efforts are turning towards the combinatorial targeting of the disease. Meanwhile, for the past few decades, tamoxifen has been used for targeting ERα(+) breast cancer, while ERα(-) remains a challenge. Nevertheless, resistance occurs often even in the ERα(+) cancers that were originally responsive to tamoxifen. In the present study, the effects of the inhibitors that target the BRAFV600E mutation Encorafenib, Dabrafenib, PLX4720, PLX7904 and PLX8394 and the antiestrogen 4-hydroxytamoxifen were tested on the colorectal cancer cell lines HT-29, COLO-205 and RKO that possess the BRAFV600E mutation and on the breast cancer cell line MDA-MB-231 that possess the BRAFG464V. When tested individually, all of the inhibitors were found to effectively reduce the viability of the colorectal cell lines, alongside the reduction of the pERK levels, while being proven less effective at the MDA-MB-231 cells. Subsequently, rational combinations of the agents were used for each of the cell lines. In some cases, the combinations produced an additive effect compared to the monotreatments, while in the case of the combination of PLX7904 with 4-hydroxytamoxifen there was even a synergistic mode of action of the agents in the MDA-MB-231 cells. Furthermore, cell cycle analysis on the HT-29 cells showed that the inhibitors could affect the cell cycle when used in a monotreatment context while some of the combinatorial treatments could evoke significant changes in the cell cycle in relation to the monotreatments. The above data advocate for the need for further studying of the combinatorial treatments with the BRAF inhibitors and 4-hydroxytamoxifen, so that any potential synergistic actions may be identified.

KEY WORDS: BRAFV600E inhibitors, 4-hydroxytamoxifen, resistance, monotreatment, combinatorial treatment

ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ορθολογικών συνδυασμών αναστολέων BRAF με 4-υδροξυταμοξιφαίνη ως προς την αποτελεσματικότητα τους σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς Encorafenib, Dabrafenib, PLX4720, PLX7904 και PLX8394 που στοχέουν την BRAFV600E μετάλλαξη και η 4-υδροξυταμοξιφαίνη στις καρκινικές σειρές παχέος εντέρου HT-29, COLO-205 και RKO και στην σειρά του μαστού MDA-MB-231. Αρχικά οι αναστολείς αυτοί ελέγθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα τους ως μονοθεραπείες στην μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, στην αναστολή της ενεργότητας του MAPK μονοπατιού και την επίδραση τους στον κυτταρικό κύκλο. Έπειτα, με βάση τα αποτελέσματα αυτά, για κάθε κυτταρική σειρά επιλέχθηκαν οι συνδυασμοί που φάνηκαν οι πιο υποσχόμενοι για ένα συνδυαστικό πλάνο κατεργασίας. Οι συνδυασμοί αυτοί αξιολογήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα τους στην μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των προκλινικών μοντέλων και την επίδραση τους στον κυτταρικό κύκλο.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ BRAF

1.1.1 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ

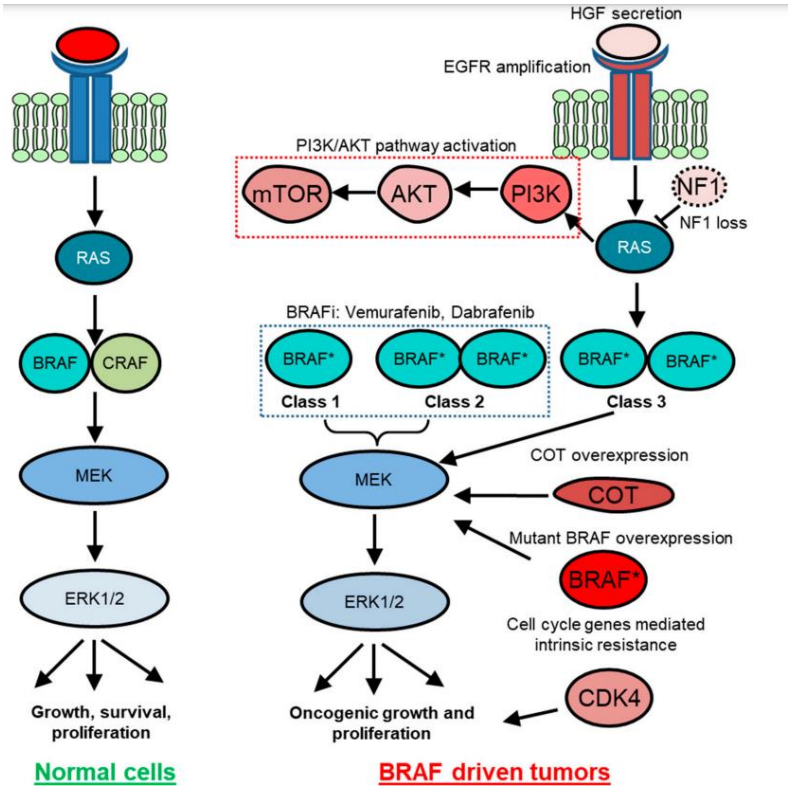
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί το ιδανικότερο παράδειγμα μελέτης της σταδιακής εξέλιξης της καρκινογενετικής διαδικασίας. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων αναπτύσσεται με ένα μοτίβο σταδιακής συσσώρευσης μεταλλάξεων σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο, όπου οι φυσιολογικοί ιστοί αρχικά διαφοροποιούνται σε αδενώματα και εν τέλει καταλήγουν σε καρκινώματα. Η σειρά με την οποία συσσωρεύονται οι μεταλλάξεις δεν είναι τυχαία, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι στα αρχικά στάδια μεταλλάσονται τα γονίδια APC και KRAS, ενώ άλλες αλλαγές όπως η απενεργοποίηση του TP53 γονιδίου συμβαίνει σε μεταγενέστερο στάδιο. Ωστόσο, ο καρκίνος του παχέος εντέρου εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και για αυτό το λόγο οι στοχεύουσες θεραπείες είναι αποτελεσματικές μόνο σε ένα κλάσμα των περιπτώσεων (Punt et al., 2017). Μία από τις μεταλλάξεις που εμφανίζονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι και η BRAF που θεωρείται μετάλλαξη-οδηγός αφού η απενεργοποίηση του μεταλλάγματος προκαλεί τοξικότητα στο καρκινικό κύτταρο (Zaman et al., 2019).

Όσον αφορά το μελάνωμα, το 30% των περιπτώσεων εμφανίζει μεταλλάξεις στο γονίδιο NRAS και το 50-70% στο BRAF, με την BRAFV600E να αποτελεί το 90% αυτών. Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια είναι αμοιβαίως αποκλειόμενα γεγονότα, δηλαδή δεν μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα. Πλέον, οι BRAF μεταλλάξεις θεωρούνται ότι συμβαίνουν στα αρχικά στάδια και είναι κρίσιμο αλλά όχι επαρκές γεγονός για την πρόκληση μετασχηματισμού (Kong et al., 2010).

1.1.2 BRAF ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Η φυσιολογική πρωτεΐνη BRAF ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών RAF, είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης και δρα ως διμερές. Είναι μία MAPKKK και είναι μέρος του MAPK μονοπατιού, ενός από τα πιο καλά μελετημένα μονοπάτια. Το μονοπάτι (βλ. Εικόνα 1) ενεργοποιείται όταν ένα εξωτερικό σήμα (πχ. αυξητικοί παράγοντες) προσδένεται σε έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης που ενεργοποιεί την RAS, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην σηματοδότηση του μονοπατιού με τον διμερισμό και την ενεργοποίηση της BRAF (MAPKKK). Σειρά έχει η φωσφορυλίωση της MEK (MAPKK) που ενεργοποιεί μία MAPK όπως είναι η

ERK1/2 και καταλήγει στην μεταγραφή διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (Zaman et al., 2019). Το συγκεκριμένο μονοπάτι έχει ευρύ φάσμα δράσεων με τις πιο σημαντικές να είναι η σηματοδότηση της κυτταρικής αύξησης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης (Ciombor et al., 2022). Λόγω της κρισιμότητας των δράσεων του μονοπατιού, αυτό υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση μέσω βρόχων αρνητικής ανάδρασης που ρυθμίζουν την διάρκεια και το μέγεθος της σηματοδότησης του. Η απορρύθμιση του μονοπατιού έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου και αυτό καθιστά την BRAF έναν ελκυστικό στόχο για τον έλεγχο καρκίνων με μεταλλάξεις στο MAPK μονοπάτι (Zaman et al., 2019).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του MAPK μονοπατιού και των τριών τάξεων των BRAF μεταλλάξεων (Zaman, et al., 2019)**.**

Μέχρι στιγμής έχουν καταγραφεί 200 διαφορετικά μεταλλαγμένα αλληλόμορφα της BRAF. Οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε τρεις διαφορετικές τάξεις με βάση την δραστικότητα τους (βλ. Εικόνα 1). Οι Τάξης I και II είναι και οι δυο ανεξάρτητες από την σηματοδότηση RAS, με τις Τάξης I να λειτουργούν ως μονομερή ενώ οι II ως διμερή. Τέλος, οι Τάξης III υπόκεινται ακόμη στην σηματοδοτική ρύθμιση της RAS, αλλά επιδεικνύουν αυξημένη ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού μέσω ισχυρότερης πρόσδεσης τους στις RAS και CRAF (Zaman et al., 2019). Η BRAFV600E ανήκει στην Τάξη I και η ενεργοποίηση της δεν ανταποκρίνεται στα σήματα αρνητικής ανάδρασης που ελέγχουν πρωτεΐνες που βρίσκονται σε προηγούμενο σημείο του μονοπατιού από εκείνη (Ciombor et al., 2022).

Η BRAF παρουσιάζεται μεταλλαγμένη στο 60% των μελανωμάτων, 60% των καρκίνων του θυρεοειδούς, 15% των καρκίνων του παχέος εντέρου και στο 5-8% του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Zaman et al., 2019). Στον μεταστατικό καρκίνου του παχέος εντέρου, το 12% των περιπτώσεων εμφανίζει BRAF μεταλλάξεις (Ciombor et al., 2022).

Στον καρκίνο του μαστού, οι μεταλλάξεις στο MAPK μονοπάτι, και πολύ περισσότερο στην BRAF, είναι σπάνιες, όπως αποδεικνύεται από μελέτες NGS. Πιο συγκεκριμένα, περίπου το 11% των ασθενών παρουσιάζουν κάποια μετάλλαξη στο σύνολο του μονοπατιού, με το 0.5% να είναι μετάλλαξη BRAF και 1.8% CNA μετάλλαξη σε αυτή, ενώ τα ποσοστά φαίνονται να διαφέρουν ανά υπότυπο, με τον basal-like να εμφανίζεται πιο συχνά μεταλλαγμένος. Παρόλα αυτά, μπορεί να συμβεί ενεργοποίηση του καταρράκτη ERK ακόμα και απουσία μεταλλάξεων στο μονοπάτι, λόγω μεταλλάξεων σε προηγούμενα σημεία του μονοπατιού, όπως στις RasGAPs, NF1 ή από υπερενεργοποίηση των υποδοχέων EGFR και HER2. Στις περιπτώσεις που σημειώνεται υπερενεργοποίηση των υποδοχέων, το μονοπάτι ανταποκρίνεται σε αρνητική ανάδραση, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις μεταλλάξεων στην BRAF. Το μονοπάτι φαίνεται να εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η ευαισθησία φαρμάκων και η αντίσταση στη θεραπεία. Μελέτες σε MDA-MB-231 κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επιρουβικίνη έδειξαν ότι το ERK μονοπάτι μπορεί να αποφέρει ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία. Παρόλα αυτά, η αναστολή του μονοπατιού μέχρι στιγμής δεν έχει φέρει υποσχόμενα αποτελέσματα στον μαστό (Rocca et al., 2022).

1.1.3 BRAF ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Ο πρώτος αναστολέας, ειδικός για συγκεκριμένη μετάλλαξη, που έλαβε την έγκριση του FDA είναι το Vemurafenib (PLX4032), για την αντιμετώπιση του μεταστατικού μελανώματος. Το 2013 έλαβε έγκριση και το Dabrafenib στο ίδιο θεραπευτικό πλαίσιο (Zaman et al., 2019). Τα μελανώματα με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι αρκετά ευαίσθητα στους BRAF αναστολείς, ακόμα και σε μονοθεραπευτικά σχήματα θεραπείας (Ciombor et al., 2022). Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, οι παράγοντες αυτοί δεν είναι αρκετά αποτελεσματικοί ως μονοθεραπείες ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εκδηλώθηκαν και φαινόμενα παράδοξης ενεργοποίησης του μονοπατιού (Zaman et al., 2019).

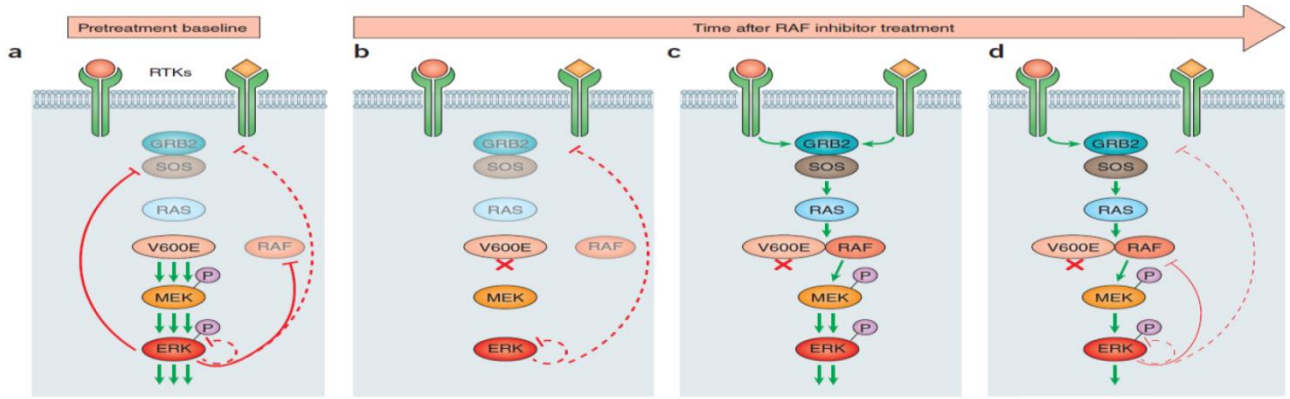
Μία ακόμη προσέγγιση που εξετάστηκε για την αναστολή του ERK μονοπατιού ήταν η χρήση MEK αναστολέων, όπως το Trametinib. Αυτοί δεν παρουσίασαν φαινόμενα παράδοξης

ενεργοποίησης, όμως δεν αποδείχθηκαν επαρκώς δραστικοί ως μονοθεραπείες. Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός τους με BRAF αναστολείς είχε πρωτοφανή θετικά αποτελέσματα, που οδήγησαν στην έγκριση των συνδυασμών Trametinib-Dabrafenib και Cobimetinib-Vemurafenib από τον FDA για το μεταστατικό BRAFV600E μελάνωμα και πλέον αποτελούν το πρότυπο θεραπείας (standard of care). Ο πρώτος συνδυασμός έχει εγκριθεί και για το BRAF μεταλλαγμένο NSCLC (Zaman et al., 2019). Τέλος, το 2020 ο FDA ενέκρινε τον συνδυασμό Encorafenib και Cetuximab (EGFRi) για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Ciombor et al., 2022).

Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, η θεραπεία στόχευσης της BRAF δεν αποτελεί το πρότυπο θεραπείας (Wang et al., 2022). Παρόλα αυτά έχει δημοσιευτεί μία μοναδική επιτυχημένη περίπτωση στόχευσης σε μία γυναίκα με μεταστατικό BRAFV600E τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού με Vemurafenib, όπου παρατηρήθηκε υποχώρηση και σταθεροποίηση της μεταστατικής εστίας με μέτριες παρενέργειες, έως και σήμερα (19 μήνες) (Pircher et al., 2021). Από την άλλη, μια δεύτερη μελέτη εξετάζει την θεραπεία δεύτερης γραμμής με Vemurafenib σε μία γυναίκα με BRAFV600E μεταστατικό τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, όπου επιτεύχθηκε PFS (Progression Free Survival) 4.4 μηνών. Το αποτέλεσμα δεν ήταν ομογενές αφού παρατηρήθηκε υποχώρηση σε ορισμένες μεταστατικές εστίες και πρόοδος σε άλλες, όμως οι συγγραφείς υποθέτουν ότι ο συνδυασμός του Vemurafenib με έναν MEK αναστολέα θα είχε καλύτερο αποτέλεσμα (Wang et al., 2022).

1.1.4 BRAF PARADOX

Δυστυχώς σε πολλές περιπτώσεις, οδηγούμαστε σε φαινόμενα αντίστασης στην στοχεύουσα θεραπεία (Zaman et al., 2019). Φυσιολογικά, η φωσφορυλίωση της ERK ενεργοποιεί έναν βρόχο αρνητικής ανάδρασης που καταστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού σε προηγούμενα σημεία, καταστέλλοντας την Ras. Όμως στα μεταλλαγμένα BRAF κύτταρα, η ERK δεν ανταποκρίνεται στην αρνητική ρύθμιση, επειδή η BRAF δρα αυτόνομα, χωρίς να εξαρτάται από ενεργοποίηση από την Ras. Όταν έπειτα από αναστολή της BRAF τα επίπεδα της ERK επανέλθουν, η αρνητική σηματοδότηση παύει να υφίσταται, οδηγώντας έτσι σε ενεργοποίηση της Ras, γεγονός που επανενεργοποιεί το μονοπάτι, μέσω της CRAF τώρα, και τα επίπεδα της ERK ανακάμπτουν, οδηγώντας έτσι σε μία ισορροπία. Αυτή η ανάκαμψη της ERK είναι πλέον Ras- και CRAF-εξαρτώμενη. Στο μελάνωμα φαίνεται ότι ο συνδυασμός BRAF και MEK αναστολέων ενισχύει την αντικαρκινική δραστικότητα. Όμως, στον καρκίνο του παχέος εντέρου η ανάκαμψη των επιπέδων της ERK βρέθηκε να είναι σε υψηλά επίπεδα, σε αντίθεση



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του BRAF paradox

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat Med. 2013 Nov;19(11):1401-9.

με την περίπτωση του μελανώματος, και έχει συσχετιστεί με την αντίσταση στην θεραπεία, εξηγώντας έτσι τον λόγο που οι αναστολείς είναι πιο αποτελεσματικοί στο μελάνωμα απ' ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Lito, et al., 2012). Πιο αναλυτικά, η μελέτη των Corcoran et al. έδειξε ότι το Vemurafenib οδήγησε σε παρατεταμένη καταστολή των επιπέδων της pERK σε σειρές μελανώματος, ενώ στα κύτταρα του παχέος εντέρου η αρχική καταστολή των επιπέδων αποκαταστάθηκε έπειτα από 24 ώρες και ακολουθήθηκε από φωσφορυλίωση της CRAF. Ακόμη, η διαφορά στην αποτελεσματικότητα των αναστολέων στους δύο καρκίνους ίσως εξηγείται από το ότι τα επίπεδα της ενεργής RAS ήταν πολύ υψηλότερα στα κύτταρα του παχέος εντέρου ύστερα από κατεργασία με Vemurafenib σε σχέση με αυτά του μελανώματος. Επιπλέον, στο μελάνωμα οι RTKs εμφανίζονται χαμηλά φωσφορυλιωμένοι και πριν και μετά από το Vemurafenib, ενώ στα κύτταρα παχέος εντέρου τα επίπεδα φωσφορυλίωσης ήταν υψηλά εξαρχής και το Vemurafenib δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή. Όμως ο EGFR είναι αυτός που μεσολαβεί την αύξηση της φωσφορυλίωσης της RAS στο παχύ έντερο ύστερα από το Vemurafenib, παρόλο που δεν παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ίδιου του υποδοχέα έπειτα από την κατεργασία, δείχνοντας έτσι ότι απλά βελτιώνεται η ενεργότητα του. Αναστολή του EGFR απέτρεψε την φωσφορυλίωση των RAS, CRAF και ERK έπειτα από Vemurafenib, αποδεικνύοντας έτσι ότι οι βρόχοι αρνητικής ρύθμισης είναι EGFR-εξαρτώμενοι. Η αναστολή του EGFR ταυτόχρονα με το BRAF οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα (Corcoran, et al., 2012). Το BRAF paradox φαίνεται καλύτερα στην εικόνα 2.

Μία οδός που ερευνήθηκε ήταν οι συνδυαστικές θεραπείες όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, καθώς σε πολλές περιπτώσεις φάνηκε ότι η αντίσταση σχετιζόταν με την επανενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού (Zaman, et al., 2019). Μία εναλλακτική οδός που μελετάται είναι ο σχεδιασμός αναστολέων που στοχεύουν τα RAF διμερή, αφού οι

υπάρχουσες θεραπείες (Dabrafenib, Encorafenib, Vemurafenib) δεν αναστέλλουν τον διμερισμό των RAF. Μία από τις κατηγορίες των θεραπειών που αναπτύσσονται με αυτό τον σκοπό είναι και οι λεγόμενοι 'paradox breakers', που εμποδίζουν τον σχηματισμό των ομο- και ετεροδιμερών RAF, και θα αναλυθούν παρακάτω (Ciombor, et al., 2022).

1.1.5 BRAF PARADOX BREAKERS

Οι paradox breakers είναι αναστολείς επόμενης γενιάς και περιλαμβάνουν το PLX7904 και PLX8394, με το δεύτερο να βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές (Koumaki, et al., 2021). Και τα δύο είναι μόνο ελαφρώς διαφορετικά σε χημική δομή από το Vemurafenib (Zhang, et al., 2015).

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου PLX7904-BRAV600E έδειξε ότι ο παράγοντας προσδένεται με τρόπο παρόμοιο με αυτό του Vemurafenib, με την διαφορά ότι εμφανίζει πιο στενή επαφή με την Leu505, ένα κρίσιμο αμινοξύ στην περιοχή ρύθμισης της κινάσης κοντά στην aC έλικα (Zhang, et al., 2015). Έτσι, φαίνεται να προκαλεί μία δομική μετατόπιση στην αλυσίδα που πιθανόν να είναι κρίσιμη για τον σχηματισμό διμερών (Koumaki, et al., 2021). Ακόμη, έδειξε ότι μπορεί να αναστείλει την φωσφορυλίωση της ERK σε BRAFV600E κύτταρα ή σε κύτταρα με μεταλλάξεις του RAS. Τέλος, τεχνικές ανάλυσης γονιδιακής ρύθμισης/έκφρασης έδειξαν ότι το PLX7904 επηρεάζει ελάχιστα την γονιδιακή έκφραση σε αντίθεση με το Vemurafenib που επηρεάζει την μεταγραφή 191 γονιδίων στα ποντίκια, μεταξύ των οποίων ορισμένα κωδικοποιούν προσδέτες του EGFR και εμπλέκονται στην αυτοκρινή σηματοδότηση (Zhang, et al., 2015). Όσον αφορά το PLX8394, στοχεύει BRAF ομοδιμερή και BRAF/CRAF ετεροδιμερή, αλλά όχι CRAF ομοδιμερή. Ένα επιπλέον προσόν που διαχωρίζει το PLX8394 από τους υπόλοιπους BRAF αναστολείς, είναι ότι δεν επηρεάζει καθόλου το μονοπάτι σε wtRAS/RAF κύτταρα, άρα δεν προκαλεί τοξικότητα στους φυσιολογικούς ιστούς που εκφράζουν όλες τις ισομορφές (Koumaki, et al., 2021).

Η μελέτη των Koumaki et al. έδειξε ότι οι δύο paradox breakers εμφανίζουν παρόμοια ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με το PLX4720, που είναι ανάλογο του εγκεκριμένου από τον FDA Vemurafenib, στην ευαίσθητη σειρά COLO-205, αλλά σημαντικά μεγαλύτερη μείωση στις σχετικά ανθεκτικές σειρές RKO και HT-29, ενώ παράλληλα επιτυγχάνουν τα ίδια ποσοστά μείωσης σε σχέση με το PLX4720 σε υποδεκαπλάσια συγκέντρωση (Koumaki, et al., 2021).

1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ER)

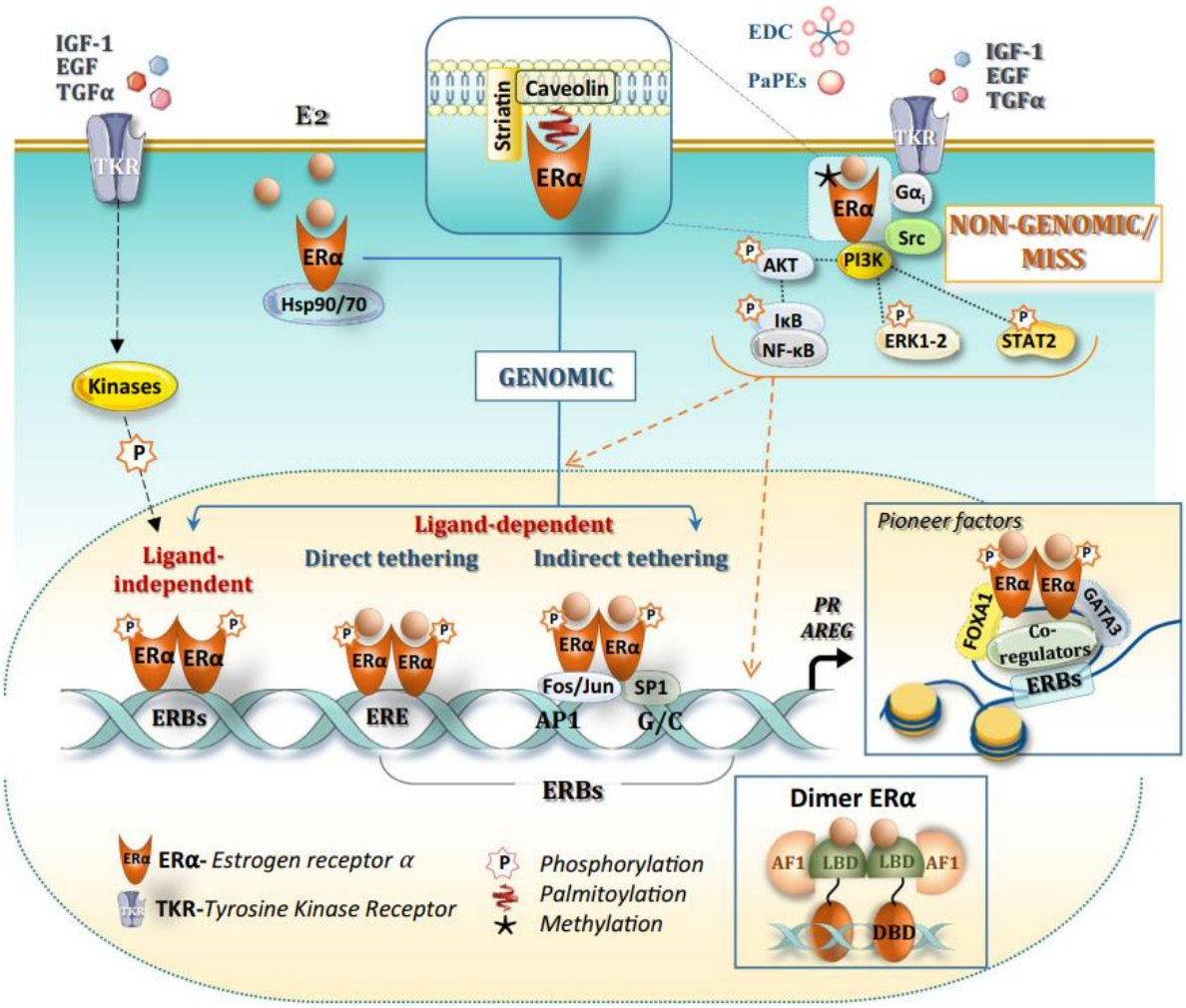
1.2.1 ERα ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ

Ο ERα είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας που ελέγχει την μεταγραφή ενός μεγάλου εύρους γονιδίων και έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη του μαστού (Rusidzé, et al., 2021). Ο ERα ανταποκρίνεται στην παρουσία οιστρογόνων, κυρίως της 17β-οιστραδιόλης (E2), που παράγεται κατά κύριο λόγο στις ωοθήκες και έχει εμπλακεί στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Η σύνδεση της στον ERα προκαλεί ERα-εξαρτώμενη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, πολλαπλασιασμό και ογκογένεση, ενώ η σύνδεση της στον ERβ έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως παύση του κυτταρικού κύκλου και τροποποίηση της έκφρασης ERα-εξαρτώμενων γονιδίων, όπως θα αναλυθεί σε επόμενο υποκεφάλαιο (Mahbub, 2022). Το μονοπάτι του ERα μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω δύο διαφορετικών οδών, της γενωμικής και της μη-γενωμικής οδού (Rusidzé, et al., 2021).

Όσον αφορά το γενωμικό μονοπάτι, το οιστρογόνο δένεται στον ERα, προκαλεί τον διμερισμό του, την είσοδο του συμπλόκου στον πυρήνα και την αλληλεπίδραση του με συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς. Εκεί προσδένεται στο DNA είτε άμεσα στα στοιχεία ανταπόκρισης των οιστρογόνων (ERE), είτε έμμεσα μέσω της πρόσδεσης τους σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και προκαλεί την έκφραση γονιδίων που ελέγχει. Ακόμη, το μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί και απουσία προσδέτη, μέσω RTKs ενεργοποιημένων από αυξητικούς παράγοντες. Από την άλλη πλευρά, ένα μικρό ποσοστό του ERα (περίπου 3%) βρίσκεται σε λιπιδικές σχεδίες στην κυτταρική μεμβράνη και προκαλεί το μη-γενωμικό μονοπάτι, το οποίο δρα τάχιστα. Στην προκειμένη περίπτωση, το οιστρογόνο συνδέεται στον ERα, ο οποίος τώρα ενεργοποιεί G πρωτεΐνες που με την σειρά τους ενεργοποιούν καταρράκτες κινασών όπως είναι αυτοί των PI3K και AKT (Rusidzé, et al., 2021). Μία από τις δράσεις αυτής της οδού είναι ο έλεγχος καναλιών ιόντων, οδηγώντας στην αλλαγή του pH ή των εσωτερικών επιπέδων ασβεστίου (Maingi, et al., 2020). Οι δράσεις του ERα φαίνονται στην εικόνα 3.

Το 70-80% των καρκίνων του μαστού είναι ERα(+) και εξαρτώνται από τα οιστρογόνα για την ανάπτυξη τους (Rusidzé, et al., 2021). Σε αυτές τις περιπτώσεις ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων του μαστού, ο ERα αποτελεί θεραπευτικό στόχο μέσω της χορήγησης συμπληρωματικής ενδοκρινικής θεραπείας όπως είναι οι επιλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (SERM), οι επιλεκτικοί αποικοδομητές υποδοχέων οιστρογόνων (SERD) και οι

αναστολείς αρωματάσης (Meligova, et al., 2023). Μάλιστα, η έκφραση του υποδοχέα αποτελεί δείκτη πρόβλεψης της ανταπόκρισης του όγκου σε ενδοκρινικές θεραπείες (Rusidzé, et al., 2021).



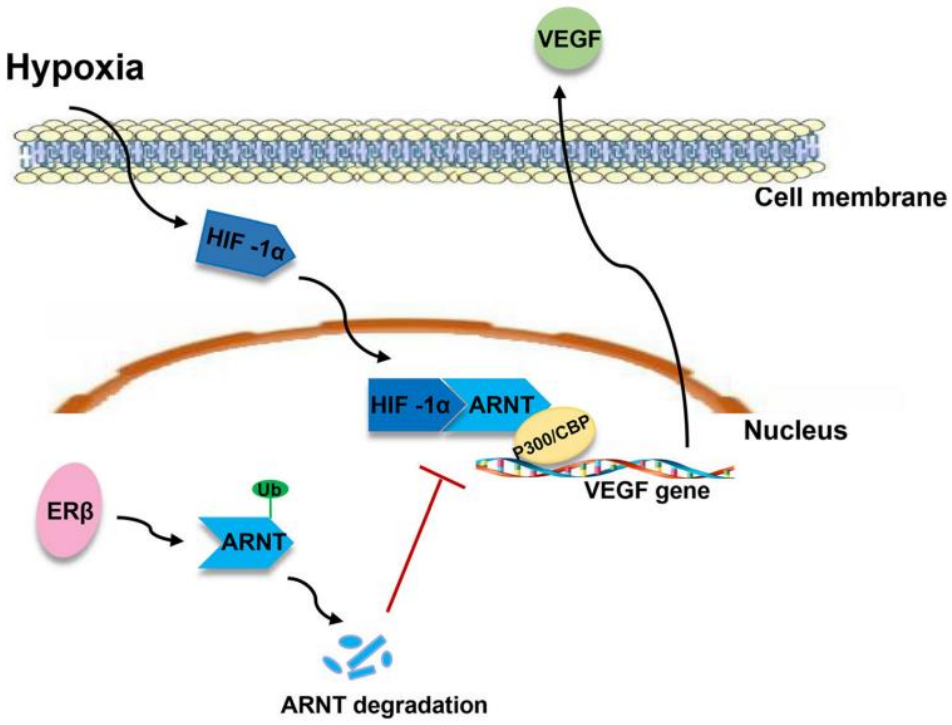
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των δράσεων του ERα. (Rusidzé, et al., 2021)

1.2.2 ERβ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ

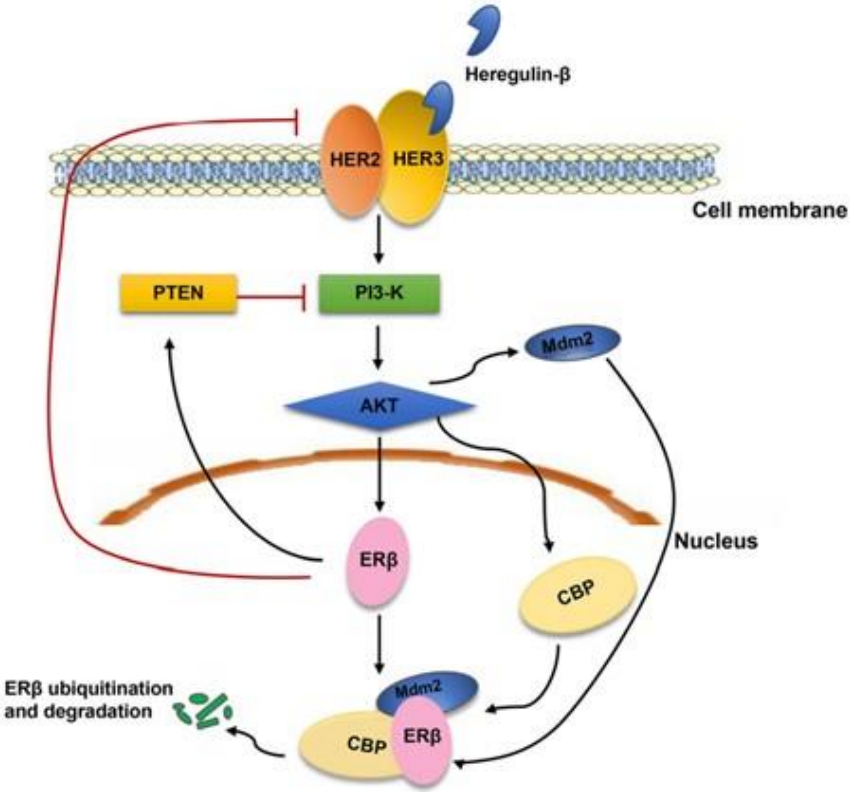
Ο ERβ είναι ο δεύτερος ισότυπος του υποδοχέα οιστρογόνων και παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον ERα. Το 60% των καρκίνων του μαστού φαίνονται να είναι θετικοί για τον εν λόγω υποδοχέα. Έχει πέντε διαφορετικές ισομορφές (ERβ1-5) και είναι πιθανό καθεμία από αυτές να έχει διαφορετική σημασία για τα χαρακτηριστικά του όγκου και την πρόγνωση (Zhou, et al., 2020).

Από τις πέντε ισομορφές, μόνο ο ERβ1 και ο ERβ2 εκφράζονται συχνά στον καρκίνο του μαστού. Ο ERβ1 είναι το προϊόν της πλήρους μεταγραφής του γονιδίου και έχει συσχετιστεί με βελτιωμένη απόκριση στην ταμοξιφαίνη σε ERα+ καρκίνους του μαστού και με μικρότερο ρίσκο πρώιμης υποτροπής των ERα+ καρκίνων αρχικού σταδίου που θεραπεύονται με συμπληρωματική ενδοκρινική θεραπεία. Εν αντιθέσει, ο ERβ2 έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση στους ERα(-) καρκίνους του μαστού και με μεγαλύτερο ρίσκο καθυστερημένης υποτροπής στους ERα+ αρχικών σταδίων που λαμβάνουν ενδοκρινική θεραπεία. Ακόμη, η έρευνα των Meligova et al. αποκάλυψε ότι ο ERβ1 ευαισθητοποιεί και ο ERβ2 απευαισθητοποιεί τα MCF-7 (ERα+) κύτταρα στην θεραπεία με 4-υδροξυταμοξιφαίνη (ενεργός μεταβολίτης της ταμοξιφαίνης) και προτείνει ότι αυτοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν προβλεπτικούς δείκτες ανταπόκρισης και αντίστασης, αντίστοιχα, στην θεραπεία με αντιοιστρογόνα σε ERα+ καρκίνους μαστού αρχικών σταδίων (Meligova, et al., 2023).

Η μελέτη των μηχανισμών δράσης του υποδοχέα δείχνει ότι ο ERβ δρα ως ογκοκατασταλτικό, και κυρίως σε ότι αφορά τους μεταστατικούς φαινότυπους. Μία από τις δράσεις του είναι η εμπλοκή του στην αγγειογένεση, προκαλώντας μείωση των επιπέδων του VEGF και άρα μείωση των διαογκικών (intertumoral) αγγείων, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 4α. Αναλυτικότερα, σε συνθήκες υποξίας ο παράγοντας ARNT σχηματίζει σύμπλοκο με τον HIF-1α και προκαλεί την μεταγραφή του VEGF. Ο ERβ έχει αποδειχτεί ότι προκαλεί την ουβικιτινιλίωση του ARNT, παρεμποδίζοντας έτσι την μεταγραφή του VEGF. Όσον αφορά την καταστολή του υποδοχέα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4β, η ενεργοποίηση του PI3K/AKT μονοπατιού προκαλεί την MDM2 E3 λιγάση ουβικιτίνης να συνδεθεί στον ERβ, προκαλώντας έτσι την αποικοδόμηση και καταστολή του ERβ στον καρκίνο του μαστού. Όμως, η έκφραση του ERβ προκαλεί μείωση της Akt σηματοδότησης μέσω της αύξησης των επιπέδων της PTEN που ελέγχει την PI3K και μείωση της HER2/HER3 σηματοδότησης (Zhou, et al., 2020).



Εικόνα 4α: Ο ρόλος του ERβ στην αγγειογένεση. (Zhou, et al., 2020)



Εικόνα 4β: Η αλληλεπίδραση του ERβ με την PI3K. (Zhou, et al., 2020)

1.2.3 ERα ΚΑΙ ERβ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Πολλές μελέτες υποδηλώνουν ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ορμονοεξαρτώμενος. Πιο αναλυτικά, επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου είναι μειωμένη σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με τους άντρες και ότι η πρώιμη καταστολή των θηλυκών στεροϊδών ορμονών αυξάνει το ρίσκο (Mahbub, 2022). Ακόμη, η χρήση HRT (hormone replacement therapy) από μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου κατά 66% (Niv, 2015) και βελτιωμένα ποσοστά θνησιμότητας στην περίπτωση ανάπτυξης αυτού (Mahbub, 2022). Τα παραπάνω προτείνουν ότι τα οιστρογόνα και ίσως η προγεστερόνη διαδραματίζουν έναν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον εν λόγο καρκίνο (Mahbub, 2022). Αυτό εξηγεί και την διαφορά του κινδύνου εμφάνισης στα δύο φύλα, με το αντρικό φύλο να αποτελεί παράγοντα κινδύνου (Ditonno, et al., 2021). Βέβαια η διαφορά μεταξύ των δύο φύλων εξαφανίζεται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (Niv, 2015).

Παλαιότερες μελέτες προτείνουν ότι οι φυσιολογικοί και καρκινικοί ιστοί του παχέος εντέρου έχουν χαμηλή έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων, χωρίς να διαχωρίζουν τους ισότυπους. Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι ο ERβ φαίνεται να εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με τον ERα, ο οποίος όμως υπάρχει σε κάποιο ποσοστό (Mahbub, 2022). Ο ERα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον καρκίνο του παχέος εντέρου και φάνηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, μεταξύ άλλων συμβάλλοντας και στην κυτταρική μετάσταση (Mahbub, 2022) (Ditonno, et al., 2021). Ενδεικτικά, η σύνδεση της E2 στον ERα ενεργοποιεί αντι-αποπτωτικά μονοπάτια μέσω της σηματοδότησης ERK/MAPK και PI3K/AKT (Ditonno, et al., 2021).

Παράλληλα, ο ERβ έχει 80% χαμηλότερη έκφραση σε καρκινικούς ιστούς παχέος εντέρου σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς (Niv, 2015). Στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο, ο ERβ βοηθάει στην διατήρηση της αρχιτεκτονικής του επιθηλίου, στην ρύθμιση της φυσιολογίας και της ανοσοαπόκρισης (Maingi, et al., 2020), ενώ η έκφραση του σε θηλυκούς ασθενείς συνδέεται με μεγαλύτερο OS (overall survival) και με χαμηλότερα ποσοστά υποτροπής (Mahbub, 2022). Η σύνδεση της E2 στον ERβ οδηγεί, μέσω της μη-γενωμικής οδού, στην ταχεία φωσφορυλίωση της p38/MAPK, την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και την διάσπαση της PARP, οδηγώντας έτσι σε απόπτωση (Ditonno, et al., 2021) (Maingi, et al., 2020). Ακόμη, τα

οιστρογόνα φαίνονται να έχουν αντιοξειδωτική δράση μέσω του ERβ, προστατεύοντας τους ιστούς από οξειδωτικό στρες (Maingi, et al., 2020). Πιο αναλυτικά, ο ERβ συνδέεται στα ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων-ρυθμιστών του NFκB και παρεμποδίζει την έκφραση των θετικών ρυθμιστών του, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την έκφραση των αρνητικών ρυθμιστών του οδηγώντας έτσι στην μείωση της φλεγμονώδους σηματοδότησης και της έκκρισης TNFα από μακροφάγα (Hases, et al., 2020). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση ERβ παρουσίαζαν χαμηλότερη πυρηνική έκφραση β-κατενίνης και μεγαλύτερη κυτταροπλασματική σε σχέση με ασθενείς με χαμηλή έκφραση ERβ. Παράλληλα, ποντίκια με μεταλλαγμένο APC γονίδιο (εκδηλώνουν υπερενεργοποίηση σηματοδότησης β-κατενίνης) έχουν μειωμένη έκφραση ERβ, αλλά επίδραση με αγωνιστή του ERβ μείωνε τα επίπεδα β-κατενίνης, ενώ παράλληλα επηρέαζε την επιβίωση και τη μετάσταση και αύξανε την κασπάση-3 (Topi, et al., 2020).

Τα παραπάνω υποδηλώνουν μία αντικαρκινική ιδιότητα του ERβ, εν αντιθέσει με τον ERα που φαίνεται να προωθεί την ογκογενετική διαδικασία (Mahbub, 2022). Κατά την καρκινογένεση, αλλάζει η αναλογία των δύο υποδοχέων, με τον ERα να υπερεκφράζεται και τον ERβ να υποεκφράζεται (Ditonno, et al., 2021).

1.2.4 ΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗ

Η ταμοξιφαίνη είναι ένας επιλεκτικός τροποποιητής του υποδοχέα οιστρογόνου (SERM) (Zhou et al., 2020) και είναι το πρώτο αντιοιστρογόνο που εφαρμόστηκε κλινικά στον καρκίνο του μαστού (Lee, et al., 2008). Έχει καταγραφεί ότι η ταμοξιφαίνη λειτουργεί τόσο ως αγωνιστής όσο και ως ανταγωνιστής του ERα, ενώ στην περίπτωση του ERβ λειτουργεί ως ανταγωνιστής. Η διαφορική δράση της εξαρτάται από τον ιστό (Lee, et al., 2008). Η ταμοξιφαίνη χορηγείται για 5-10 χρόνια (Moo, et al., 2018) ως συμπληρωματική θεραπεία με στόχο να αποτρέψει την μελλοντική επανεμφάνιση του καρκίνου (Zhou, et al., 2020). Η χορήγηση για 5 χρόνια μειώνει τον κίνδυνο επανεμφάνισης κατά 50% στα πρώτα 4 χρόνια, και συνεχίζει με μείωση κατά 30% έως το ένατο έτος. Επίσης, μειώνει τη θνησιμότητα λόγω καρκίνου του μαστού στα πρώτα 15 χρόνια κατά 30%. Η δεκαετής έναντι της πενταετούς χορήγησης οδηγεί σε επιπλέον 25% μείωση του κινδύνου υποτροπής και 30% της θνησιμότητας μετά το δέκατο έτος (Moo, et al., 2018). Δυστυχώς όμως, η παράταση της θεραπείας πέραν της πενταετίας συνοδεύεται με το ρίσκο μακροπρόθεσμων παρενεργειών και τοξικότητας (Tao, et al., 2015). Η θεραπεία με ταμοξιφαίνη χρησιμοποιείται και σε προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες,

όμως στις μετεμμηνοπαυσιακές προτιμώνται οι αναστολείς αρωματάσης έναντι της ταμοξιφαίνης (Moo, et al., 2018). Δυστυχώς η χρήση της συνοδεύεται από ορισμένους κινδύνους, καθώς αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του ενδομητρίου, εγκεφαλικό, εμβολή και θρόμβωση (Lee, et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, στο ενδομήτριο η ταμοξιφαίνη δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα (Ali, et al., 2016). Παρόλα αυτά, το όφελος υπερτερεί κατά πολύ σε σχέση με τον κίνδυνο για παρενέργειες. Αρχικά, ο FDA είχε εγκρίνει την ταμοξιφαίνη για συμπληρωματική θεραπεία έπειτα από χειρουργείο ή ακτινοθεραπεία σε περιπτώσεις αρχικών σταδίων καρκίνου του μαστού έπειτα από δεδομένα που έδειχναν 30-50% μείωση στην εμφάνιση καρκίνου στον δεύτερο μαστό. Πλέον η ταμοξιφαίνη έχει εγκριθεί από τον FDA και για χορήγηση σε γυναίκες που δεν πάσχουν αλλά έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού έπειτα από δεδομένα που απέδειξαν 49% μείωση στην εμφάνιση του ύστερα από 5 χρόνια προληπτικής θεραπείας με ταμοξιφαίνη (Lee, et al., 2008). Η ουσία έχει ρόλο και στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Πιο αναλυτικά, η ενδοκρινική θεραπεία είναι η πρώτη επιλογή σε γυναίκες με ER+ μεταστατικό καρκίνο του μαστού, με την ταμοξιφαίνη να αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να συνδυαστεί με ορισμένες στοχεύουσες θεραπείες όπως οι CDK4/6 αναστολείς (Manohar, et al., 2021).

Η ταμοξιφαίνη ανταγωνίζεται και εκτοπίζει το οιστρογόνο, προσδένεται στον ER και παρεμποδίζει την μεταγραφική του ικανότητα. Ακόμη, η πρόσδεση της προκαλεί διαφορετική διαμόρφωση στον υποδοχέα σε σχέση με αυτή που λαμβάνει όταν είναι σε σύμπλοκο με το οιστρόγονο. Αυτό έχει ως συνέπεια να μην προσδένονται οι συνενεργοποιητές που θα συνδέονταν κανονικά, και την θέση τους παίρνουν συνκαταστολείς όπως είναι οι NcoR και SMRT (Ali, et al., 2016).

Παρόλη την επιτυχία της, δυστυχώς το 20-30% των όγκων εμφανίζουν αντοχή στην ταμοξιφαίνη, είτε εξ αρχής είτε κατά την διάρκεια της θεραπείας. Πολλά μονοπάτια έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα, όπως η υπερενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (πχ. HER2, EGFR), αλλαγές στα PI3K-PTEN/AKT/mTOR, MAPK και NFkB μονοπάτια ή τροποποίηση της ER σηματοδότησης. Έπειτα από παρατεταμένη έκθεση σε ταμοξιφαίνη, τα παραπάνω μονοπάτια προκαλούν απορρύθμιση της αναλογίας προ- και αντι-αποπτωτικών σημάτων με τα αντιαποπτωτικά να υπερτερούν (Ali, et al., 2016). Ακόμη, η αντίσταση στην ταμοξιφαίνη φαίνεται να έχει συνδεθεί και με τον GPER (G-Protein Coupled

Estrogen Receptor), που είναι παρών στους ERα(+) και στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού, αφού η έκφραση του έχει δειχτεί ότι αυξάνεται έπειτα από θεραπεία με ταμοξιφαίνη (Hsu, et al., 2019).

1.3 ER-ERK CROSSTALK

Οι υποδοχείς οιστρογόνων εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό με την σηματοδότητση ERK (Rocca, et al., 2022) είτε μέσω της γενωμικής είτε της μη-γενωμικής οδού. Ο GPER (G-Protein Coupled Estrogen Receptor) είναι ένας εναλλακτικός υποδοχέας με δομή διαφορετική από αυτήν του ERα και ERβ, βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και δρα κυρίως μέσω του μη γενωμικού μονοπατιού. Ενεργοποιείται από την E2 ή και την ταμοξιφαίνη και οδηγεί στην ενεργοποίηση των $G_{\beta\gamma}$ υπομονάδων μίας G-πρωτεΐνης που με την σειρά τους ενεργοποιούν την κινάση SRC. Στη συνέχεια, η SRC συνδέεται στην ιντεγκρίνη ανβ1, και το σύμπλοκο ενεργοποιεί την μεταλλοπρωτεάση MMP που απελευθερώνει τον παράγοντα HB-EGF στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση αυτή οδηγεί στην φωσφορυλίωση του EGFR. Αυτό έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού και συνεπώς την προώθηση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Από την άλλη πλευρά, μέσω ενός διαφορετικού μονοπατιού, η E2 ή και η ταμοξιφαίνη μπορεί να ενεργοποιήσει τον GPER και την G_{α} υπομονάδα μίας G-πρωτεΐνης και να καταλήξει στην καταστολή της ERK ενεργότητας με έναν PKA-εξαρτώμενο τρόπο. Οπότε, ο GPER μπορεί να ισορροπήσει τα επίπεδα της ERK μέσω δύο αντικρουόμενων μηχανισμών (Hsu, et al., 2019).

Παράλληλα, το γενωμικό μονοπάτι του ERα προκαλεί επαγωγή της μεταγραφής αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι όταν δρουν σε υπερενεργούς RTK όπως ο EGFR και ο HER2, επιφέρουν δράσεις όπως η αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των PI3K και ERK μονοπατιών οδηγεί στην φωσφορυλίωση του ERα και προωθεί περαιτέρω το γενωμικό του μονοπάτι, επιφέροντας έτσι ενεργότητα του ERα ανεξάρτητη από οιστρογόνα και αντίσταση σε ενδοκρινικές θεραπείες (Rocca, et al., 2022).

Εμβαθύνοντας επ’αυτού, μία έρευνα έδειξε ότι το μονοπάτι PKC-ERK παίζει σημαντικό ρόλο στην μεσολαβούμενη από ταμοξιφαίνη απόπτωση, καθώς και στην αντίσταση σε αυτή σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Πιο αναλυτικά, φάνηκε ότι η φωσφορυλίωση της PKCδ ισομορφής

ανταγωνιζόταν την ενεργοποίηση της ERK σε MCF-7 κύτταρα (ER+), οδηγώντας τα έτσι σε απόπτωση, ενώ η PKCα ισομορφή ενεργοποιούσε downstream την ERK, μεσολαβώντας στην αντίσταση στην ταμοξιφαίνη στα MCF-7/ADR κύτταρα (ER-, ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη). Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι η PKCα είναι δείκτης αντι-οιστρογονικής αντίστασης. Οπότε, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η ERK έχει μία αντίστροφη σχέση με την απόπτωση, και ίσως να προωθεί την αντίσταση στην ταμοξιφαίνη. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα για την PKCδ είναι αντιφατικά, καθώς μία έρευνα έδειξε ότι αυτή προωθεί την μετάσταση μέσω της ενεργοποίησης του Ras/ERK1/2 μονοπατιού (Li, et al., 2012), οπότε απαιτείται περισσότερη έρευνα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Gibco, Invitrogen

RPMI-1640 1x + GlutaMAX: Gibco, Invitrogen

Sodium Pyruvate: Gibco, Invitrogen

HEPES: Gibco, Invitrogen

FBS (Fetal Bovine Serum): Gibco, Invitrogen

Penicillin/Streptomycin: Gibco, Invitrogen

Non-essential amino acids: Gibco, Invitrogen

Trypsin solution: Gibco, Invitrogen

PBS 10x (Phosphate Buffer Saline): Gibco, Invitrogen

DMSO (Dimethyl Sulfoxide): Sigma

Οι σειρές αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (RKO, HT-29, COLO-205) προμηθεύθηκαν από την ATCC (American Type Culture Collection). Καλλιεργήθηκαν σε DMEM, στο οποίο είχε προστεθεί 10% FBS, 1% πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη και 1% μη-αναγκαία αμινοξέα. Η καρκινική σειρά του μαστού (MDA-MB-231) καλλιεργήθηκε σε RPMI, συμπληρωμένο με 10% FBS, 1% Sodium Pyruvate 100mM, 1% HEPES 1M και 1% πενικιλλίνη/ στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε κλίβανο στους 37°C με 5% CO_2. Όλοι οι χειρισμοί που αφορούσαν κύτταρα έγιναν σε στείρες συνθήκες, μέσα σε εστία κυτταροκαλλιέργειας με αποστειρωμένα υλικά, για την αποφυγή επιμολύνσεων.

2.1.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η πληρότητα των φλασκών ελέγχονταν στο μικροσκόπιο και όταν ήταν σχεδόν γεμάτη (δύο φορές την εβδομάδα), τα κύτταρα ήταν έτοιμα για διαχωρισμό. Πριν την εκκίνηση της διαδικασίας, τα DMEM, RPMI, PBS και η θρυψίνη θερμαίνονταν σε υδατόλουτρο. Το θρεπτικό αφαιρούνταν από τις φλάσκες και τα κύτταρα υπόκειντο σε πλύση με PBS 1x που έπειτα απορριπτόταν. Στη συνέχεια, προστίθεντο μικρός όγκος θρυψίνης 1x και οι φλάσκες

μεταφέρονταν στον κλίβανο, στους 37°C για πέντε λεπτά. Όταν τα κύτταρα είχαν πλέον αποκολληθεί, η θρυψίνη απενεργοποιούνταν με τριπλάσιο όγκο θρεπτικού και το μίγμα μεταφεροταν σε σωλήνες φυγοκέντρησης (universal) για φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορριπτόταν και το ίζημα επαναδιαλυόταν σε καθαρό θρεπτικό. Μικρός όγκος των κυττάρων μεταφεροταν σε καινούριες φλάσκες και σε τρυβλία για πειράματα.

2.1.2 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Freezing medium: Υλικό στο οποίο έχει προστεθεί 10% DMSO. Το DMSO δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας κατά το πάγωμα των κυττάρων. Συγκεκριμένα αλλάζει τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και εμποδίζει τον σχηματισμό πολλών κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα των κυττάρων.

Για να καταψυχθούν κύτταρα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με παραπάνω, με την διαφορά ότι στο τέλος το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε διάλυμα για την κατάψυξη κυττάρων και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικά φιαλίδια (cryovials). Αυτά μεταφέρθηκαν σε ένα ειδικό δοχείο (NALGENE) με ισοπροπανόλη και αφέθηκαν στους -80°C για 24 ώρες. Τέλος, μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη αποθήκευση.

2.1.3 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο για να ξεπαγώσουν. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης (universal) με μικρό όγκο θρεπτικού και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο που προέκυψε απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε καθαρό θρεπτικό και μεταφέρθηκε σε καινούρια φλάσκα στον κλίβανο. Έπειτα από 24 ώρες το θρεπτικό ανανεώθηκε.

2.1.4 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

Trypan blue: Gibco

Μετά την θρυψινοποίηση των κυττάρων, έγινε καλή ανάδευση τους και μικρός όγκος τους μεταφέρθηκε σε φιαλίδια με ίσο όγκο χρωστικής Trypan Blue. Έπειτα από μία ακόμη καλή

ανάδευση μικρός όγκος μεταφέρθηκε σε μία πλάκα Neubauer και τα κύτταρα καταμετρήθηκαν στο μικροσκόπιο και υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων ανά ml. Στη συνέχεια, κατάλληλος αριθμός κυττάρων, ανάλογα με την κυτταρική σειρά και το πείραμα, στρώθηκε είτε σε 6-well είτε σε 96-well plate. Μετά το πέρας 24 ωρών, τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί και το θρεπτικό αντικαταστάθηκε με νέο θρεπτικό που περιείχε τους κατάλληλους αναστολείς. Οι BRAF αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1μM, αφού προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έκριναν εκείνη ως την βέλτιστη συγκέντρωση, ενώ η 4-υδροξυταμοξιφαίνη ελέγθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις.

2.2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Encorafenib (LGX818) – αναστολέας BRAFV600E (MedChemExpress)

Dabrafenib (GSK2118436A) – αναστολέας BRAFV600E (MedChemExpress)

PLX4720 – αναστολέας BRAFV600E (MedChemExpress)

PLX7904 – αναστολέας BRAFV600E (MedChemExpress)

PLX8394 – αναστολέας BRAFV600E (MedChemExpress)

4-υδροξυταμοφαίνη (OHT) – αντιοιστρογόνο, ενεργός μεταβολίτης της ταμοξιφαίνης (Sigma)

2.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ (Cell Viability assay using SRB)

Trichloroacetic acid (TCA): PanReac Applichem

SRB: Sigma

Trizma Base: Sigma

Χρόνος/Κυτ. Σειρά	**RKO**	**HT-29**	**COLO-205**	**MDA-MB-231**
72H	3000	4000	6000	8000

Η βιωσιμότητα των κυττάρων έπειτα από προσθήκη διαφόρων ουσιών ελέγθηκε μέσω της κυτταρικής βιωσιμότητας με SRB στις 72 ώρες, και είναι ενδεικτική του αθροίσματος της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο.

Αρχικά, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και καταμετρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Υπολογίστηκε ο όγκος με τον κατάλληλο αριθμό κυττάρων ανάλογα με την κυτταρική σειρά, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, και στρώθηκε σε 96-well plate, το οποίο παρέμεινε στον κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες για να προσκολληθούν τα κύτταρα. Στην συνέχεια, αφαιρέθηκε το θρεπτικό και έγινε προσθήκη χημειοθεραπευτικών παραγόντων στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Κάθε κατεργασία έγινε εις τριπλούν, ενώ παράλληλα υπήρχε ένα δείγμα μάρτυρας στο οποίο δεν προστέθηκε καμία ουσία και ένα ακόμα δείγμα εις τριπλούν με DMSO μόνο, καθώς όλοι οι παράγοντες ήταν διαλυμένοι σε DMSO. Μετά το πέρας 72 ωρών, το πιάτο μεταφέρθηκε στον πάγο για να αφαιρεθεί το θρεπτικό, έπειτα βυθίστηκε σε 10% παγωμένο TCA και επανήλθε στον πάγο όπου παρέμεινε για 30 λεπτά. Μετέπειτα, το TCA αφαιρέθηκε και το πιάτο υπέστη 3 πλύσεις με νερό και μεταφέρθηκε στον κλίβανο στους 37°C για 20 λεπτά ώστε να στεγνώσει. Αργότερα, 100μl SRB (0,4w/v% σε 1% οξικό οξύ) προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι και ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Έπειτα, η χρωστική απορρίφθηκε και το πιάτο ξεπλύθηκε 3-4 φορές σε 1% οξικό οξύ και μεταφέρθηκε στον κλίβανο για να στεγνώσει για 20 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 100μl Tris-Base 10mM και αναδιάλυση για 10 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540nm σε ειδική συσκευή (TECAN). Το ποσοστό της κυτταρικής αύξησης υπολογίστηκε με την διαίρεση της απορρόφησης του κάθε δείγματος με την μέση απορρόφηση των δειγμάτων μαρτύρων, πολλαπλασιασμένη επί 100.

2.4 ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Κύτταρα στρώθηκαν σε 6-well πιάτα και αφέθηκαν για 24 ώρες ώστε να προσκολληθούν. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη αναστολέων και έπειτα από 72 ώρες ελήφθησαν φωτογραφίες στο οπτικό μικροσκόπιο (Nikon).

2.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

BSA (Bovine Serum Albumin): Sigma

Αντιδραστήριο Bradford: Bio-Rad

RIPA buffer: 50mM Tris HCl pH 8,150mM NaCl, 0.5% w/v sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, dH_2O

Lysis Buffer: RIPA buffer, Leupeptin, NaOV, PMSF, AP (αναστολείς πρωτεασών)

Χρόνος/Κυτ. Σειρά	**RKO**	**HT-29**	**COLO-205**	**MDA-MB-231**
24H	500.000	500.000	600.000	480.000

Τα κύτταρα καταμετρήθηκαν στο μικροσκόπιο και ο κατάλληλος αριθμός για κάθε σειρά (όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα) στρώθηκε σε 6-well plates. Το πιάτο αφέθηκε στους 37°C για 24 ώρες ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα. Την επόμενη μέρα έγινε η προσθήκη των αναστολέων και τα κύτταρα επωάστηκαν για άλλες 24 ώρες.

Μετά το πέρας του δεύτερου εικοσιτετραώρου, το πιάτο μεταφέρθηκε σε πάγο, όπου αφαιρέθηκε το θρεπτικό και το κάθε πηγάδι ξεπλύθηκε με 1x PBS. Έπειτα, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (lysis buffer), σύμφωνα με την πυκνότητα του κάθε πηγαδιού, που προσδιορίστηκε εμπειρικά στο μικροσκόπιο. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με την βοήθεια ξέστρου και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια στον πάγο. Ακολούθησαν δύο επαναλήψεις στιγμιαίας ανάδευσης στο vortex και δεκάλεπτης αναμονής στον πάγο. Τέλος, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 12.000rpm στους 4°C και το υπερκείμενο, όπου βρίσκονταν πλέον οι πρωτεΐνες, μεταφέρθηκε σε καθαρό φιαλίδιο και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων υπολογίστηκε μέσω της τεχνικής Bradford. Πιο συγκεκριμένα 2μl από κάθε εκχύλισμα εις τριπλούν μεταφέρθηκαν σε 96-well πιάτο, μαζί με ποσότητες εις διπλούν διαφόρων συγκεντρώσεων BSA (από stock 1mg/ml). Σε όλα τα πηγάδια προστέθηκαν 250μl 1x Bradford (από stock 5x) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595nm με την βοήθεια του TECAN. Οι απορροφήσεις των διαφόρων συγκεντρώσεων της BSA αξιοποιήθηκαν για τον σχηματισμό μίας πρότυπης καμπύλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων.

2.6 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN

Υλικά:

Bis-acrylamide: Sigma

SDS: Fisher

TEMED: Invitrogen

APS: Bio-Rad

Tween-20:Sigma

Luminol: Sigma

Coumaric Acid: Sigma

Developer: AGFA

Fixer: AGFA

<u>Διαλύματα:</u>

1.5M Tris pH 8.8: 8.3g Tris-base, 1g Tris-acid, dH_2O έως τα 50mL, και ρύθμιση του pH με μέτρηση pH

1M Tris pH 6.8: 0.57g Tris-base, 7.13g Tris-acid, dH_2O έως τα 50ml, και ρύθμιση του pH με μέτρηση pH

Loading Buffer: 3x SDS buffer, DTT σε αναλογία 9:1

Running Buffer 10x: 30.2g Tris-base, 144g Glycine, 10g SDS, dH_2O έως το 1L

Running Buffer 1x: 100mL Running Buffer 10x, 900mL H_2O

Transfer Buffer 10x: 30.2g Tris-base, 144g Glycine, dH_2O έως το 1L

Transfer Buffer 1x: 70mL Transfer Buffer 10x, 70mL Methanol, dH_2O έως τα 700mL

TBS 10x pH 7.6: 24.2g Tris-base, 80g NaCl, dH_2O έως το 1L, και ρύθμιση του pH

TBST 1x pH 7.6: 100mL TBS 10x, 900mL dH_2O, 1ml Tween-20

Tris 1M pH 8.5: 2.21g Tris Acid, 4.36g Tris Base, 50ml H_2O

SOL I: 4ml Tris pH 8.5 1M, 400μl Luminol, 176 μl Coumaric Acid, dH_2O έως τα 40ml

SOL II: 4ml Tris pH 8.5 1M, dH_2O έως τα 40ml

ECL: 3ml SOL I, 3ml SOL II, 3μl H_2O_2

Αντισώματα:

p-ERK (sc-7383): Santa Cruz Biotechnology (πρωτογενές)

GAPDH (97166): Cell Signaling Technology (πρωτογενές)

anti-mouse IgG HRP-linked (7076): Cell Signaling Technology (δευτερογενές)

Stacking Gel		**Resolving Gel**	
	5%		**12%**
dH_2O	3.4ml	**dH_2O**	3.3ml
30% bis-acrylamide	830μl	**30% bis-acrylamide**	4ml
1M Tris pH 6.8	630μl	**1.5M Tris pH 8.8**	2.5ml
10% SDS	50μl	**10% SDS**	100μl
10% APS	50μl	**10% APS**	100μl
TEMED	5μl	**TEMED**	4μl

Η μελέτη των επιπέδων των πρωτεϊνών έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE). Η πυκνότητα του κατώτερου τμήματος του πηκτώματος (resolving gel) εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών και για τους σκοπούς αυτής της διπλωματικής επιλέχθηκε να είναι 12%. Η σύσταση των δύο τμημάτων του πηκτώματος (stacking και resolving gel) συνοψίζονται στον παραπάνω πίνακα.

Το πήκτωμα παρασκευάστηκε με την προσθήκη του κατώτερου τμήματος (resolving gel) πρώτα, και έπειτα του ανώτερου τμήματος (stacking gel) μετά την πήξη του πρώτου. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν ώστε να περιέχουν 30μg πρωτεΐνης, 5x loading buffer και νερό. Μαζί με τον ειδικό δείκτη marker (BioLabs), αναδεύτηκαν, θερμάνθηκαν στους 95°C για 8 λεπτά, ψύχθηκαν στιγμιαία και αναδεύτηκαν ξανά. Οι αποδιαταγμένες πλέον πρωτεΐνες φορτώθηκαν στο πήκτωμα. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 40-50mA στην συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad) για 1-2 ώρες με 1x Running Buffer μέχρι να διαχωριστούν διακριτά οι ζώνες του marker. Έπειτα, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (BioRad) (Transfer). Η συσκευή έτρεξε, με την βοήθεια Transfer Buffer 1x, στα 330mA για 90 λεπτά, τοποθετημένη στον πάγο. Αργότερα, για να παρεμποδιστούν οι μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις των αντισωμάτων,

οι μεμβράνες υπέστησαν blocking, δηλαδή επωάστηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 5% σκόνης γάλακτος σε TBST. Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτες πλύσεις υπό ανάδευση με TBST και έπειτα η μεμβράνη επωάστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα της pERK (διαλυμένο σε 5% γάλα σε TBST) σε συγκέντρωση 1:100 overnight στους 4°C. Την επόμενη μέρα, έπειτα από 3 δεκάλεπτες πλύσεις υπό ανάδευση με TBST, σειρά είχε η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (1:1000 σε 5% γάλα σε TBST) για 2 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από πλύσεις, η μεμβράνη τοποθετείται στο διάλυμα ECL για 1-3 λεπτά και μεταφέρεται σε κασέτα ραδιογραφίας μαζί με X-ray φιλμ (Fuji) για την αποτύπωση του σήματος. Το δευτερογενές anti-mouse αντίσωμα φέρει το HRP ένζυμο που καταλύει μία αντίδραση χημειοφωταύγειας, εντοπίζοντας έτσι τις πρωτεΐνες με προσδεδεμένο αντίσωμα στο σημείο αποχρωματισμού του φιλμ. Σε αυτήν την φάση έγιναν πολλές δοκιμές με διαφορετικούς χρόνους παραμονής στην κασέτα για την λήψη του βέλτιστου σήματος. Η εμφάνιση του σήματος στο φιλμ πραγματοποιείται με το διαδοχικό βύθισμα του σε διαλύματα Developer, νερού και Fixer. Σειρά έχει η επώαση της μεμβράνης σε πρωτογενές anti-GAPDH αντίσωμα σε συγκέντρωση 1:1000 σε 5% γάλα σε TBST overnight στους 4°C και μετά σε δευτερογενές anti-mouse αντίσωμα (1:1000 σε 5% γάλα σε TBST) και αποτύπωση της ξανά σε φιλμ. Το σήμα του GAPDH αξιοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του σήματος της pERK κάθε δείγματος.

2.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY) - FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

Το διάλυμα Propidium Iodine (P.I.) (~50ng/mL) παρασκευάστηκε ως εξής:

- 20μL P.I. (από αρχική συγκέντρωση 1mg/ml)
- 380μL αποστειρωμένο dH2O
- 4μL Tris-HCL 1M pH 7.5
- 2μL $MgCl_2$
- 4μL RNAase με τελική συγκέντρωση 10μg/mL (από Qiagen με αρχικό όγκο 100mg/ml)

Ο έλεγχος της επίδρασης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στον κυτταρικό κύκλο έγινε μέσω της χρώσης του DNA με Propidium Iodine για την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Η λογική πίσω από την συγκεκριμένη τεχνική είναι η εξής. Το P.I. προσδένεται στοιχειομετρικά στο DNA μονιμοποιημένων κυττάρων και έτσι επιτρέπει την κατηγοριοποίηση τους στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου ανάλογα με τον φθορισμό που είναι ανάλογος με την ποσότητα του DNA σε κάθε κύτταρο.

Αρχικά, κατάλληλος αριθμός κυττάρων στρώθηκε σε 12-well πιάτα και τα κύτταρα επωάστηκαν στον κλίβανο για 24 ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το θρεπτικό αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από θρεπτικό στο οποίο είχε προστεθεί ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας που έχει επιλεχθεί για το κάθε πηγάδι. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης (72 ώρες), το θρεπτικό από κάθε πηγάδι μεταφέρθηκε σε φιαλίδια universal. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS, το οποίο επίσης μεταφέρθηκε στα φιαλίδια. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τα πηγάδια με την βοήθεια θρυψίνης, η οποία απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη τριπλού όγκου θρεπτικού. Το εναιώρημα των κυττάρων προστέθηκε στα φιαλίδια. Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα καταμετρήθηκαν στο μικροσκόπιο με την βοήθεια μίας πλάκας Neubauer και κρατήθηκε ίσος αριθμός κυττάρων από κάθε δείγμα, υπολογιζόμενος με βάση το δείγμα με τον μικρότερο αριθμό κυττάρων. Έπειτα, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 1500rpm, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml κρύο PBS. Ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων με την προσθήκη 1ml παγωμένης 100% αιθανόλης σταγόνα-σταγόνα ενόσω αναδεύονταν συστηματικά. Μετά, τα κύτταρα αφέθηκαν στο ψυγείο στους 4°C overnight. Την επόμενη ημέρα, το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε 2500rpm, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100μL P.I και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια eppendorf. Τέλος, τα φιαλίδια eppendorf αφέθηκαν για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και μετά αναλύθηκαν στον κυτταροδιαχωριστή ARIA II της εταιρίας BD, αποθηκεύοντας μετρήσεις σκέδασης και φθορισμού από περίπου 50000 κύτταρα για το κάθε δείγμα.

2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η καταγραφή, η οργάνωση και η οπτικοποίηση των περισσότερων αποτελεσμάτων έγινε στο Microsoft Excel. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο SPSS STATISTICS μέσω ANOVA (Post Hoc Tukey) και μέσω t-test. Στατιστικά σημαντικά κρίθηκαν τα αποτελέσματα με p-value < 0.05. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 2 φορές.

Η ανάλυση των ζωνών από τα Western Blot έγινε στο Image Studio Lite v.5.2.

Η ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής (αρχεία τύπου fcs 3) έγινε με το λογισμικό FlowJo v.10, χρησιμοποιώντας για κάθε δείγμα τον αλγόριθμο του λογισμικού για τον υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ η στατιστική ανάλυση τους έγινε με το GraphPad Prism.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ BRAF ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ 4-ΥΔΡΟΞΥΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΩΣ ΜΟΝΕΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΤΗΝ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Το πρώτο μέρος αυτής της διπλωματικής εργασίας, περιλαμβάνει την μελέτη της επίδρασης των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης σε τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου (HT-29, COLO-205, RKO) και μία καρκίνου του μαστού (MDA-MB-231). Οι σειρές του παχέος εντέρου φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E ενώ αυτή του μαστού τη μετάλλαξη BRAFG464V, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 1. Στον Πίνακα 2 συνοψίζεται το πρότυπο έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων στις εν λόγω καρκινικές σειρές. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Encorafenib, Dabrafenib, PLX4720, PLX7904, PLX8394, οι οποίοι στοχεύουν την BRAFV600E μετάλλαξη, καθώς και η 4-υδροξυταμοξιφαίνη (OHT, Novaldex®), γνωστό αντιοιστρογόνο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι BRAF αναστολείς ήταν σε συγκέντρωση 1μM, καθώς σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου αυτή κρίθηκε ως η βέλτιστη συγκέντρωση, ενώ η 4-υδροξυταμοξιφαίνη ελέγθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις.

	COLORECTAL			**BREAST**
	RKO (unspecified sex)	**HT-29 (female)**	**COLO-205 (male)**	**MDA-MB-231 (female)**
BRAF	V600E(+/-)	V600E(+/-)	V600E(+/-)	G464V(+/-)
KRAS	wild type	wild type	wild type	G13D(+/-)

Πίνακας 1: Παρουσίαση του προφίλ μεταλλάξεων στα BRAF και KRAS γονίδια στις σειρές HT-29, COLO-205, RKO και MDA-MB-231.

	COLORECTAL			**BREAST**
	RKO (unspecified sex)	**HT-29 (female)**	**COLO-205 (male)**	**MDA-MB-231 (female)**
ERα	no data	controversial data	-	-
ERβ	no data	+	+	+

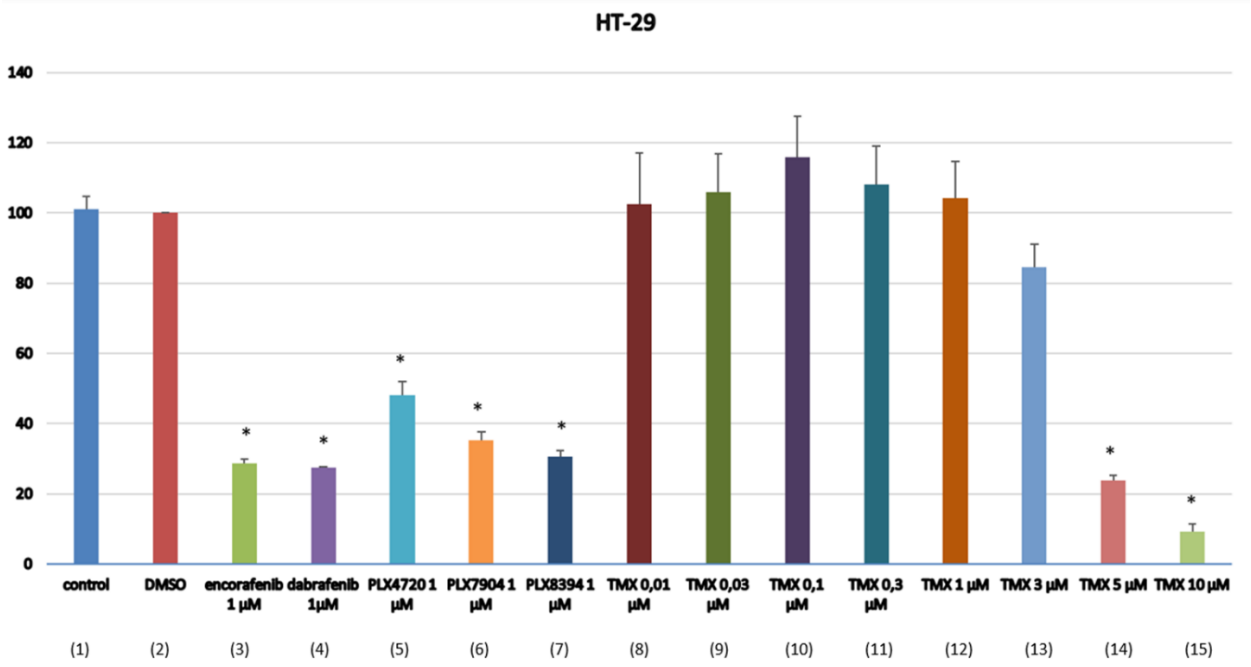
Πίνακας 2: Παρουσίαση του προτύπου έκφρασης των ERα και ERβ υποδοχέων στις σειρές HT-29, COLO-205, RKO και MDA-MB-231.

Τα πειράματα αυτά αποσκοπούσαν: 1) να επιβεβαιώσουν και να διερευνήσουν περαιτέρω την επίδραση των BRAF αναστολέων στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στα MDA-MB-231, 2) να μελετήσουν την επίδραση των BRAFV600E αναστολέων στα κύτταρα MDA-MB-231, και την πιθανή συσχέτιση με την παρουσία της μετάλλαξης BRAFG464V που φέρει η εν λόγω σειρά, και 3) να διερευνήσουν την τυχόν επίδραση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη βιωσιμότητα των κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου. Η μελέτη των τριών σημείων έγινε κατά κύριο λόγο με την τεχνική της SRB, που είναι μία δοκιμή κυτταρικής βιωσιμότητας και είναι ενδεικτικό του αθροίσματος της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο. Σε δεύτερο χρόνο, έγινε μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων έπειτα από κατεργασία με τους ίδιους παράγοντες για ανάλογο χρονικό διάστημα, με στόχο την συμπληρωματική εικόνα των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο.

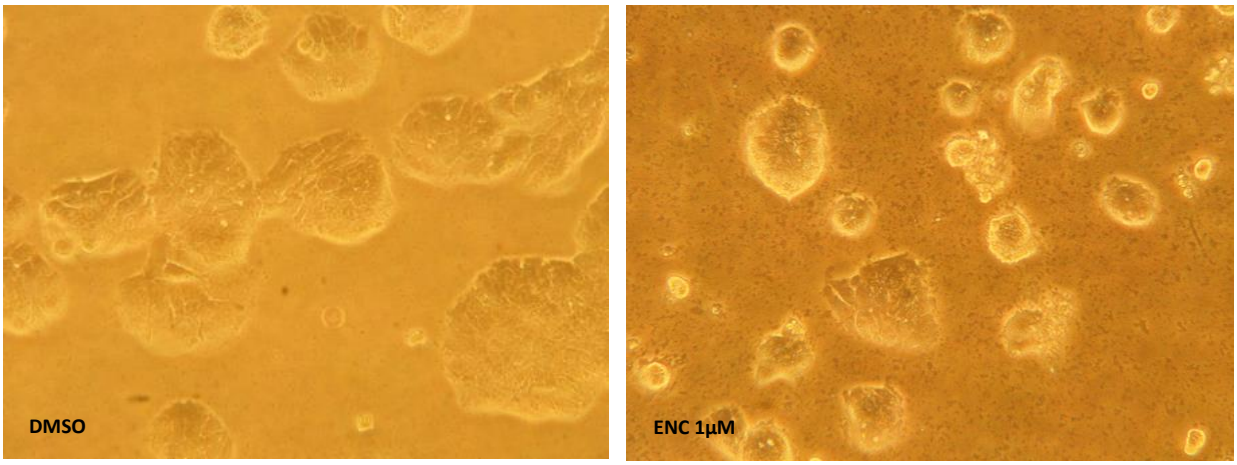
Αρχικά, η εικόνα 5 δείχνει την επίδραση των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT-29. Η κατεργασία με όλους τους BRAF αναστολείς οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (viability). Πιο αναλυτικά, τα Encorafenib, Dabrafenib και PLX8394 (στήλες 3, 4 και 7) επέφεραν τη μεγαλύτερη μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα (περίπου κατά 70%) ενώ το PLX4720 (στήλη 5) τη μικρότερη (περίπου κατά 50%). Όσον αφορά τη δράση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης, μόνο οι συγκεντρώσεις 5μM και 10μM (στήλες 14 και 15) οδήγησαν σε στατιστικά σημαντική και μεγάλη μείωση, περίπου κατά 75% και 90% αντίστοιχα, σε σύγκριση με το DMSO.

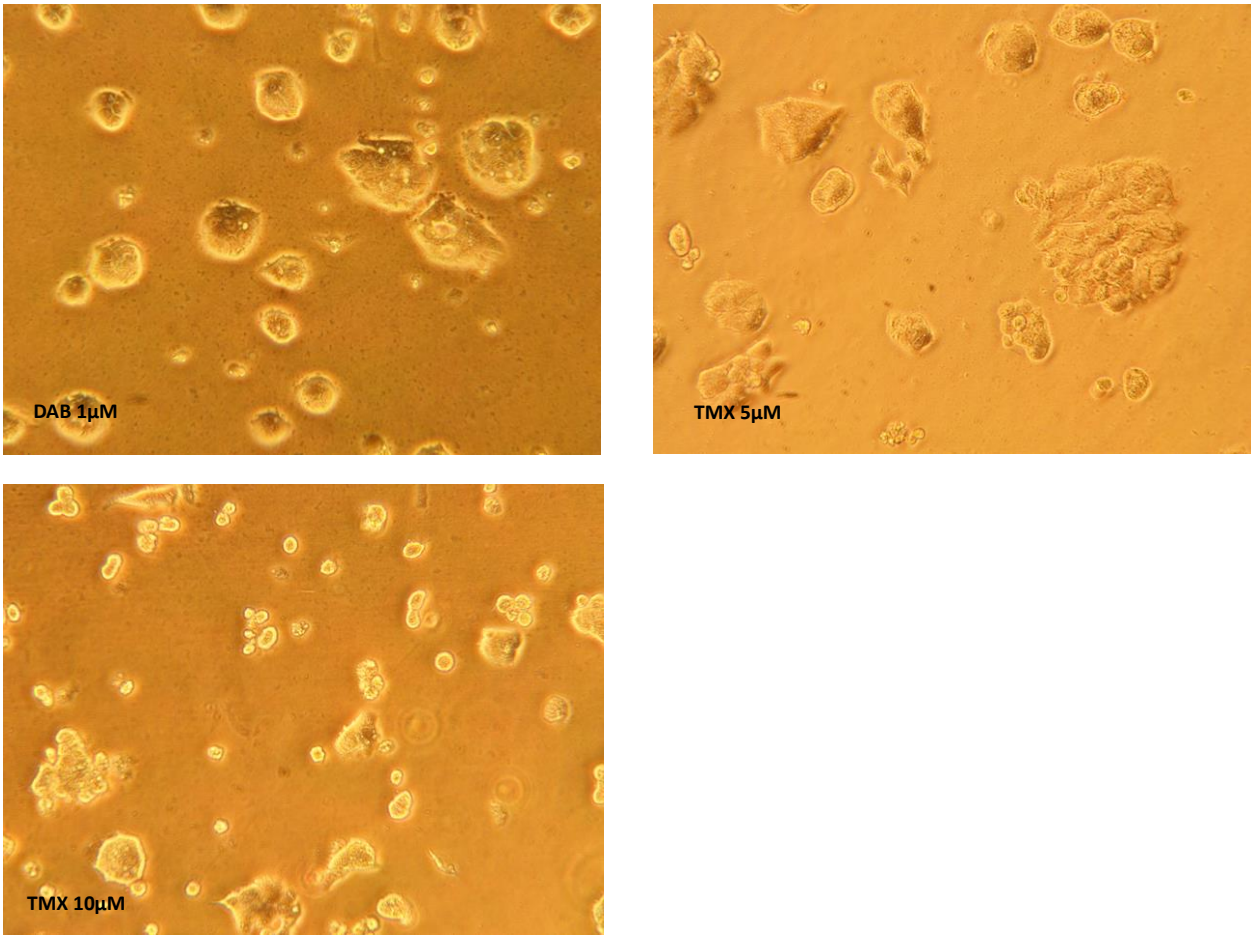
Στην εικόνα 6, παρουσιάζονται εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο των κυττάρων HT-29 μετά από κατεργασία με τους επιλεγμένους αναστολείς Encorafenib (1μM), Dabrafenib (1μM), 4-υδροξυταμοξιφαίνη (5μM) και 4-υδροξυταμοξιφαίνη (10μM), καθώς και μία με DMSO που αξιοποιήθηκε ως θετικό control. Όλες οι κατεργασίες μείωσαν σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων. Η 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 10μM ήταν πιο αποτελεσματική από ότι αυτή στα 5μM και επηρέασε σημαντικά και τη μορφολογία των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα κύτταρα που μεγαλώνουν παρουσία του έκδοχου και καλύπτουν σε ικανοποιητικό βαθμό την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους και σχηματίζοντας αποικίες, η επίδραση με Encorafenib, Dabrafenib και 4-υδροξυταμοξιφαίνη 5μM οδηγεί σε μειωμένο αριθμό βιώσιμων κυττάρων και σε αποικίες μικρότερου μεγέθους. Τέλος, στην κατεργασία με 4-

υδροξυταμοξιφαίνη 10μΜ, ο κυτταρικός αριθμός βρίσκεται σε μικρότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα πηγάδια, και πλέον τα κύτταρα είναι ως επί το πλείστον μεμονωμένα, χωρίς την παρουσία δομής. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της Εικόνας 5 για την επίδραση των κατεργασιών στη βιωσιμότητα των κυττάρων HT-29.



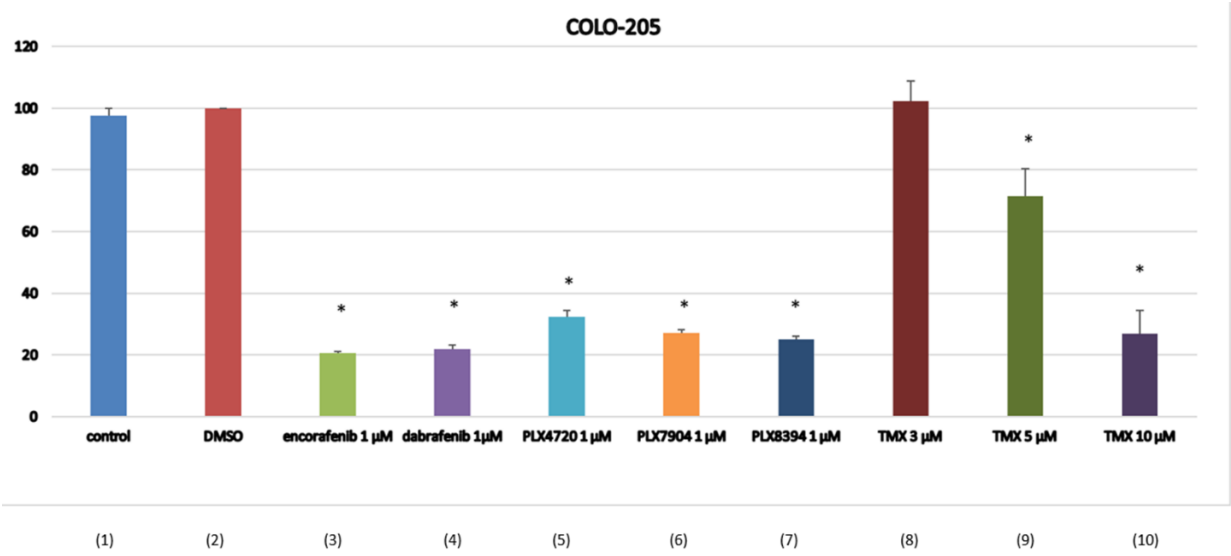
Εικόνα 5: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων HT-29. Κύτταρα HT-29 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μΜ) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *$p<0.05$ σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO).



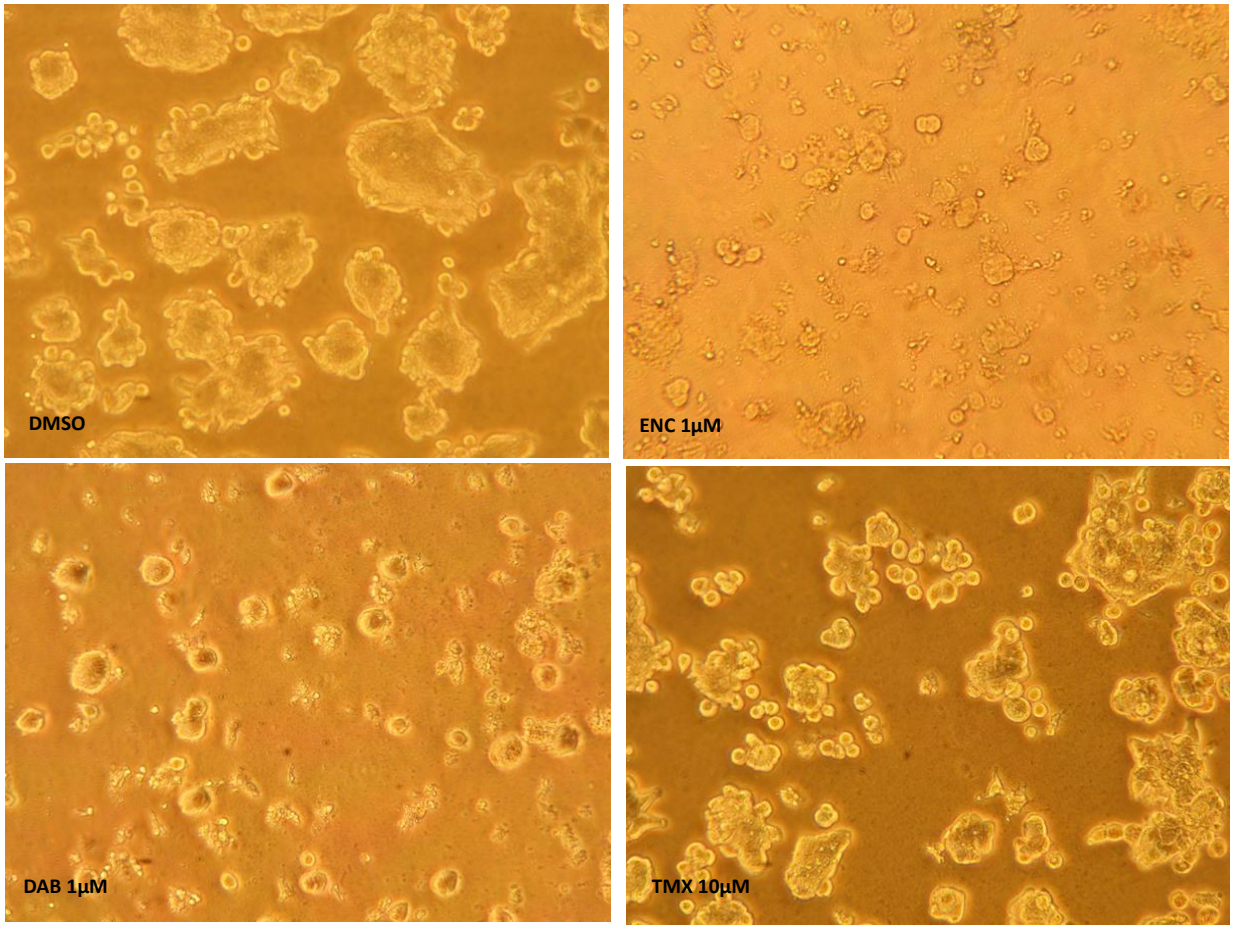


Εικόνα 6: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα και τη μορφολογία των κυττάρων HT-29. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο των κυττάρων HT-29 που καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 5.

Η δεύτερη κυτταρική σειρά, η COLO-205, παρουσιάζεται στην εικόνα 7. Εκεί βλέπουμε ότι η κατεργασία με όλους τους BRAF αναστολείς έφερε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Πιο αναλυτικά, το Encorafenib και το Dabrafenib (στήλες 3,4) έφεραν το καλύτερο αποτέλεσμα, με τα επίπεδα των κυττάρων να προσεγγίζουν το 20% του αρχικού. Οι αναστολείς δηλαδή επέφεραν μείωση στην βιωσιμότητα των κυττάρων της τάξης του 80%. Επόμενα στη σειρά σε επίδοση ήταν τα PLX7904 και PLX8394 (στήλες 6,7) με τον αριθμό των κυττάρων που επιβίωσαν να αγγίζουν το 25%, και έπεται η επίδραση με το PLX4720 (στήλη 5) με περίπου 30% επιβίωση. Από την άλλη πλευρά, η 4-υδροξυταμοξιφαίνη είχε στατιστικά σημαντική επίδραση μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τα 5μM (στήλη 9) έδειξαν 30% επίδραση ενώ τα 10μM (στήλη 10) 75%.



Εικόνα 7: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων COLO-205. Κύτταρα COLO-205 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *$p<0.05$ σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO).

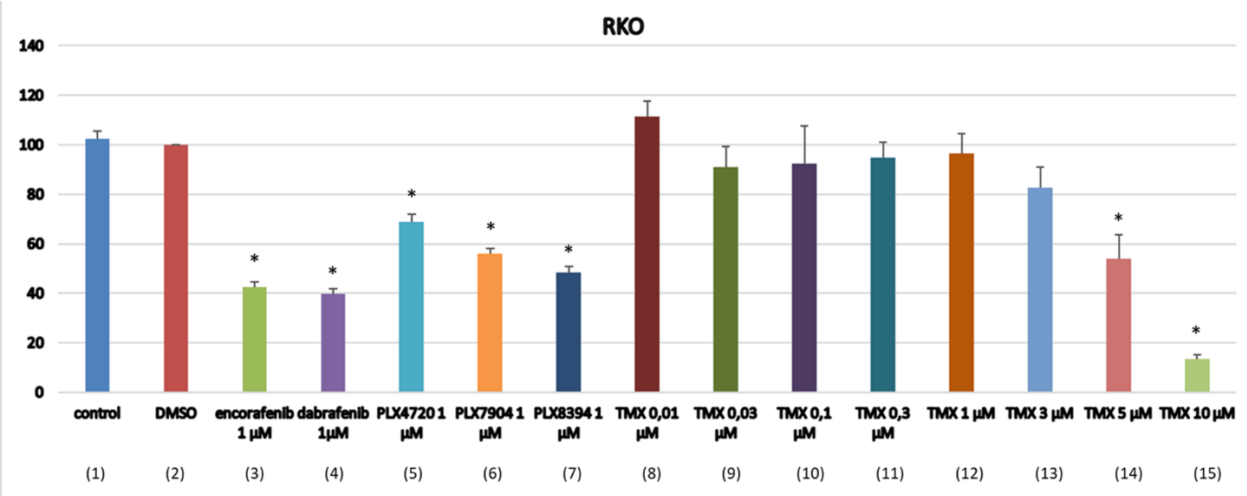


Εικόνα 8: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα και τη μορφολογία των κυττάρων COLO-205. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο των κυττάρων COLO-205 που καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 7.

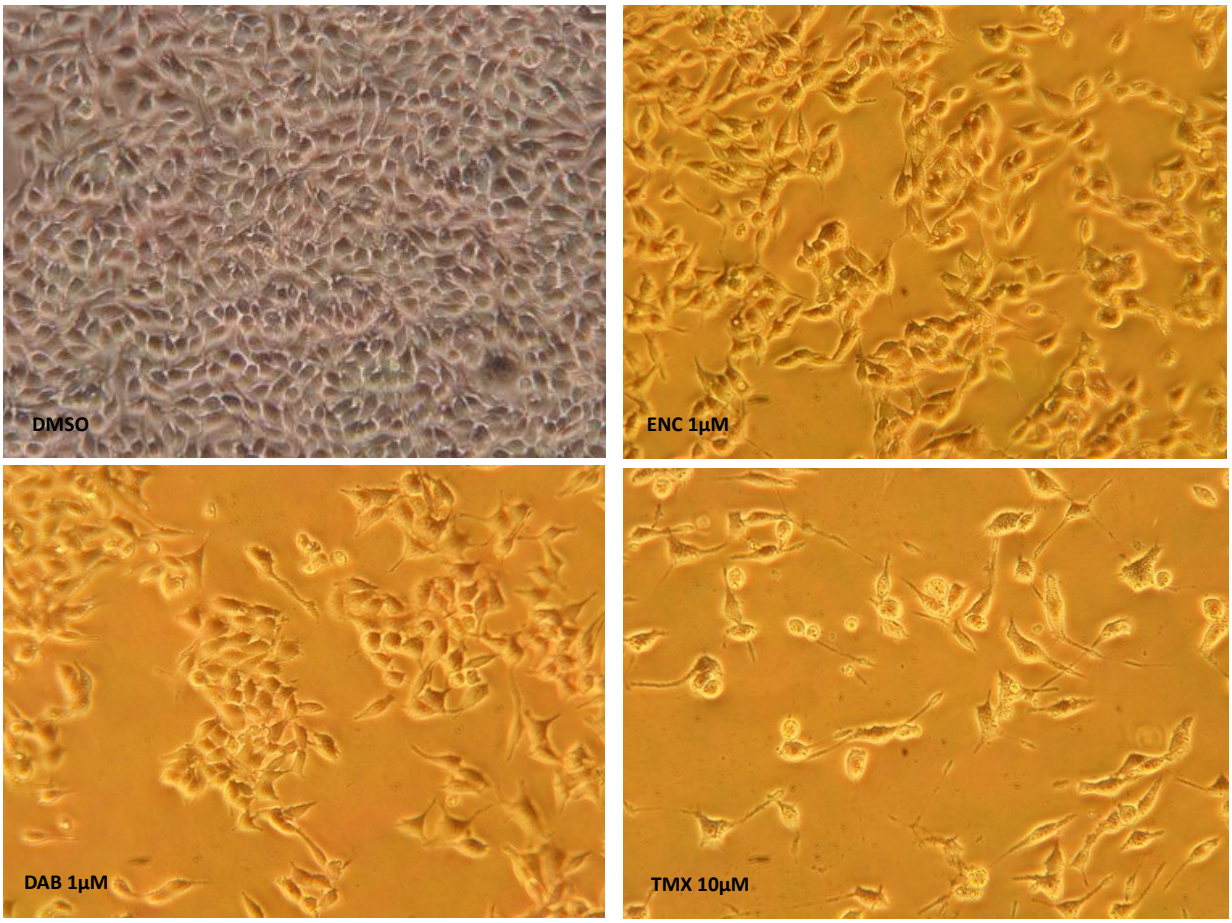
Στην εικόνα 8, απεικονίζονται οι φωτογραφίες που λήφθηκαν από το οπτικό μικροσκόπιο που αφορούν την σειρά COLO-205. Και σε αυτήν την περίπτωση, όπως ήταν αναμενόμενο, τα δεδομένα συμφωνούν με αυτά της δοκιμής SRB. Στο πηγάδι όπου προστέθηκε μόνο DMSO τα κύτταρα παρουσιάζονται να αναπτύσσονται κανονικά, πληρώνοντας σε μεγάλο βαθμό το πιάτο και σχηματίζοντας ευμεγέθεις αποικίες. Αυτό δεν ισχύει στο σημείο μετά από κατεργασία με Encorafenib, όπου τα κύτταρα είναι λιγοστά, μεμονωμένα και με εμφανώς επηρεασμένη και ανομοιογενή μορφολογία. Ο αριθμός και η ικανότητα σχηματισμού αποικιών επηρεάζεται και στην περίπτωση του Dabrafenib. Τέλος, η 4-υδροξυταμοξιφαίνη 10μM επηρεάζει και αυτή τον αριθμό των κυττάρων, αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό τον σχηματισμό αποικιών, δίνοντας έτσι μια εικόνα που ομοιάζει περισσότερο αυτή του DMSO σε σχέση με τους BRAF αναστολείς.

Τα αποτελέσματα μετά από κατεργασία με τα αντιφάρμακα της κυτταρικής σειράς του παχέος εντέρου RKO παρουσιάζονται στις εικόνες 9 και 10. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι όλοι οι BRAF αναστολείς είχαν ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα με τα Encorafenib και Dabrafenib (στήλες 3,4) να είναι οι πιο δραστικοί αναστολείς, με την κυτταρική βιωσιμότητα να αγγίζει το 40%. Ακολουθούν τα PLX8394 και PLX7904 (στήλες 7 και 6 αντίστοιχα) με το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων να είναι 50% και 55% αντίστοιχα μετά τις κατεργασίες. Ο λιγότερο δραστικός BRAF αναστολέας στα RKO είναι το PLX4720 (στήλη 5) που παρουσίασε 30% επίδραση στη κυτταρική βιωσιμότητα. Όσον αφορά την 4-υδροξυταμοξιφαίνη, βλέπουμε ξανά ότι οι μικρές συγκεντρώσεις (στήλες 8-13) δεν είχαν κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στη κυτταρική βιωσιμότητα. Η κατεργασία με 5μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης (στήλη 14) κατέδειξε 45% επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων RKO, ενώ τα 10μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης (στήλη 15) κατέδειξαν μια πολύ σημαντική επίδραση 85% στη κυτταρική βιωσιμότητα των RKO, που είναι άξια περαιτέρω σχολιασμού και αξιοποίησης.

Οι εικόνες που ελήφθησαν από το οπτικό μικροσκόπιο και αφορούν τα RKO, δείχνουν ότι τα κύτταρα στην περίπτωση του DMSO αναπτύσσονται σε εντυπωσιακούς αριθμούς, γεμίζοντας εντελώς το πιάτο, χωρίς κενά. Τα Encorafenib και Dabrafenib επηρεάζουν σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων, ενώ μετά από κατεργασία με 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 10μM έχει



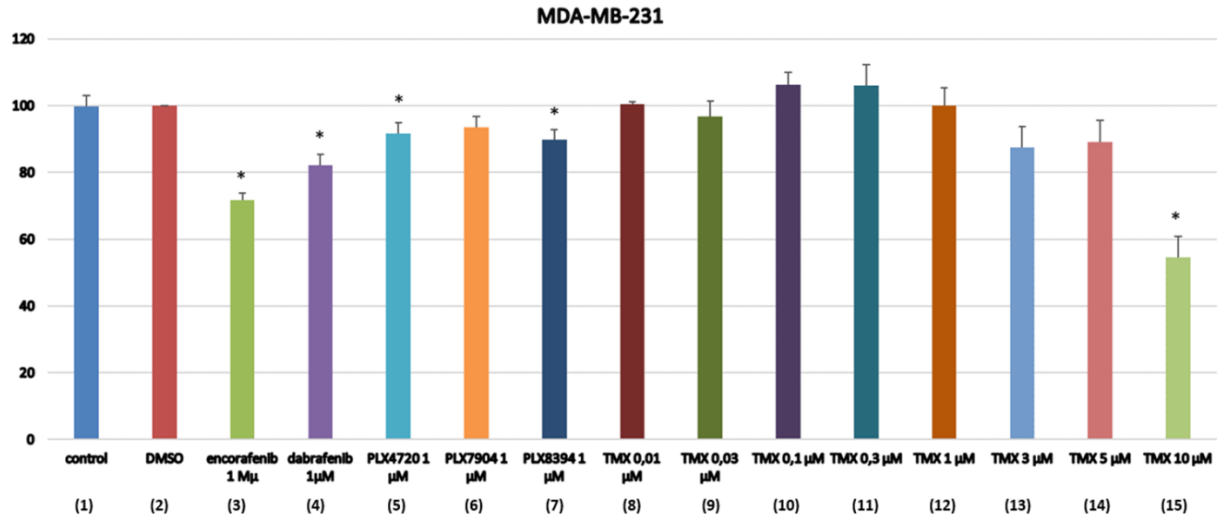
Εικόνα 9: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων RKO. Κύτταρα RKO καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *$p<0.05$ σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO).



Εικόνα 10: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα και τη μορφολογία των κυττάρων RKO. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο των κυττάρων RKO που καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 9.

απομείνει ένα μικρό ποσοστό κυττάρων, επηρεάζοντας ταυτόχρονα και την δομή τους σε αποικίες. Τα αποτελέσματα στο οπτικό μικροσκόπιο συμφωνούν, επιβεβαιώνουν και αναδεικνύουν περαιτέρω σε οπτικό επίπεδο τα δεδομένα της δοκιμής κυτταρικής βιωσιμότητας SRB.

Τέλος, εξετάστηκε η κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MDA-MB-231. Στην εικόνα 11 καταδεικνύεται ότι οι κατεργασίες με καθένα από τους BRAF αναστολείς είχαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στη μείωση της βιωσιμότητας των MDA-MB-231 κυττάρων, εκτός από το PLX7904 (στήλη 6). Πιο αποτελεσματικοί αποδείχτηκαν τα Encorafenib και Dabrafenib (στήλες 3,4) με επίδραση στη βιωσιμότητα 30% και 20% αντίστοιχα ενώ τα PLX4720 και PLX8394 (στήλες 5,7) μείωσαν τη βιωσιμότητα κατά 10%. Εξ άλλου, η κατεργασία των MDA-MB-231 κυττάρων με 10μΜ 4-υδροξυταμοξιφαίνη είχε σημαντική επίδραση με 45% μείωση της βιωσιμότητας τους , αλλα όχι στις μικρότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Για την συγκεκριμένη καρκινική σειρά, επειδή οι επιπτώσεις των παραγόντων στην βιωσιμότητα ήταν μικρής κλίμακας, δεν κρίθηκε σκόπιμο να εξαχθούν φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο.

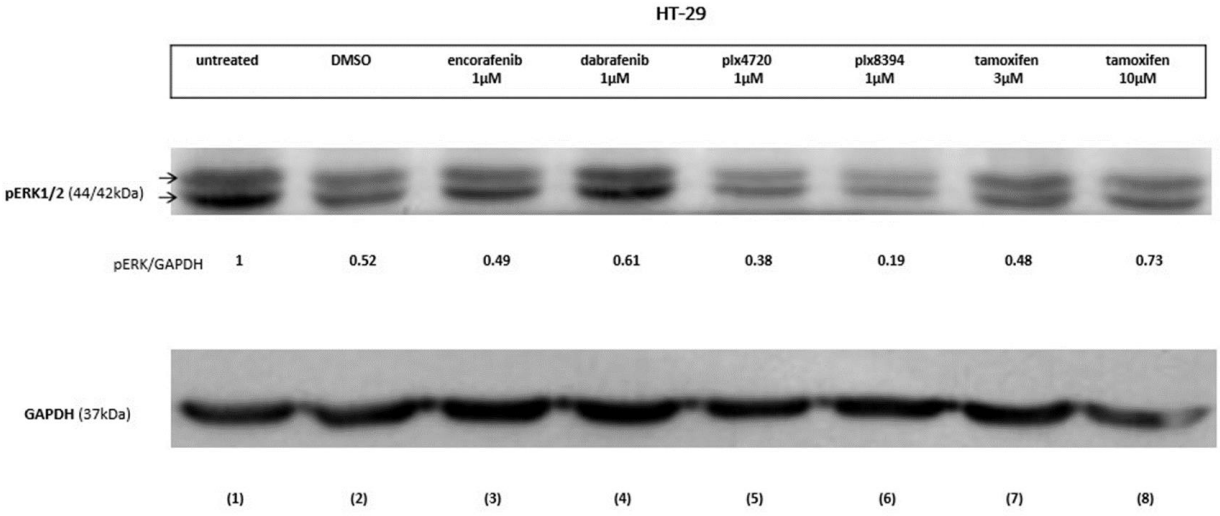


Εικόνα 11: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων MDA-MB-231. Κύτταρα MDA-MB-231 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μΜ) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *$p<0.05$ σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO).

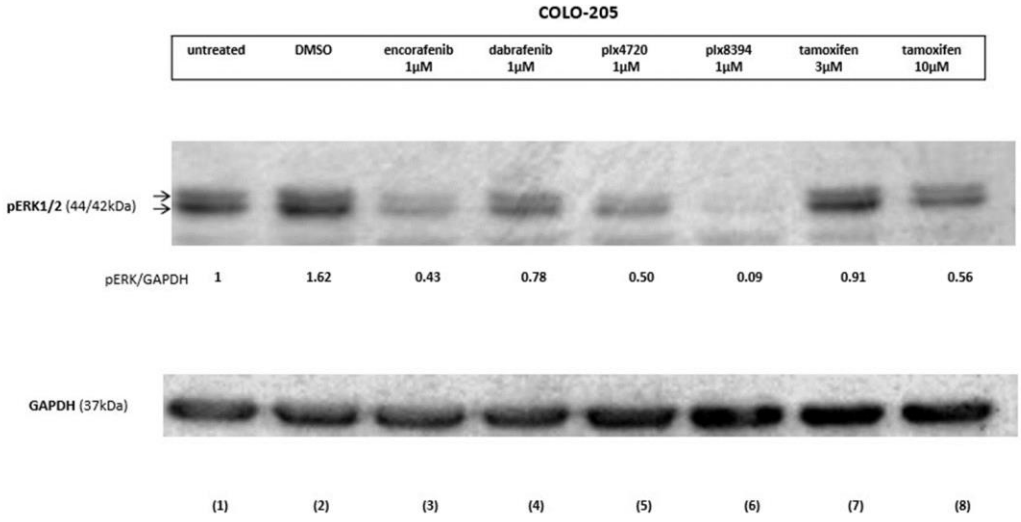
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ BRAF ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ 4-ΥΔΡΟΞΥΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ pERK

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στο μονοπάτι σηματοδότησης MAPK. Αυτό έγινε με ανάλυση των επιπέδων της pERK1/2, μίας πρωτεΐνης-δείκτη για την ενεργότητα του μονοπατιού MAPK, με την τεχνική της ανοσοχημικής ανάλυσης κατά Western.

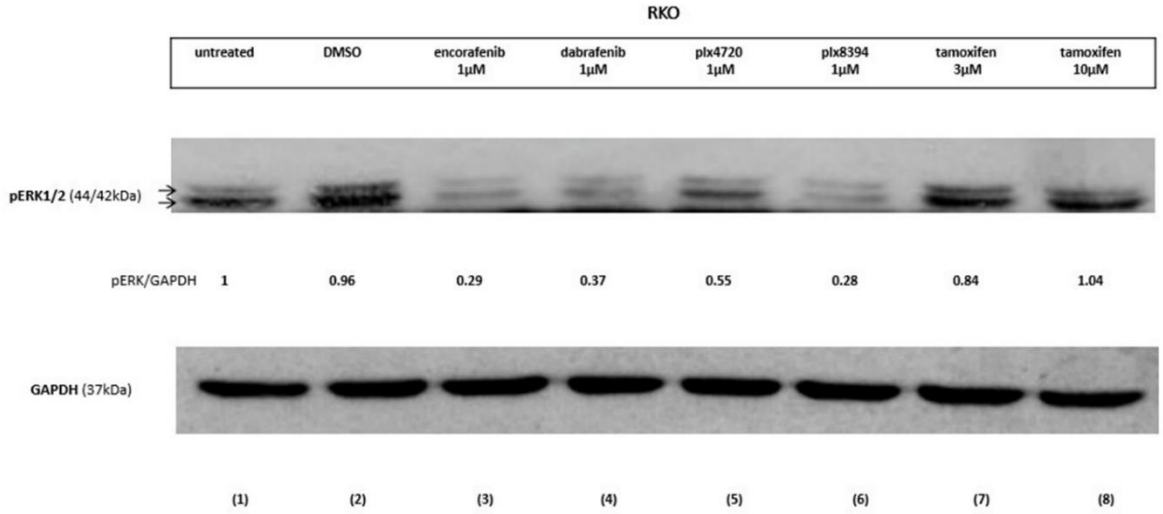
Στην εικόνα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των επιπέδων της pERK1/2 για τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HT-29. Το Encorafenib (στήλη 3) μείωσε τα επίπεδα του pERK1/2 κατά 50% και το Dabrafenib (στήλη 4) κατά 40%. Πιο δραστικοί BRAF αναστολείς αποδείχτηκαν τα PLX4720 και PLX8394 (στήλες 5,6) με επιδόσεις που προσεγγίζουν το 60% και 80% αντίστοιχα στη μείωση των επιπέδων της p-ERK1/2, και της ενεργότητας του μονοπατιού MEK/ERK. Η 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 3μM και 10 μM οδήγησε σε μείωση κατά 50% και 25%, αντίστοιχα, των επιπέδων της p-ERK1/2.



Εικόνα 12: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στα επίπεδα της p-ERK1/2 των κυττάρων HT-29. Κύτταρα HT-29 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 24 ώρες. Εκχύλισμα από $5x10^5$ κύτταρα αναλύθηκε με ανοσοστύπωση κατά Western με χρήση του αντισώματος έναντι της p-ERK1/2. Η κανονικοποίηση του σήματος έγινε με την χρήση της πρωτεΐνης GAPDH και παρουσιάζεται ο λόγος pERK1/2/GAPDH για την κάθε κατεργασία.



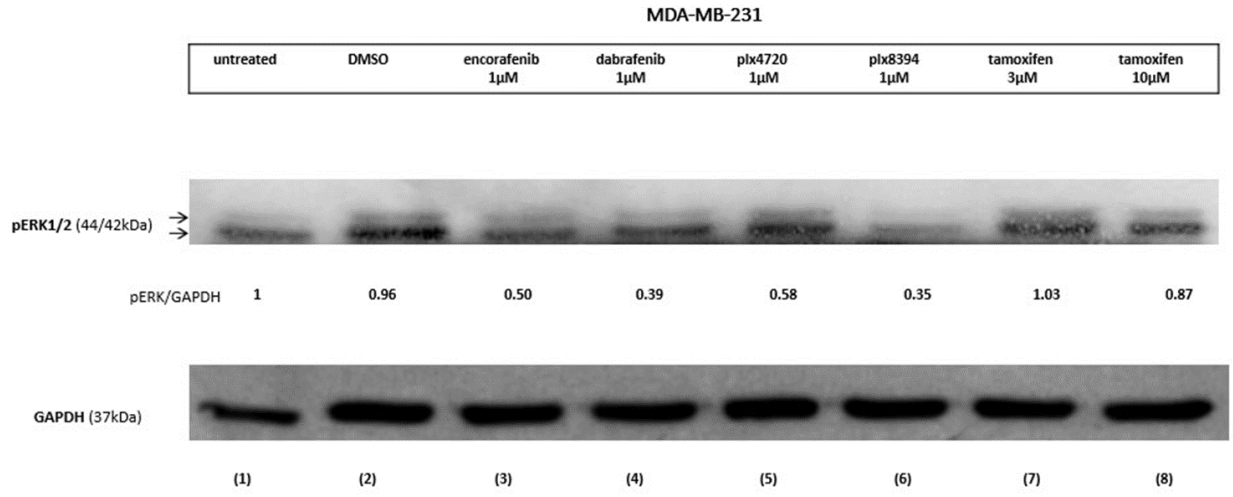
Εικόνα 13: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στα επίπεδα της p-ERK1/2 των κυττάρων COLO-205. Κύτταρα COLO-205 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 24 ώρες. Εκχύλισμα από $6x10^5$ κύτταρα αναλύθηκε με ανοσοστύπωση κατά Western με χρήση του αντισώματος έναντι της p-ERK1/2. Η κανονικοποίηση του σήματος έγινε με την χρήση της πρωτεΐνης GAPDH και παρουσιάζεται ο λόγος pERK1/2/GAPDH για την κάθε κατεργασία.



Εικόνα 14: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στα επίπεδα της p-ERK1/2 των κυττάρων RKO. Κύτταρα RKO καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 24 ώρες. Εκχύλισμα από $5x10^5$ κύτταρα αναλύθηκε με ανοσοστύπωση κατά Western με χρήση του αντισώματος έναντι της p-ERK1/2. Η κανονικοποίηση του σήματος έγινε με την χρήση της πρωτεΐνης GAPDH και παρουσιάζεται ο λόγος pERK1/2/GAPDH για την κάθε κατεργασία.

Όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα COLO-205, καταδείχθηκε (εικόνα 13) ότι τα Encorafenib, PLX4720 και 4-υδροξυταμοξιφαίνη 10μM (στήλες 3, 5 και 8) μειώνουν το σήμα του p-ERK1/2 περίπου κατά το ήμισυ ενώ το Dabrafenib (στήλη 4) έχει επιδράσει, με 20% μείωση στη pERK1/2. Πιο αποτελεσματική, με 90% μείωση της ενεργής ERK1/2, αποδείχτηκε η κατεργασία των COLO-205 κυττάρων με PLX8394 (στήλη 6) ενώ η κατεργασία με 4-υδροξυταμοξιφαίνη 3μM (στήλη 7) δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση στη δραστικότητα της ERK1/2 σε αυτή τη κυτταρική σειρά, υπό αυτές τις συνθήκες.

Επιπλέον, η εικόνα 14 δείχνει ότι στην κυτταρική σειρά RKO κατεργασίες με το καθένα από τα Encorafenib, Dabrafenib και PLX8394 (στήλες 3,4 και 6) είχαν σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της p-ERK1/2 κατά 65-70%, ενώ κατεργασία με το PLX4720 (στήλη 5) μείωσε την ενεργότητα της ERK1/2 κατά 45%. Στην περίπτωση της κατεργασίας με 4-υδροξυταμοξιφαίνη (στήλες 7 και 8) δεν καταγράφηκε σημαντική μείωση της ενεργότητας της ERK1/2 και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.



Εικόνα 15: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στα επίπεδα της p-ERK1/2 των κυττάρων MDA-MB-231. Κύτταρα MDA-MB-231 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) για 24 ώρες. Εκχύλισμα από $4.8x10^5$ κύτταρα αναλύθηκε με ανοσοστύπωση κατά Western με χρήση του αντισώματος έναντι της p-ERK1/2. Η κανονικοποίηση του σήματος έγινε με την χρήση της πρωτεΐνης GAPDH και παρουσιάζεται ο λόγος pERK1/2/GAPDH για την κάθε κατεργασία.

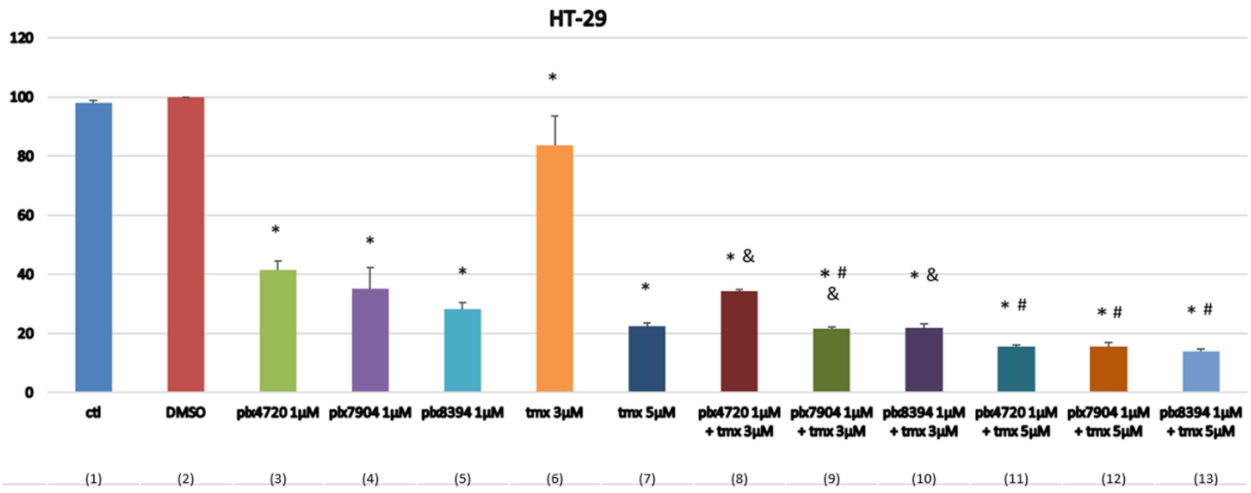
Τέλος, στα κύτταρα καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 (εικόνα 15), οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της p-ERK1/2 αποδείχτηκαν οι Dabrafenib και PLX8394 (στήλες 4

και 6) με μείωση της ERK1/2 ενεργότητας της τάξης του 60-65%. Τα PLX4720 και Encorafenib (στήλες 5 και 3 αντίστοιχα) επέφεραν μείωση της ERK1/2 δραστικότητας στο 40-50%. Και σε αυτή την κυτταρική σειρά η κατεργασία με 4-υδροξυταμοξιφαίνη δεν επέφερε κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή στην ενεργότητα ERK1/2 σε αυτές τις συνθήκες.

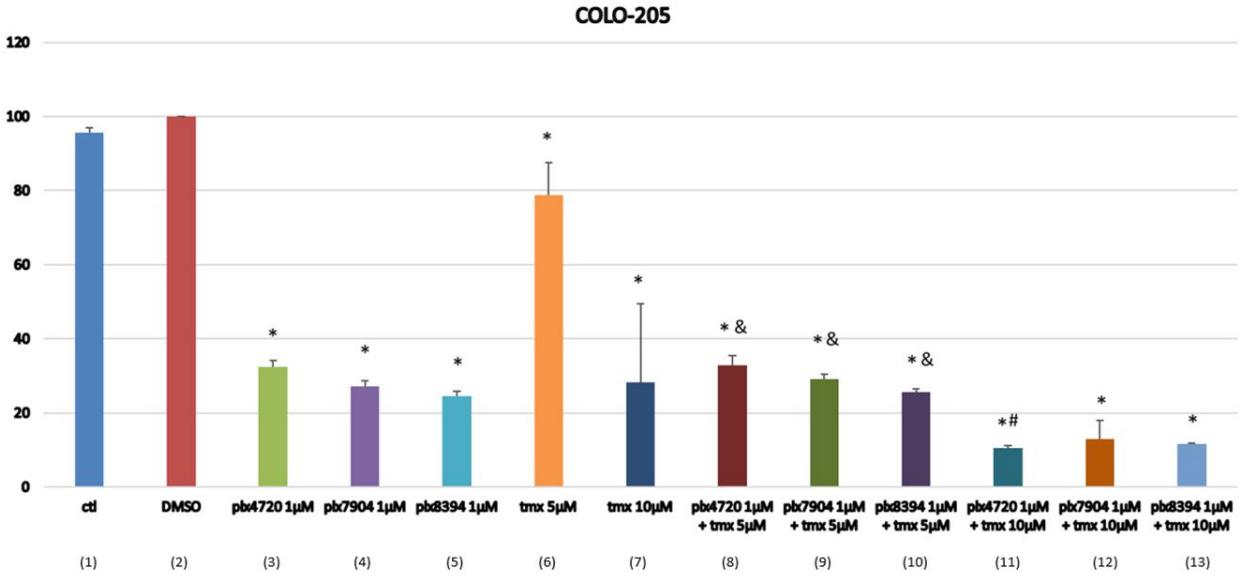
3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ BRAF ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ 4-ΥΔΡΟΞΥΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΥ

Στο επόμενο βήμα αυτής της διπλωματικής εργασίας, για κάθε κυτταρική σειρά επιλέχθηκαν οι ενώσεις που κρίθηκαν οι πιο υποσχόμενες για ένα πλάνο συνδυαστικής κατεργασίας και μελετήθηκε η επίδραση των συνδυασμών τους στην κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό κύκλο κυττάρων καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού όπως περιγράφεται παραπάνω (3.1).

Για τα HT-29 επιλέχθηκαν οι BRAF αναστολείς PLX4720, PLX7904, PLX8394 και η 4-υδροξυταμοξιφαίνη στις συγκεντρώσεις 3μM και 5μM, επειδή στις αντίστοιχες μονοκατεργασίες τα HT29 εμφάνισαν μια μερική φαρμακοαντίσταση σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις που ελέγθηκαν παραπάνω. Στην εικόνα 16 φαίνεται ότι οι συνδυασμοί PLX4720+ 4-υδροξυταμοξιφαίνη 3μM και PLX8394+ 4-υδροξυταμοξιφαίνη 3μM (στήλες 8 και 10) εμφάνισαν μεγαλύτερη επίδραση στην βιωσιμότητα των HT-29 σε σχέση με τις μονοθεραπείες, χωρίς όμως το αποτέλεσμα να είναι αθροιστικό, ενώ παράλληλα τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά μόνο σε σχέση με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη. Εξ άλλου, ο συνδυασμός PLX7904+ 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 3μM (στήλη 9) είχε ένα αθροιστικό αποτελέσμα στην μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τις αντίστοιχες μονοκατεργασίες, με μία μικρή απόκλιση 3%, όντας στατιστικά σημαντικό σε σχέση και με τους δύο παράγοντες στις μονές κατεργασίες. Τέλος, οι συνδυασμοί με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη 5μM ήταν στατιστικά σημαντικοί στη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μόνο σε σχέση με το εκάστοτε PLX και όχι με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη αφού αυτή είχε μεγάλη δραστικότητα από μόνη της. Αυτοί οι συνδυασμοί οδήγησαν σε μεγαλύτερη μείωση στην βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τις μονοκατεργασίες, χωρίς όμως να είναι αθροιστικό το αποτέλεσμα.



Εικόνα 16: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων, της 4-υδροξυταμοξιφαίνης και των συνδυασμών αυτών στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων HT-29. Κύτταρα HT-29 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM), με επιλεγμένες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) ή με τους συνδυασμούς BRAF αναστολέων και 4-υδροξυταμοξιφαίνης για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO), #p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με τον εκάστοτε BRAF αναστολέα, &p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με την εκάστοτε συγκέντρωση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης.



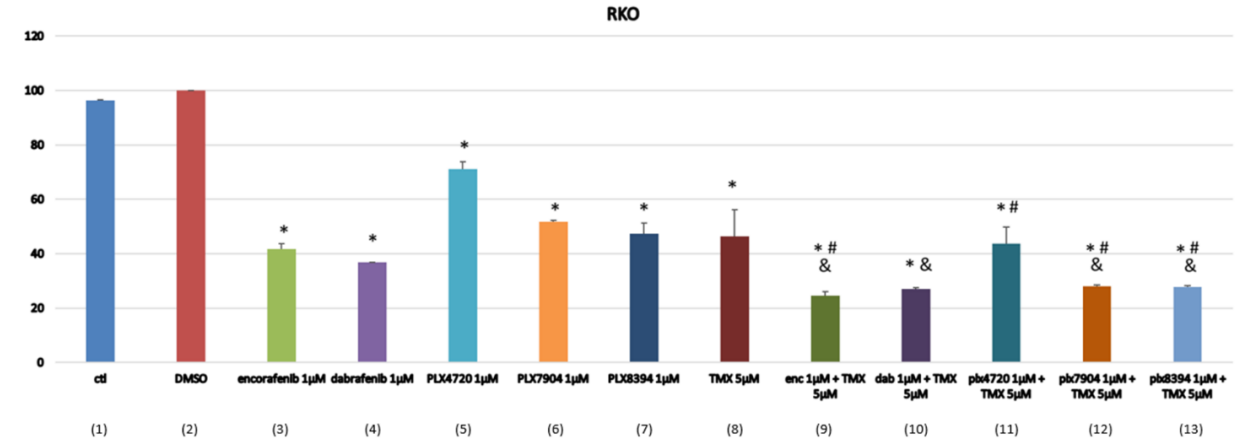
Εικόνα 17: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων, της 4-υδροξυταμοξιφαίνης και των συνδυασμών αυτών στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων COLO-205. Κύτταρα COLO-205 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM), με επιλεγμένες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) ή με τους συνδυασμούς BRAF αναστολέων και 4-υδροξυταμοξιφαίνης για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO), #p<0.05 σε σχέση

με την κατεργασία μόνο με τον εκάστοτε BRAF αναστολέα, &p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με την εκάστοτε συγκέντρωση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης.

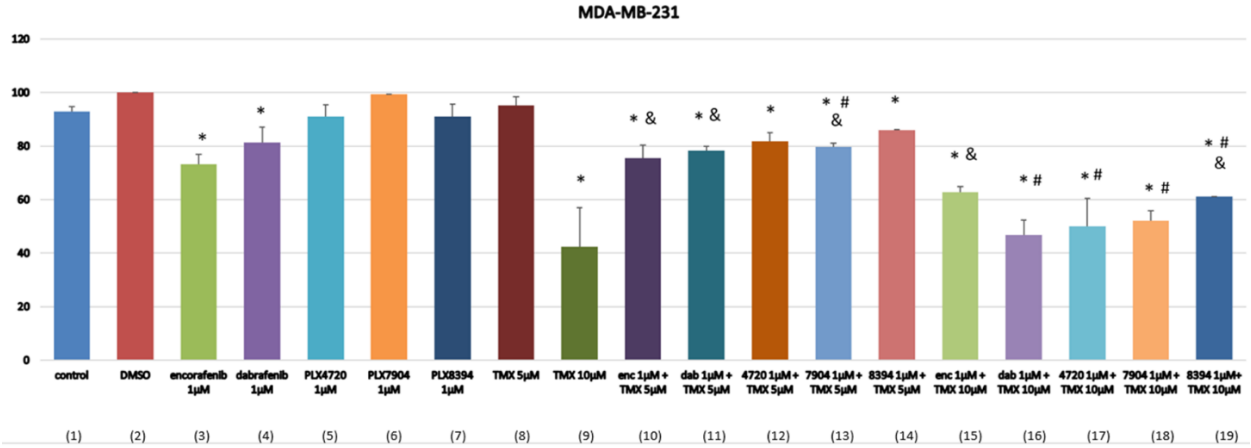
Στην εικόνα 17, βλέπουμε ότι στα κύτταρα COLO-205, όταν τα PLX4720, PLX7904 και PLX8394 συνδυάστηκαν με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη 5μM (στήλες 8, 9 και 10) το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό μόνο σε σχέση με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη, και η συνολική επίδραση στην βιωσιμότητα κυμαινόταν σε παρόμοια επίπεδα με τους BRAF αναστολείς. Όσον αφορά τους συνδυασμούς με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 10μM (στήλες 11,12 και 13), φαίνεται ότι υπάρχει μία τάση για μειωμένη βιωσιμότητα, χωρίς όμως να είναι αθροιστική, ενώ παράλληλα δεν ήταν σε γενικές γραμμές ούτε στατιστικά σημαντική. Σημειωτέον όμως ότι στην περίπτωση της συνδυαστικής κατεργασίας PLX4720+ 4-υδροξυταμοξιφαίνη 10μM (στήλη 11), καταδείχτηκε σημαντική μείωση στη κυτταρική βιωσιμότητα με στατιστικό πλεονέκτημα σε σχέση με την μονή κατεργασία με το PLX4720.

Όσον αφορά τις συνδυαστικές κατεργασίες στη RKO κυτταρική σειρά, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστούν όλοι οι BRAF αναστολείς συνδυαστικά με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 5μM, καθώς σε αυτούς τους παράγοντες εμφανίστηκε φαρμακοαντίσταση στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα στις μονές κατεργασίες. Στην εικόνα 18, παρατηρούμε ότι όλοι οι συνδυασμοί (στήλες 9-13) αποφέρουν μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης της βιωσιμότητας των RKO χωρίς αθροιστικό αποτέλεσμα. Πιο αναλυτικά, οι συνδυασμοί της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με τα Encorafenib, PLX7904, και PLX8394 (στήλες 9, 12, 13 αντίστοιχα) επέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των RKO σε σχέση και με τους δύο αναστολείς μεμονωμένα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στον συνδυασμό της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το Dabrafenib (στήλη 10) ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την μονοκατεργασία με 4-υδροξυταμοξιφαίνη, και στον συνδυασμό της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX4720 (στήλη 11) η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τη μονοκατεργασία με PLX4720 στις συνθήκες που δοκιμάστηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Τέλος, τα αποτελέσματα των συνδυαστικών κατεργασιών που επελέγησαν για τα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 παρουσιάζονται στην εικόνα 19. Όσον αφορά τους συνδυασμούς με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 5μM παρατηρούμε ότι οι συνδυασμοί με τα PLX4720 και PLX8394 (στήλες 12, 14) είχαν ένα αθροιστικό αποτέλεσμα που ήταν στατιστικά



Εικόνα 18: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων, της 4-υδροξυταμοξιφαίνης και των συνδυασμών αυτών στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων RKO. Κύτταρα RKO καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM), με επιλεγμένη συγκέντρωση 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) ή με τους συνδυασμούς BRAF αναστολέων και 4-υδροξυταμοξιφαίνης για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO), #p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με τον εκάστοτε BRAF αναστολέα, &p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με την 4-υδροξυταμοξιφαίνης.



Εικόνα 19: Επίδραση των BRAFV600E αναστολέων, της 4-υδροξυταμοξιφαίνης και των συνδυασμών αυτών στη κυτταρική βιωσιμότητα (cell viability) των κυττάρων MDA-MB-231. Κύτταρα MDA-MB-231 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM), με επιλεγμένες συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (TMX) ή με τους συνδυασμούς BRAF αναστολέων και 4-υδροξυταμοξιφαίνης για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με την SRB δοκιμασία. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του έκδοχου (DMSO). *p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το έκδοχο (DMSO), #p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με τον εκάστοτε BRAF αναστολέα, &p<0.05 σε σχέση με την κατεργασία μόνο με την εκάστοτε συγκέντρωση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης.

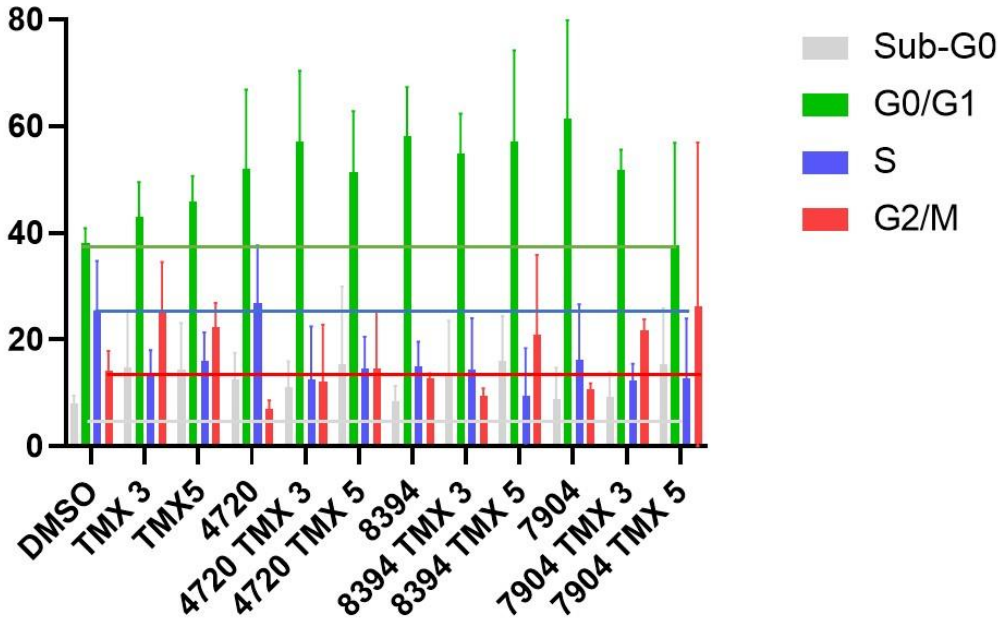
σημαντικό σε σχέση με το DMSO. Όσον αφορά τους συνδυασμούς της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με τα Encorafenib και Dabrafenib (στήλες 10, 11) διαπιστώθηκε ότι το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό σε σχέση με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη. Εξ άλλου, η συνδυαστική κατεργασία 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το Dabrafenib παρουσίασε αθροιστικό αποτέλεσμα στη

μείωση της βιωσιμότητας των MDA-MB-231. Ο καλύτερος συνδυασμός αποδείχτηκε να είναι το PLX7904 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 5μM (στήλη 13) που απέφερε ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα στη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των MDA-MB-231 της τάξης του 20% που ήταν στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση και με τις δύο μονές κατεργασίες. Από την άλλη πλευρά, παρατηρώντας τους συνδυασμούς των BRAF αναστολέων με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη 10μM (στήλες 15-19) προκύπτει ότι οι περισσότεροι από αυτούς δεν είναι καλύτεροι από τις μονοθεραπείες όσον αφορά τη δυνατότητα μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Πιο αναλυτικά, τα αποτελέσματα από τα Dabrafenib, PLX4720 και PLX7904 (στήλες 16,17,18) κυμαίνονταν σε παρόμοια επίπεδα με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη ως μονή κατεργασία, ενώ ο συνδυασμός της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το Encorafenib (στήλη 15) παρουσίασε παρόμοια επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας με το Encorafenib. Σημειωτέον ότι στα κύτταρα MDA-MB-231 ο συνδυασμός της 4-υδροξυταμοξιφαίνης 10μM με το PLX8394 (στήλη 19), ανέδειξε ένα καλύτερο αποτέλεσμα στη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τις μονές κατεργασίες που κυμαίνεται στο 40% και είναι στατιστικά σημαντικό σε σχέση με αυτές, χωρίς όμως να είναι αθροιστικό.

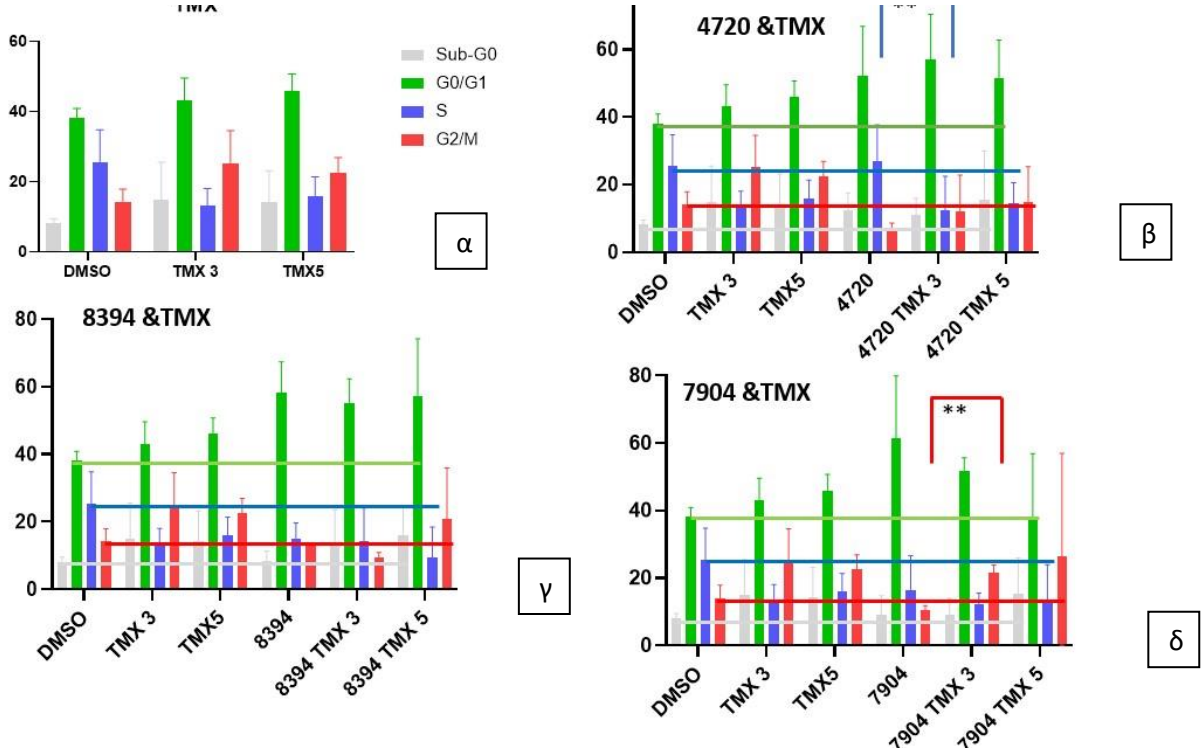
3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HT-29 ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΕΣ

Προκειμένου να μελετηθούν οι μηχανισμοί δράσης των BRAF αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης αναλύθηκε ο κυτταρικός κύκλος κυττάρων HT-29 μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS) μετά από κατεργασία με PLX4720, PLX7904, PLX8394 (1μM) και 4-υδροξυταμοξιφαίνη στις συγκεντρώσεις των 3μM και 5μM και τους συνδυασμούς τους. Για την εξήγηση των αποτελεσμάτων, αξίζει να σημειωθεί ότι η Sub-G0 φάση υποδηλώνει το ποσοστό των κυτταρικών θραυσμάτων και η G0/G1 αναφέρεται στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1.

Στις εικόνες 20 και 21, φαίνεται ότι στις κατεργασίες των HT-29 και με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της 4-υδροξυταμοξιφαίνης υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων στις Sub-G0, G0/G1 και G2/M σε σχέση με το DMSO και αρκετά χαμηλότερο ποσοστό στην S φάση. Μετά την κατεργασία των HT-29 με PLX4720 βλέπουμε να αυξάνεται αρκετά το ποσοστό των κυττάρων στην Sub-G0 και στην G0/G1, ενώ μειώνεται σημαντικά η φάση G2/M, με την S φάση να μένει σταθερή. Στους συνδυασμούς του PLX4720 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη,



Εικόνα 20: Επίδραση επιλεγμένων BRAFV600E αναστολέων και της 4-υδροξυταμοξιφαίνης στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων HT-29. Κύτταρα HT-29 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τους BRAF αναστολείς που δηλώνονται (1 μM), την 4-υδροξυταμοξιαφαίνη (TMX, 3 και 5 μM) ή τους συνδυασμούς τους για 3 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι. Ακολούθησε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής για κάθε χειρισμό.



Εικόνα 21: Συγκριτική παρουσίαση αποτελεσμάτων της Εικόνας 20:α) Σύγκριση ανάμεσα στην κατεργασία με το έκδοχο (DMSO) και την 4-υδροξυταμοξιφαίνη, β) Σύγκριση ανάμεσα στις μονές κατεργασίες και στους συνδυασμούς της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX4720, γ) Σύγκριση ανάμεσα στις μονές κατεργασίες και στους συνδυασμούς της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX8394, δ) Σύγκριση ανάμεσα στις μονές κατεργασίες και στους συνδυασμούς της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX7904. *$p<0.05$ σε σχέση με την μονοκατεργασία με τον εκάστοτε BRAF αναστολέα.

εμφανίζεται μία μείωση της S φάσης, όπως και στην περίπτωση της μονής κατεργασίας με 4-υδροξυταμοξιφαίνη. Ακόμη, υπάρχει μία αύξηση στην Sub-G0 και G0/G1 και στις δύο συγκεντρώσεις, ενώ η G2/M βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα σε σχέση με αυτά του DMSO, αλλά μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά της κατεργασίας με PLX4720. Στην περίπτωση του συνδυασμού του PLX4720 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 3μM η μείωση του ποσοστού της S φάσης ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την μονή κατεργασία με το PLX4720, χωρίς να είναι αθροιστική.

Στην περίπτωση της κατεργασίας με PLX8394, η Sub-G0 είναι σταθερή στην μονή κατεργασία και αυξημένη στους συνδυασμούς με 4-υδροξυταμοξιφαίνη. Ακόμη, σημειώνεται σημαντική αύξηση στην G0/G1 και στην μονοθεραπεία με PLX8394 και στους συνδυασμούς του PLX8394 με 4-υδροξυταμοξιφαίνη 3μM και 5μM σε σχέση με το DMSO, και μείωση στα επίπεδα της S που φαίνεται να εντείνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της 4-υδροξυταμοξιφαίνης. Επιπλέον, βλέπουμε μια μικρή μείωση στην G2/M στην περίπτωση του συνδυασμού του PLX8394 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 3μM, αλλά αύξηση της όταν αυτό συνδυάζεται με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 5μM, ενώ παραμένει σταθερή στην μονή κατεργασία με το PLX8394. Στην προκειμένη δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αλλαγή ανάμεσα στο PLX8394 και τους συνδυασμούς του με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη.

Τέλος, κατά τη κατεργασία με το PLX7904 καταδείχθηκε πολύ μεγάλη παύση στην G0/G1 και μικρότερη δράση στον συνδυασμό με τα 3μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης, ενώ στα 10μM δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε σχέση με το DMSO. Η Sub-G0 στην μονή κατεργασία με PLX7904 και στον συνδυασμό του με 4-υδροξυταμοξιφαίνη 3μM ήταν παρόμοια με του DMSO και αυξημένη στην περίπτωση του συνδυασμού του με 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα 5μM. Η S φάση ήταν μειωμένη σε παρόμοιο βαθμό και στις τρεις κατεργασίες σε σχέση με το DMSO. Τέλος, η M φάση έχει επηρεαστεί άστατα, με μία τάση μείωσης να παρατηρείται στην μονοκατεργασία ενώ στους συνδυασμούς παρουσιάζεται αυξημένη. Εξ άλλου στατιστικά σημαντική αύξηση στην G2/M παρατηρήθηκε στον συνδυασμό PLX7904 με 4-υδροξυταμοξιφαίνη 3μM σε σχέση με την μονοκατεργασία με PLX7904.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ BRAF ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Σήμερα, τα Vemurafenib, Encorafenib και Dabrafenib έχουν εγκριθεί από τον FDA για την θεραπεία του BRAFV600E μελανώματος (Zaman, et al., 2019). Παρόλη την αρχική τους επιτυχία, μελλοντικά μπορεί να οδηγήσουν σε αντίσταση στην θεραπεία εξαιτίας της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού (Zaman, et al., 2019). Εκτός αυτού, οι παράγοντες αυτοί δεν είναι ιδιαίτερα επιτυχημένοι για την θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου (Corcoran, et al., 2012), (Zaman, et al., 2019). Γι'αυτό οι προσπάθειες έχουν στραφεί είτε προς την ανάπτυξη παραγόντων που δεν οδηγούν στην παράδοξη ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού, τους λεγόμενους BRAF paradox breakers (όπως είναι τα PLX7904 και PLX8394) είτε προς τις συνδυαστικές θεραπείες που θα αναλυθούν σε επόμενο υποκεφάλαιο (Koumaki, et al., 2021).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία οι BRAF αναστολείς Encorafenib, Dabrafenib, PLX4720, PLX7904 και PLX8394 μελετήθηκαν ως προς την επίδραση τους στις καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου HT-29, COLO-205 και RKO που φέρουν τη BRAFV600E μετάλλαξη καθώς και στην σειρά του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 που φέρει την BRAFG464V μετάλλαξη.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι όλοι οι BRAF αναστολείς μειώνουν σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα σε όλες τις καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (HT-29, COLO-205, RKO) με σειρά δραστικότητας: Encorafenib≈Dabrafenib>PLX8394≈PLX7904 (paradox breakers)> PLX4720 (ανάλογο του Vemurafenib). Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι η πιο ευαίσθητη από τις σειρές του παχέος εντέρου είναι η COLO-205 και πιο ανθεκτική η RKO. Επιπλέον, όλοι οι αναστολείς, εκτός του PLX7904, οδήγησαν σε μικρή αλλά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας της καρκινικής σειράς του μαστού MDA-MB-231. Η δράση των αναστολέων που στοχεύουν συγκεκριμένα την BRAFV600E μετάλλαξη, στα MDA-MB-231 κύτταρα που φέρουν την BRAFG464V και όχι την BRAFV600E μετάλλαξη είναι ένα ενδιαφέρον εύρημα που απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Η μελέτη της επίδρασης των αναστολέων στα επίπεδα της πρωτεΐνης pERK (μάρτυρας της σηματοδότησης του μονοπατιού BRAF/MEK/ERK) έδειξε ότι ο BRAF paradox breaker PLX8394 ήταν ο πιο αποτελεσματικός παράγοντας στην μείωση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της ERK, άρα και στην ενεργότητα του MAPK μονοπατιού. Στις σειρές HT-29 και COLO-205 ο λιγότερο αποτελεσματικός παράγοντας στην μείωση των επιπέδων της pERK ήταν το Dabrafenib ενώ στις RKO και MDA-MB-231 σειρές ήταν το PLX4720.

Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες. Η έρευνα των Whittaker et al. έδειξε ότι οι καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου είναι πιο ανθεκτικές στην θεραπεία με PLX4720 σε σχέση με τις σειρές μελανώματος (Whittaker, et al., 2015). Ακόμη, έδειξαν ότι τα COLO-205 ήταν η πιο ευαίσθητη σε θεραπεία σειρά σε σχέση με τις εξεταζόμενες και ότι τα RKO ήταν ανθεκτικά σε θεραπεία με PLX4720 (Whittaker, et al., 2015). Βέβαια, η ίδια μελέτη έδειξε μια σχεδόν πλήρη αναστολή της pERK στα COLO-205 έπειτα από θεραπεία με PLX4720, εν αντιθέσει με την δική μας μελέτη όπου βρέθηκε μόνο αναστολή κατά το ήμισυ στα επίπεδα της (Whittaker, et al., 2015). Επίσης, στα RKO οι Whittaker et al. κατέγραψαν μεγάλη αναστολή της pERK σε συγκέντρωση 3μM PLX4720 τις πρώτες 1-2 ώρες που ακολούθησαν την θεραπεία, όμως τα επίπεδα επέστρεψαν περίπου στο 50% έπειτα από 24 ώρες, ομοιάζοντας τα αποτελέσματα που βρήκαμε εμείς στις 24 ώρες με συγκέντρωση 1μM PLX4720 (Whittaker, et al., 2015). Επιπλέον, η έρευνα των Yang et al. έδειξε ότι η COLO-205 είναι σχετικά ευαίσθητη σειρά σε θεραπεία με Vemurafenib (ανάλογο του PLX4720), ενώ η ευαισθησία των HT-29 κυμαίνεται σε μέτρια επίπεδα (Yang, et al., 2012). Ακόμη, βρήκαν τα RKO ανθεκτικά στην θεραπεία με Vemurafenib και όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα αλλά και με βάση την ικανότητα αναστολής της pERK (Yang, et al., 2012). Επιπλέον τα αποτελέσματα μας για την επίδραση της βιωσιμότητας των HT-29 και RKO κυττάρων έπειτα από θεραπευτικό χειρισμό με Encorafenib συμφωνούν με τα ευρήματα των Li et al. (Li, et al., 2019). Επιπροσθέτως, η έρευνα των Koumaki et al. έδειξε ότι οι paradox breakers PLX7904 και PLX8394 σε συγκέντρωση 1μM ήταν πιο αποτελεσματικοί στην μείωση της βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών HT-29, COLO-205 και RKO σε σχέση με το PLX4720 ίδιας συγκέντρωσης, με την διαφορά όμως να είναι πιο σημαντική στις HT-29 και RKO σειρές ενώ στην εγγενώς πιο ευαίσθητη σειρά COLO-205 ήταν μικρή, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα μας (Koumaki, et al., 2021). Παράλληλα, η μελέτη των επιπέδων pERK για τις RKO, HT-29 και COLO-205 σειρές έπειτα από χειρισμό με τα PLX4720 και PLX8394 κατέληξε σε παρόμοια συμπεράσματα με τα δικά μας (Koumaki, et al., 2021).

Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα HT-29 έπειτα από επίδραση των BRAF αναστολέων PLX4720, PLX7904 και PLX8394 έδειξε αυξημένα ποσοστά της G0/G1 φάσης λόγω αύξησης του ποσοστού των κυττάρων που επέδειξαν παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0/G1, σε σχέση με το έκδοχο. Οι paradox breakers PLX7904 και PLX8394 φάνηκαν να είναι πιο αποτελεσματικοί στην επιβολή της παύσης του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με το PLX4720. Παρόλα αυτά, το PLX4720 κατάφερε να αυξήσει το ποσοστό των κυττάρων στην Sub-G0 φάση, που αναλογεί στο ποσοστό των κυτταρικών θραυσμάτων που ανευρέθηκαν, σε σχέση με τους PLX7904 και PLX8394 αναστολείς, που δεν επέδειξαν αλλαγή στην Sub/G0 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Ακόμη, οι φάσεις S και G2/M σε ορισμένες περιπτώσεις έμειναν σταθερές ενώ σε άλλες μειώθηκαν σε ένα βαθμό.

Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου στην μελέτη των Koumaki et al., υποστηρίζει τα ευρήματα μας περί αυξημένης G0/G1 φάσης έπειτα από χειρισμό των HT-29 με PLX4720, PLX7904 και PLX8394, με μεγαλύτερη παύση του κυτταρικού κύκλου όμως να σημειώνεται στις περιπτώσεις των paradox breakers (Koumaki, et al., 2021). Επίσης, η ίδια μελέτη επιβεβαιώνει την μείωση της S φάσης στις περιπτώσεις των χειρισμών με PLX7904 και PLX8394 (Koumaki, et al., 2021). Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη μας δεν σημείωσε κάποια σημαντική αύξηση στην Sub-G0 φάση για τα PLX7904 και PLX8394, εν αντιθέσει με την έρευνα των Koumaki et al. (Koumaki, et al., 2021). Ωστόσο, η εν λόγω μελέτη έγινε με επώαση 24 ωρών των κυττάρων στους παράγοντες, ενώ στην παρούσα εργασία η επώαση ήταν 72 ωρών.

4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 4-ΥΔΡΟΞΥΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Παράλληλα με τα παραπάνω, σε ανάλογα πειράματα ελέγθηκε η επίδραση της 4-υδροξυταμοξιφαίνης που είναι ανάλογο της ταμοξιφαίνης, ενός επιλεκτικού τροποποιητή του υποδοχέα οιστρογόνων που χρησιμοποιείται στην κλινική για τη θεραπεία του ERα-θετικού καρκίνου του μαστού. Σημαντική μείωση της βιωσιμότητας παρατηρήθηκε μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις 4-υδροξυταμοξιφαίνης (5 μM και 10 μM) και για τις τρεις καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου. Πιο ευαίσθητη φάνηκε να είναι η κυτταρική σειρά HT-29. Όσον αφορά τη σειρά καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, μόνο η υψηλότερη συγκέντρωση 4-υδροξυταμοξιφαίνης (10 μM) οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας. Το εύρημα αυτό

είναι σε συμφωνία με την απουσία έκφρασης του ERα (στόχος της ταμοξιφαίνης στον ERα-θετικό καρκίνο του μαστού) στα MDA-MB-231.

Ανάλυση των επιπέδων της pERK έδειξε ότι η 4-υδροξυταμοξιφαίνη μείωσε τα επίπεδα της στις σειρές HT-29 και COLO-205 ενώ δεν είχε αξιοσημείωτη δράση στις σειρές RKO και MDA-MB-231. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω FACS στη σειρά HT-29, έδειξε ότι η 4-υδροξυταμοξιφαίνη οδήγησε σε αύξηση των Sub-G0, G0/G1 και G2/M φάσεων σε σχέση με το έκδοχο, και μείωσε την S φάση.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, προηγούμενες μελέτες στα MDA-MB-231 υποστήριξαν ότι η ταμοξιφαίνη στα 1μM και 5μM δεν επηρεάζει σημαντικά την βιωσιμότητα των κυττάρων (Aoyama, 2002). Αντίθετα, η μελέτη των Nigam et al. στα ίδια κύτταρα έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και σε συγκεντρώσεις 1μM και 5μM (Nigam, et al., 2008). Οι διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (όπως ο χρόνος επώασης με την ταμοξιφαίνη) θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει τις παραπάνω διαφορές. Ακόμη, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ταμοξιφαίνη μειώνει τη βιωσιμότητα των HT-29 με τρόπο εξαρτώμενο από την δόση και την διάρκεια της κατεργασίας και οδηγεί σε μικρή αύξηση στο ποσοστό της Sub-G0 φάσης (Fang, et al., 2008) σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η βιωσιμότητα της καρκινικής σειράς παχέος εντέρου HCT15 που εκφράζει BRAFwt αλλά όχι ERα μειώθηκε μόνο μετά από κατεργασία με 10 μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης (Gu, et al., 1999). Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα δικά μας αποτελέσματα, υποδηλώνουν ότι η δράση της ταμοξιφαίνης διαμεσολαβείται με τρόπο ανεξάρτητο από τον ERα.

Για την διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της ταμοξιφαίνης απαιτείται προσεκτική μελέτη του προφίλ έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ στις υπό έλεγχο καρκινικές κυτταρικές σειρές. Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι τα MDA-MB-231 είναι ERα(-) και ERβ(+) (Neubauer, et al., 2009). Έχει αναφερθεί ότι τα COLO-205 είναι επίσης ERα(-) και ERβ(+) (Mahbub, 2022). Σχετικά με το προφίλ έκφρασης των ERα και ERβ των HT-29, αυτά φαίνονται να είναι ERβ(+) ενώ τα αποτελέσματα για την έκφραση του ERα είναι αντικρουόμενα (Mahbub, 2022). Για τα RKO δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή δεδομένα όσον αφορά την έκφραση των δύο υποδοχέων. Η πληροφορία του προφίλ της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων σε

αυτές τις σειρές ίσως είναι το κλειδί για την εξήγηση της αυξημένης απόκρισης τους στον χειρισμό με 4-υδροξυταμοξιφαίνη. Η παρουσία του ERβ σε αυτές τις κυτταρικές σειρές θα μπορούσε να διαμεσολαβεί την δράση της ταμοξιφαίνης αλλά απαιτείται ενδελεχής μελέτη προκειμένου να ταυτοποιηθεί η έκφραση των ισομορφών του ERβ δεδομένου ότι μόνο η ισομορφή ERβ1 έχει την ικανότητα να συνδέει ταμοξιφαίνη (Leung, et al., 2006).

4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΩΝ BRAF ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ 4-ΥΔΡΟΞΥΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η BRAFV600E είναι μία μετάλλαξη οδηγός που εμφανίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεταξύ άλλων και στο μελάνωμα και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Whittaker, et al., 2015). Παρόλη την αρχική επιτυχία των αναστολέων που στοχεύουν την BRAFV600E μετάλλαξη στο μελάνωμα, οι αναστολείς αυτοί δεν είναι αποτελεσματικοί στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Whittaker, et al., 2015). Παράλληλα, σε αρκετές περιπτώσεις προκύπτουν προβλήματα επίκτητης ανοσίας όπου το MAPK μονοπάτι επανενεργοποιείται (BRAF paradox) μέσω διαφόρων μηχανισμών (Whittaker, et al., 2015). Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, πολλές προσπάθειες έχουν στραφεί στις συνδυαστικές θεραπείες, όπου σε κάποιες περιπτώσεις έχουν αποβεί επιτυχημένες, με το πιο επιτυχημένο παράδειγμα να είναι ο συνδυασμός των Encorafenib και Cetuximab, ο οποίος έλαβε έγκριση από τον FDA για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Ciombor, et al., 2022). Από την άλλη, η ταμοξιφαίνη έχει αποδειχτεί χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση του ERα+ καρκίνου του μαστού, αλλά δεν είναι αποτελεσματική στις περιπτώσεις των ERα- καρκίνου του μαστού (Aoyama, 2002). Ακόμη και στις περιπτώσεις των ERα+ καρκίνων μαστού, που ανταποκρίνονται στην ταμοξιφαίνη, συχνά αναπτύσσεται αντίσταση στην θεραπεία, με αποτέλεσμα να γίνονται προσπάθειες συνδυαστικών θεραπευτικών προσεγγίσεων με σκοπό την αντιμετώπιση των προαναφερθέντων προβλημάτων (Yip et al., 2021).

Η μελέτη της επίδρασης των συνδυασμών των BRAF αναστολέων με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα HT-29 έδειξε ότι ο συνδυασμός του PLX7904 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη οδήγησε σε αθροιστική δράση σε σχέση με τις μονές κατεργασίες. Στη σειρά COLO-205 ο συνδυασμός του PLX4720 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη οδήγησε σε μείωση στην βιωσιμότητα των κυττάρων που ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την κατεργασία

μόνο με PLX4720. Όσον αφορά τη σειρά RKO, οι συνδυασμοί Encorafenib/PLX7904/PLX8394 με την 4-υδροξιταμοξιφαίνη, οδήγησαν σε μεγαλύτερη στατιστικά σημαντική αλλά όχι αθροιστική μείωση της βιωσιμότητας σε σχέση και με τις δύο μονές κατεργασίες. Τέλος, όσον αφορά τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων MDA-MB-231, ο συνδυασμός PLX7904 και 4-υδροξυταμοξιφαίνης έφερε συνεργιστική μείωση, ξεπερνώντας κατά 15% το άθροισμα της επίδρασης των δύο μεμονομένων παραγόντων. Επίσης, ο συνδυασμός PLX8394 και 4-υδροξυταμοξιφαίνης οδήγησε σε ένα στατιστικά καλύτερο αποτέλεσμα σε σχέση με τις δύο μονές κατεργασίες στα MDA-MB-231, χωρίς όμως να είναι αθροιστικό. Ακόμη, οι συνδυασμοί PLX4720/PLX8394 με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη στα MDA-MB-231 απέδωσαν ένα αθροιστικό αποτέλεσμα, στατιστικά σημαντικό μόνο σε σχέση με το έκδοχο και ο συνδυασμός του Dabrafenib με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη επέφερε ένα αθροιστικό αποτέλεσμα, στατιστικά σημαντικό σε σχέση μόνο με το Dabrafenib.

Ανάλυση κυτταρικού κύκλου μέσω FACS στα κύτταρα HT-29 έδειξε ότι ο συνδυασμός της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX4720 οδήγησε σε μείωση της S φάσης, παρόμοια με αυτή που επέφερε η κατεργασία μόνο με 4-υδροξυταμοξιφαίνη, και σε αύξηση των Sub-G0 και G0/G1 φάσεων σε σχέση με το έκδοχο. Η μείωση της S φάσης ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το PLX4720. Όσον αφορά τον συνδυασμό της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX7904, το σημείο που παρουσίασε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ήταν η στατιστικά σημαντική αύξηση της G2/M φάσης στην κατεργασία PLX7904 και 3μM 4-υδροξυταμοξιφαίνης σε σχέση με την κατεργασία μόνο με το PLX7904. Τέλος, σε ότι αφορά τους συνδυασμούς της 4-υδροξυταμοξιφαίνης με το PLX8394 δεν παρατηρήθηκε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε σχέση με τις μονές κατεργασίες.

Εν κατακλείδει, φαίνεται ότι οι συνδυασμοί των BRAF αναστολέων με την 4-υδροξυταμοξιφαίνη αποφέρουν σε ορισμένες περιπτώσεις ενδιαφέροντα αποτελέσματα και σε πολλά σημεία σημειώθηκαν αθροιστικές επιδράσεις στην βιωσιμότητα. Το σημαντικότερο ίσως εύρημα της παρούσας εργασίας είναι το συνεργιστικό αποτέλεσμα που απέφερε ο συνδυασμός PLX7904 και 4-υδροξιταμοξιφαίνη στα MDA-MB-231, καθώς καμία κατεργασία από μόνη της από δεν οδήγησε σε σημαντική δράση. Σημαντικό ήταν επίσης το εύρημα ότι στα HT-29 οι συνδυασμοί PLX4720 με 4-υδροξυταμοξιφαίνη και PLX7904 με 4-υδροξυταμοξιφαίνη επηρέαζαν σημαντικά τις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου αντίστοιχα, σε σύγκριση με

τις μονές κατεργασίες με τον εκάστοτε BRAF αναστολέα. Με βάση τα παραπάνω απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί η δυναμική των συνδυασμών αυτών σε διαφορετικές συνθήκες, κυτταρικές σειρές και ίσως σε ζωικά μοντέλα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ali, S., Rasool, M., Chaoudhry, H., N Pushparaj, P., Jha, P., Hafiz, A., Mahfooz M., Abdus Sami G., Azhar Kamal M., Bashir S., Ali A., Sarwar Jamal, M. (2016). Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation, 12*, 135-139. doi:10.6026/97320630012135

Aoyama, Y. (2002). Experimental studies on the effects of the combined use of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) and tamoxifen (TAM) for estrogen receptor (ER)-negative breast cancer. *The Kurume Medical Journal, 49*, 27-33. doi:10.2739/kurumemedj.49.27

Ciombor, K. K., Strickler, J. H., Bekaii-Saab, T. S., & Yaeger, R. (2022). BRAF-Mutated Advanced Colorectal Cancer: A Rapidly Changing Therapeutic Landscape. *Journal of Clinical Oncology, 40*, 2706-2715. doi:10.1200/JCO.21.02541

Corcoran, R. B., Hiromichi, E., Turke, A. B., Coffee, E. M., Nishino, M., Cogdill, A. P., Brown R. D., Della Pelle P., Dias-Santagata D., Hung K. E., Flaherty K. T., Piris A., Wargo J. A., Settleman J., Mino-Kenudson M., Engelman, J. A. (2012). EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discovey, 2*(3), 227-235. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0341

Ditonno, I., Losurdo, G., Rendina, M., Pricci, M., Girardi, B., Ierardi, E., & Di Leo, A. (2021). Estrogen Receptors in Colorectal Cancer: Facts, Novelties and Perspectives. *Current Oncology, 28*(6), 4256-4263. doi:10.3390/curroncol28060361

Fang, Y.-J., Wang, G.-Q., Lu, Z.-H., Zhang, L.-Y., Pan, Z.-Z., Zhou, Z.-W., & Wan, D.-S. (2008). Effects of tamoxifen on apoptosis and matrix metalloproteinase-7 expression in estrogen receptor β-positive colorectal cancer cell line HT-29. *Chinese Journal of Cancer, 27*(11), 428-431.

Gu, W.-Z., Chen, Z., Tahir, S. K., Rosenberg, S. H., & Ng, S.-C. (1999). Synergistic effect of paclitaxel and 4-hydroxytamoxifen on estrogen receptor-negative colon cancer and lung cancer cell lines. *Anticancer Drugs, 10*(10), 895-901. doi:10.1097/00001813-199911000-00005

Hases, L., Indukuri, R., Birgersson, M., Nguyen-Vu, T., Lozano, R., Saxena, A., Hartman J., Frasor J., Gustafsson J. Å., Katajisto P., Archer A., Williams, C. (2020). Intestinal

estrogen receptor beta suppresses colon inflammation and tumorigenesis in both sexes. *Cancer Letters, 492*, 54-62. doi:10.1016/j.canlet.2020.06.021

Hsu, L.-H., Chu, N.-M., Lin, Y.-F., & Kao, S.-H. (2019). G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences, 20*(2), 306. doi:10.3390/ijms20020306

Kong , Y., Kumar, S. M., & Xu, X. (2010). Molecular Pathogenesis of Sporadic Melanoma and Melanoma-Initiating Cells. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 134*(12), 1740-9. doi:10.5858/2009-0418-RAR.1

Koumaki, K., Kontogianni, G., Kosmidou, V., Pahitsa, F., Kritsi, E., Zervou, M., Chatziioannou A., Souliotis V. L., Papadodima O., Pintzas, A. (2021). BRAF paradox breakers PLX8394, PLX7904 are more effective against BRAFV600E CRC cells compared with the BRAF inhibitor PLX4720 and shown by detailed pathway analysis. *BBA-Molecular Basis of Disease, 1867*(4). doi:10.1016/j.bbadis.2020.166061

Lee, W.-L., Cheng, M.-H., Chao, H.-T., & Wang, P.-H. (2008). The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifen. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 47*, 24-31. doi:10.1016/S1028-4559(08)60051-0

Leung, Y.-K., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S.-M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, 103*(35). doi:10.1073/pnas.0605676103

Li, J., & Li, X. (2019). Encorafenib inhibits migration, induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry, 459*, 113-120. doi:10.1007/s11010-019-03554-3

Li, Z., Wang, N., Fang, J., Huang, J., Tian, F., Li, C., & Xie, F. (2012). Role of PKC-ERK signaling in tamoxifen-induced apoptosis and tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Oncology Reports, 27*, 1879-1886. doi:10.3892/or.2012.1728

Lito, P., Pratilas, C. A., Joseph, E. W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang A., Wong W. L., Callahan M. K., Merghoub T., Wolchok J. D., de Stanchina E., Chandarlapaty S., Poulikakos P. I., Fagin J. A., Rosen, N. (2012). Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell, 22*(5), 668-682. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.009

Mahbub, A. A. (2022). Therapeutic Strategies and Potential Actions of Female Sex Steroid Hormones and Their Receptors in Colon Cancer Based on Preclinical Studies. *Life, 12*(4). doi:10.3390/life12040605

Maingi, J., Tang, S., Liu, S., Ngenya, W., & Bao, E. (2020). Targeting estrogen receptors in colorectal cancer. *Molecular Biology Reports, 47*, 4087-4091. doi:10.1007/s11033-020-05414-6

Manohar, P. M., & Davidson, N. E. (2021). Updates in endocrine therapy for metastatic breast cancer. *Cancer Biology & Medicine, 19*, 202-212. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0255

Meligova, A. K., Siakouli, D., Stasinopoulou, S., Xenopoulou, D. S., Zoumpouli, M., Ganou, V., Gkotsi E. F., Chatziioannou A., Papadodima O., Pilalis E., Alexis M. N., Mitsiou, D. J. (2023). ERβ1 Sensitizes and ERβ2 Desensitizes ERα-Positive Breast Cancer Cells to the Inhibitory Effects of Tamoxifen, Fulvestrant and their Combination with All-Trans Retinoic Acid. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(4), 3747. doi:10.3390/ijms24043747

Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics, 13*, 339-354. doi:10.1016/j.cpet.2018.02.006

Neubauer, H., Ruoff, A., Paessler, N., Solomayer, E., Wallwiener, D., & Fehm, T. (2009). A laminin-rich basement membrane matrix influences estrogen receptor beta expression and morphology of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncology Reports, 21*(2), 475-81.

Nigam, M., Ranjan, V., Srivastava, S., Sharma, R., & Balapure, A. K. (2008). Centchroman induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis involving mitochondrial membrane depolarization in MCF-7 and παχε-231 human breast cancer cells. *Life Sciences, 82*(11-12), 577-90. doi:10.1016/j.lfs.2007.11.028

Niv, Y. (2015). Estrogen receptor β expression and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 27*, 1438-1442. doi:10.1097/MEG.0000000000000471

Pircher, M., Winder, T., & Trojan, A. (2021). Response to Vemurafenib in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Harbouring a BRAF V600E Mutation: A Case Report and Electronically Captured Patient-Reported Outocome. *Case Report Oncology, 14*, 616-621. doi:10.1159/000513905

Punt, C. J., Koopman, M., & Vermeulen, L. (2017). From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology, 14*(4), 235-246. doi:10.1038/nrclinonc.2016.171

Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T., & Levin, E. R. (2003). Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen. *Journal of Biological Chemistry, 278*, 2701-2712. doi:10.1074/jbc.M205692200

Rocca, A., Braga, L., Volpe, M., Maiocchi, S., & Generali, D. (2022). The Predictive and Prognostic Role of RAS-RAF-MEK-ERK Pathway Alterations in Breast Cancer: Revision of the Literature and Comparison with the Analysis of Cancer Genomic Datasets. *Cancers (Basel), 14*(21). doi:10.3390/cancers14215306

Rusidzé, M., Adlanmérini, M., Chantalat, E., Raymond-Letron, I., Cayre, S., Arnal, J.-F., Deugnier M. A., Lenfant, F. (2021). Estrogen receptor-α signaling in post-natal mammary development and breast cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences, 78*, 5681-5705. doi:10.1007/s00018-021-03860-4

Tao, J. J., Visvanathan, K., & Wolff, A. C. (2015). Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast, 24*(0 2), 149-53. doi:10.1016/j.breast.2015.07.035

Topi, G., Satapathy, S., Dash, P., Fred Mehrabi, S., Ehrnström, R., Olsson, R., Lydrup M. L., Sjölander, A. (2020). Tumour-suppressive effect of oestrogen receptor β in colorectal cancer patients, colon cancer cells, and a zebrafish model. *Journal of Pathology, 251*, 297-309. doi:10.1002/path.5453

Wang, L., Lu, Q., Jiang, R., Wang, S., & Xu, F. (2022). BRAF V600E Mutation in Triple-Negative Breast Cancer: A Case Report and Literature Review. *Oncology Reasearch and Treatment, 45*, 54-60. doi:10.1159/000520453

Whittaker, S. R., Cowley, G. S., Wagner, S., Luo, F., Root, D. E., & Garraway, L. A. (2015). Combined Pan-RAF and MEK Inhibition Overcomes Multiple Resistance Mechanisms to Selective RAF Inhibitors. *Molecular Cancer Therapy, 14*(12), 2700-11. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0136-T

Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Bradley, W. D., Lee, R. J., Schostack K., Simcox M. E., Kopetz S., Heimbrook D., Lestini B., Bollag G., Su, F. (2012). Antitumor

activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Research, 72*(3), 779-89. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2941

Yip, H., & Papa, A. (2021). Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. *Cells, 10*(3), 659. doi:10.3390/cells10030659

Zaman, A., Wu, W., & Bivona, T. G. (2019). Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. *Cancers, 11*(8), 1197. doi:10.3390/cancers11081197

Zhang, C., Wayne, S., Zhang, Y., Burton, E. A., Ma, Y., Habets, G., Zhang J., Lin J., Ewing T., Matusow B., Tsang G., Marimuthu A., Cho H., Wu G., Wang W., Fong D., Nguyen H., Shi S., Womack P., Nespi M., Shellooe R., Carias H., Powell B., Light E., Sanftner L., Walters J., Tsai J., West B. L., Visor G., Rezaei H., Lin P. S., Nolop K., Ibrahim P. N., Hirth P., Bollag, G. (2015). RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature, 526*, 583-586. doi:10.1038/nature14982

Zhou, Y., & Liu, X. (2020). The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomarker Research, 8*. doi:10.1186/s40364-020-00223-2