



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση της αναστολής της PDK1 στην αύξηση των ανθρώπινων
καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231»

Στεργίου Κωνσταντίνα Δομνίκη, του Γεωργίου

Λάρισα, 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

BACHELOR THESIS

“The effect of PDK1 inhibition on the growth of human
MDA-MB-231 cancer cells”

Stergiou Konstantina Domniki

Larissa, 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Ψαρρά Άννα –Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπουσα)

Μπαλατσός Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Καρκίνος.....	9
1.2 Ορόσημα Καρκίνου	10
1.3 Καρκίνος του Μαστού	11
1.3.1 Μαστός- Ανατομία και δομή.....	12
1.3.2 Επιδημιολογία καρκίνου του μαστού	13
1.3.3 Τύποι καρκίνου του μαστού.....	14
1.3.4 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού	17
1.3.5 Διάγνωση και θεραπεία καρκίνου του μαστού	22
1.4 PDK1 και καρκίνος.....	24
1.4.1 PDK1	24
1.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκεται η PDK1	26
1.5 Στόχευση της PDK1	29
1.5.1 Φαρμακολογικοί αναστολείς της PDK1	29
1.5.2 Μετα-μεταγραφική αποσιώπηση με τη χρήση siRNA	32
1.5 ΣΚΟΠΟΣ	33
2. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
2.1 Αναλώσιμα	34
2.2 Κυτταρική σειρά.....	36
2.3 Συνθήκες Καλλιέργειας	36
2.4 Κανόνες Υγιεινής	37
2.5 Ανανέωση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.....	38
2.6 Ανακαλλιέργεια/Θρυψινοποίηση	38
2.7 Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων	39
2.8 Απόψυξη κυττάρων.....	40
2.9 Κατάψυξη κυττάρων.....	41
2.10 Μέθοδος Κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB (SRB Assay).....	41
2.11 Μέθοδος Ελέγχου Επούλωσης Πληγών (Wound Healing Assay)	44
2.12 Πρωτόκολλο αποσιώπησης της PDK1 στην σειρά MDA-MB-231.....	46
2.13 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	49
2.13.1 Αρχή της Μεθόδου	50
2.14 Έλεγχος Βιωσιμότητας	58
2.15 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.....	59
2.15.1 Κυτταρικός κύκλος	59
2.15.2 Κυτταρομετρία ροής.....	60

2.16 Στατιστική ανάλυση.....	65
3. Αποτελέσματα.....	66
3.1 Αποτελέσματα SRB	66
3.2 Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay/scratch assay)	68
3.3 Αποτελεσματικότητα αποσιώπησης της PDK1 βάσει των αποτελεσμάτων της Western Blot.....	71
3.4 Αποτελέσματα μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων μετά από χορήγηση αναστολέα ή αποσιώπησης της PDK1	72
3.4.1 Αποτελέσματα βιωσιμότητας έπειτα από χορήγηση BX-912.....	72
3.4.2 Αποτελέσματα βιωσιμότητας έπειτα από αποσιώπηση της PDK1 με siRNA	74
3.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο κυτταρικού θανάτου στα αποσιωπημένα κύτταρα για την PDK1 MDA-MB-231	76
3.6 Αποτελέσματα Κυτταρομετρίας Ροής	77
3.6.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής μετά από χορήγηση αναστολέα.....	78
3.6.2 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής μετά από αποσιώπηση της PDK1 με siRNA.....	79
4. Συμπεράσματα- Συζήτηση.....	82
5. Βιβλιογραφία	85

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας κλείνει για εμένα ένας μεγάλος και όμορφος κύκλος, που ελπίζω να σηματοδοτεί την αρχή ενός νέου, ακόμα μεγαλύτερου. Ωστόσο, το ταξίδι αυτό δεν ήταν μία ευθεία ανοδική διαδρομή, μάλλον θα περιγραφόταν καλύτερα ως κύμα, με τα σκαμπανεβάσματά της και τις προκλήσεις της, τις οποίες με χαρά αποδέχτηκα και έφερα εις πέρας. Δεν ήμουν μόνη μου όμως. Επομένως, οφείλω μερικά ευχαριστώ.

Η διπλωματική μου εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. Δήμα Κωνσταντίνου. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Δήμα, αρχικά που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και αφετέρου, που με ενδιαφέρον και κατανόηση αφουγκράστηκε τα ενδιαφέροντα μου και μου ανέθεσε αυτό το θέμα. Επίσης τον ευχαριστώ ειλικρινά για την καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για τις συμβουλές του, που αποτέλεσαν κατευθυντήριες για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία και τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Αναπληρωτές Καθηγητές Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που δέχτηκαν με χαρά να γίνουν μέλη της τριμελούς μου επιτροπής και για την άψογη συνεργασία τους.

Ακολουθώντας, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας των οποίων η βοήθεια και οι συμβουλές υπήρξαν πολύτιμες. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως θερμά την υποψήφια διδάκτορα, Αλεξοπούλου Δήμητρα, που με καθοδήγησε και με στήριξε στην διαδικασία των πειραμάτων από την πρώτη στιγμή, και κυρίως για την υπομονή, την καλή διάθεση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Η συνεισφορά της ήταν καθοριστική για την ομαλή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Ευαγγελία Παπαδογιάννη, Φανή Κουτσουγιάννη και Κωνσταντίνο Λαφαζάνη για τον χρόνο και τις συμβουλές τους. Επιπλέον, ευχαριστώ τον επιστημονικό συνεργάτη κ. Ηλία Μπέγα, καθώς και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Ιωάννα Καραγιαννάκη και Μαρία Χριστίνα Δημητρίου για την αρμονική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα μεταξύ μας στο εργαστήριο.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην μητέρα μου για την ακλόνητη πίστη της σε εμένα και η οποία έγινε στήριγμα και σκαλοπάτι σε κάθε δυσκολία, στεκόμενη δίπλα μου, όχι μόνο κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου, αλλά σε όλη την διαδρομή μου που οδήγησε σε αυτή. Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την υπόλοιπη οικογένειά μου και τους φίλους μου χωρίς τους οποίους, το ταξίδι αυτό σίγουρα δεν θα ήταν το ίδιο.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η *in vitro* μελέτη της επίδρασης της αναστολής της PDK1 στην αύξηση της κυτταρικής σειράς τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, MDA-MB-231. Η αναστολή αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο φαρμακολογικά, με χορήγηση του αναστολέα BX-912, όσο και μετα-μεταγραφικά μέσω τεχνολογίας παρεμβολής RNA (RNAi) με τη χρήση ειδικού siRNA για την PDK1 με στόχο την αποσιώπηση της πρωτεΐνης στα κύτταρα.

Στα πλαίσια των πειραμάτων, αρχικά πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας SRB μέσω της οποίας αξιολογήθηκε η επίδραση τεσσάρων ειδικών αναστολέων για την PDK1 (BX-517, BX-912, GSK2334470, PDK1-IN-RS2) στο ρυθμό ανάπτυξης των MDA-MB-231, εκ των οποίων ο BX-912 αναδείχθηκε ως ο πιο αποτελεσματικός. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών, ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση του αναστολέα στη μεταναστευτική ικανότητα των MDA-MB-231. Ακολούθως, επιχειρήθηκε η αποσιώπηση της PDK1 μέσω μετα-μεταγραφικής παρέμβασης με ειδικό siRNA, ενώ η αποτελεσματικότητα της σίγησης επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot. Με την ίδια μέθοδο, διερευνήθηκε η ενδεχόμενη ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού μέσω ανάλυσης της έκφρασης της κασπάσης-3 στα αποσιωπημένα για την PDK1 κύτταρα.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η κυτταρική βιωσιμότητα υπό δύο συνθήκες: (1) φαρμακολογική αναστολή με BX-912 και (2) μετα-μεταγραφική σίγηση με siRNA. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής, υπό τις ίδιες συνθήκες, με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της αναστολής της PDK1 στην πρόοδό του. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω πειραματικές διεργασίες, η φαρμακολογική αναστολή με τον BX-912 εμφάνισε ισχυρή αντικαρκινική δράση, περιορίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού MDA-MB-231. Ωστόσο, η μετα-μεταγραφική σίγηση της PDK1 με siRNA παρουσίασε ισχυρότερη επίδραση, με σαφή μείωση της κυτταρικής επιβίωσης ενδεχομένως μέσω μερικής ενεργοποίησης του μονοπατιού απόπτωσης. Επιπλέον, και στις δυο περιπτώσεις στόχευσης της PDK1 παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M των κυττάρων.

Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η PDK1 αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης της χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Λέξεις-κλειδιά: BX-912, PDK1, τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού, αναστολείς PDK1, MDA-MB-231, μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, μονοπάτι Ras/MAPK

Abstract

The purpose of the present thesis is the in vitro investigation of the effect of PDK1 inhibition on the proliferation of the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231. This inhibition was achieved both pharmacologically, by administering the inhibitor BX-912, and posttranscriptionally using RNA interference (RNAi) technology with a specific siRNA targeting PDK1, aiming to silence the protein in the cells.

As part of the experiments, a cytotoxicity assay (SRB) was initially performed to evaluate the effect of four specific PDK1 inhibitors (BX-517, BX-912, GSK2334470, PDK1-IN-RS2) on the growth rate of MDA-MB-231 cells, among which BX-912 emerged as the most effective. Subsequently, a wound healing assay was conducted to assess the effect of the inhibitor on the migratory capacity of MDA-MB-231 cells. Next, PDK1 silencing was attempted via posttranscriptional intervention with specific siRNA, and the efficiency of the knockdown was confirmed by Western blot immunodetection. Using the same method, potential activation of the apoptotic pathway was investigated by analyzing the expression of caspase-3 in the PDK1silenced cells.

Cell viability was then examined under two conditions: (1) pharmacological inhibition with BX-912 and (2) post-transcriptional silencing with siRNA. Finally, cell cycle analysis by flow cytometry was performed under the same conditions to explore the effect of PDK1 inhibition on its progression. Based on the results from these experimental procedures, pharmacological inhibition with BX-912 demonstrated strong anticancer activity, reducing both cell proliferation and migration in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells. However, posttranscriptional silencing of PDK1 with siRNA showed an even stronger effect, with a clear reduction in cell survival, possibly through partial activation of the apoptotic pathway. Furthermore, in both approaches targeting PDK1, a time-dependent cell cycle arrest at the G2/M phase was observed.

Overall, these findings indicate that PDK1 is a highly promising therapeutic target in triplenegative breast cancer, though its precise mechanism of action requires further investigation.

Keywords: BX-912, PDK1, triple-negative breast cancer, PDK1 inhibitors, MDA-MB-231, PI3K/Akt/mTOR pathway, Ras/MAPK pathway

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

Ο όρος καρκίνος περιγράφει ένα μεγάλο εύρος άνω των 277 τύπων ασθενειών και αποτελεί δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Παράλληλα με το πέρασ των χρόνων τα ποσοστά εμφάνισής του συνεχώς αυξάνονται, αγγίζοντας τα 14 εκατομμύρια νέα περιστατικά κάθε χρόνο παγκοσμίως. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει λαμβάνοντας υπόψιν τον σύγχρονο τρόπο ζωής, τις συνήθειες, αλλά και τη αύξηση του προσδόκιμου ζωής [1, 2, 3]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγάλη ποικιλομορφία του καρκίνου ως ασθένεια τόσο σε επίπεδο ιστού όσο και ανταπόκρισης στην θεραπεία, κάνει την διάγνωση και την αποτελεσματική θεραπεία του δύσκολη αυξάνοντας έτσι την θνησιμότητα [1, 2].

Οι όγκοι ταξινομούνται βάσει του ιστού προέλευσής τους και τους τύπους κυττάρων που τους συνιστούν. Η πλειοψηφία των διαφόρων τύπων καρκίνων ταξινομούνται σε μία από τις τρεις κύριες ομάδες, ανάλογα με το είδος των κυττάρων από τα οποία προέρχονται: καρκινώματα, σαρκώματα και λευχαιμίες/λεμφώματα. Τα καρκινώματα είναι κακοήθεις όγκοι που προέρχονται από επιθηλιακούς ιστούς και συνιστούν το 90% όλων των καρκίνων. Τα σαρκώματα είναι πιο σπάνια και προέρχονται από συνδετικό και σκελετικό ιστό, ενώ οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα προέρχονται από βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών και από κύτταρα του ανοσοποιητικού αντίστοιχα. Αν και υπάρχουν πολλοί τύποι καρκίνων μερικοί μόνο απαντώνται πιο συχνά. Οι τέσσερις πιο συχνοί τύποι που είναι υπεύθυνοι για περισσότερο από το 50% όλων των καρκίνων είναι: ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του πνεύμονα και ο καρκίνος του παχέος εντέρου [2].

Ο όρος «όγκος» περιγράφει τον μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μπορεί να είναι είτε καλοήθης είτε κακοήθης. Μερικά από τα χαρακτηριστικά που τους διαφοροποιούν τους καλοήθεις από τους κακοήθεις είναι ότι οι τελευταίοι χαρακτηρίζονται από: 1) ταχύτατο ρυθμό ανάπτυξης, 2) αυξημένο ρυθμό κυτταρικής ανανέωσης, 3) ανάπτυξη με εισβολή σε περιφερειακούς ιστούς, 4) ικανότητα μετάστασης, και 5) ικανότητα αγγειακής και ενδοαγγειακής λεμφικής διήθησης. Αντίθετα, οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται αρκετά πιο αργά χωρίς να εισβάλλουν σε περιφερικούς ιστούς και χωρίς να κάνουν μεταστάσεις [2].

Συνεπώς ως καρκίνος θα μπορούσε να οριστεί ως ο ανεξέλεγκτος και πολλαπλασιασμός των κυττάρων, όπου ένα φυσιολογικό κύτταρο μετατρέπεται σε ένα καρκινικό [2]. Τα καρκινικά κύτταρα, μπορούν να εμφανιστούν σε οποιονδήποτε ιστό, και να εξαπλωθούν μέσω της κυκλοφορίας ή της λέμφου και σε άλλα σημεία του σώματος [1, 2]. Προκύπτουν συνήθως μετά από μία σειρά διαταραχών στις κυτταρικές σχέσεις και εμφάνιση μεταλλάξεων σε γονίδια τα οποία τροποποιούν ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Αυτές επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο οδηγώντας τελικά σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Μερικά σημαντικά γονίδια που συμβάλλουν στο φαινόμενο αυτό είναι τα πρωτο-ογκογονίδια, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την κυτταρική διαίρεση. Ωστόσο όταν υποστούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις μετατρέπονται σε ογκογονίδια, τα οποία έχουν επιβλαβή δράση και συμβάλλουν δραστικά στην εμφάνιση του καρκίνου [1]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει μία δεύτερη ομάδα γονιδίων, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία φυσιολογικά αναλαμβάνουν ρόλους όπως η επιδιόρθωση του DNA. Η έλλειψη των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ένας ακόμα παράγοντας που συμβάλλει στην εμφάνιση ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού [1]. Επιπρόσθετα, πέρα από την αλληλουχία βάσεων του DNA ένας ακόμα παράγοντας σημαντικός για το κυτταρικό πεπρωμένο είναι και

οι επιγενετικές τροποποιήσεις του γονιδιώματος, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η αρχιτεκτονική των νουκλεοσωμάτων του. Γενικά, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από σημαντική μείωση της μεθυλίωσης του DNA τους (56% μείωση της συνολικής μεθυλ-κυτοσίνης) και μείωση της μονοακετυλίωσης της Lys16 της ιστόνης 4 (H4K16) [1]. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό δεν αρκεί από μόνη της για την έναρξη της νόσου. Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει εξίσου η αδυναμία του οργανισμού να το εντοπίσει και να το εξουδετερώσει μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος. Συνεπώς, ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου είναι αυξημένος σε ευάλωτες ομάδες όπως οι ηλικιωμένα, άτομα με καταστάσεις χρόνιου στρες, χρόνιες ασθένειες, χρήση ναρκωτικών, ιστορικό χημειοθεραπείας ή κατάχρηση φαρμάκων όπως αναλγητικά, αντιβιοτικά και κορτικοστεροειδή [3].

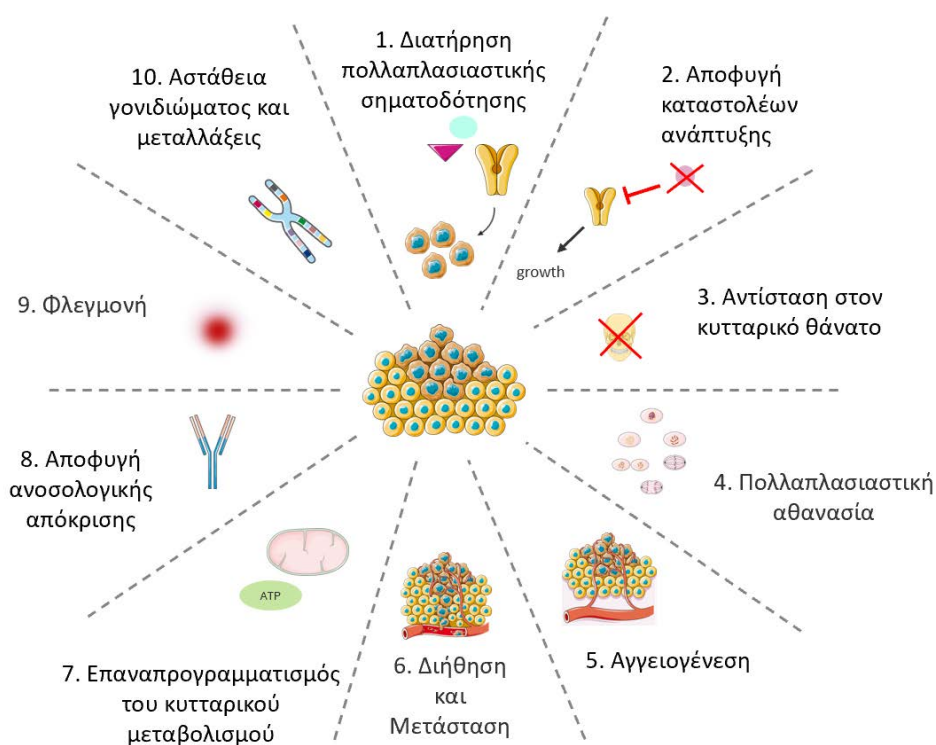
Οι περισσότεροι καρκίνοι είναι ιάσιμοι εφόσον ανιχνευθούν σε πρώιμα στάδια εξέλιξης της νόσου, ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις η πρώιμη ανίχνευση είναι πρακτικά αδύνατη. Οι πιο συνήθεις μέθοδοι που εφαρμόζονται για την θεραπεία του καρκίνου είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου όταν αυτός είναι συμπαγής, η χημειοθεραπεία και η ραδιοθεραπεία. Η χειρουργική επέμβαση ήταν η πρώτη μέθοδος που αξιοποιήθηκε, ενώ αποτελεί συχνά βασική θεραπευτική προσέγγιση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν μεταστάσεις ή τοπικές διηθήσεις [3]. Όσον αφορά την χημειοθεραπεία, αυτή περιλαμβάνει τη χορήγηση κυτταροτοξικών ουσιών (δια στόματος ή ενδοφλέβια) που σκοτώνουν και διαιρούμενα και μη κύτταρα και έχει ως κύριο στόχο να παρεμποδίσει τα καρκινικά κύτταρα από το να πολλαπλασιαστούν, να εισβάλλουν σε γύρω ιστούς και να προκαλέσουν μεταστάσεις. Αντίθετα, η ραδιοθεραπεία αποτελεί μία παρέμβαση που εφαρμόζεται απευθείας στην περιοχή του όγκου είτε προεγχειρητικά για να μειώσει το μέγεθός του ή μετεγχειρητικά για να εξουδετερώσει τυχόν κατάλοιπα καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον θεραπευτικές προσεγγίσεις που αξιοποιούνται σήμερα είναι η μεταμόσχευση μυελού των οστών και βλαστοκυττάρων, η ορμονική θεραπεία, η φωτοδυναμική θεραπεία, η ανοσοθεραπεία, η κρυοχειρουργική και η γονιαδιακή θεραπεία [3].

1.2 Ορόσημα Καρκίνου

Ως ορόσημα του καρκίνου χαρακτηρίζεται το σύνολο των ιδιοτήτων που αποκτώνται από τα ανθρώπινα κύτταρα όταν μεταπίπτουν από την φυσιολογική τους κατάσταση σε καρκινικά. Αυτές οι ιδιότητες είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη κακοηθειών και είναι κοινές μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου σε επίπεδο κυτταρικού φαινοτύπου. Αρχικά κατά το έτος 2000 προτάθηκαν έξι τέτοια ορόσημα, ενώ 11 χρόνια έπειτα κατά το έτος 2011, ο αριθμός τους επεκτάθηκε στα οκτώ, καθώς αναγνωρίστηκε σύντομα ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων διαδικασιών και ότι η απόκτηση τέτοιων ιδιοτήτων μπορεί να εντοπιστεί σε περισσότερα στάδια. Επιπλέον λίγο αργότερα, δύο ακόμα ιδιότητες που εντοπίστηκαν θεωρήθηκαν εν δυνάμει ορόσημα που διευκολύνουν και την απόκτηση των προηγούμενων, και πολύ σύντομα ενσωματώθηκαν κανονικά στα ορόσημα του καρκίνου [4]. Συνεπώς ως και σήμερα, θεωρείται ότι συνολικά υπάρχουν 10 τέτοια ορόσημα που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα:

1. Διατήρηση πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης (sustaining proliferative signaling).
2. Αποφυγή καταστολών ανάπτυξης (evading growth suppressors)
3. Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο (resisting cell death)

4. Πολλαπλασιαστική αθανασία (enabling replicative immortality)
5. Αγγειογένεση (inducing/accessing vasculature)
6. Ενεργοποίηση διήθησης και μετάστασης (activating invasion and metastasis)
7. Επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού (reprogramming cellular metabolism)
8. Αποφυγή ανοσολογικής απόκρισης (avoiding immune destruction)
9. Φλεγμονή που προάγει την ανάπτυξη όγκων (tumor-promoting inflammation)
10. Αστάθεια γονιδιώματος και μεταλλάξεις (genome instability and mutation) [4]



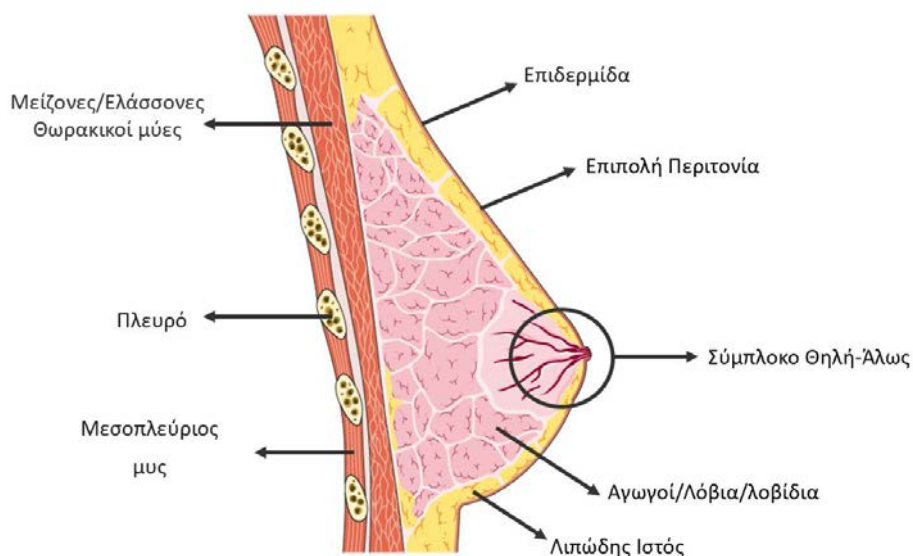
Εικόνα 1: Ορόσημα του καρκίνου. Εικονίδια από την Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>), άδεια υπό CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Ωστόσο τα ορόσημα αυτά από μόνα τους δεν καταφέρουν να περιγράψουν την πολυπλοκότητα της παθογένειας του καρκίνου και τους ακριβείς κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στην εμφάνιση των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων και εν τέλει στην ανάπτυξη της νόσου [4]

1.3 Καρκίνος του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία νόσος που παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Μπορεί να εμφανιστεί σε διαφορετικά σημεία του οργάνου όπως τα λόβια, ή οι αγωγοί και να διαθέτει διαφορετικά χαρακτηριστικά στην εκάστοτε περίπτωση (πχ. διηθητικό/ μη διηθητικό καρκίνωμα). Επίσης μπορεί να εκφράζει διαφορετικούς βιοδείκτες ή ορμονικούς υποδοχείς που καθορίζουν και την ανταπόκρισή του στην θεραπεία. Επομένως για την καλύτερη κατανόησή της νόσου, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τα χαρακτηριστικά του οργάνου, τόσο σε ιστολογικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο κυττάρου [15]. Η ανατομία του μαστού και των λοβίων παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 2 & Εικόνα 3 αντίστοιχα).

1.3.1 Μαστός- Ανατομία και δομή



Εικόνα 2: Ανατομία του μαστού. Εικονίδια από την Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>), άδεια υπό CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Ο μαστός, ή αλλιώς μαστικός αδένας, είναι ένα όργανο χαρακτηριστικό στα θηλαστικά, εξωδερμικής προέλευσης. Βρίσκεται σε ζεύγη και είναι πιο ορατός σε θηλυκά μετά την εφηβεία και σε πιο υποανάπτυκτη μορφή στα αρσενικά. Το σχήμα και ειδικά το μέγεθός του ποικίλλει σημαντικά. Εκτείνεται μεταξύ 2^{ου} και 6^{ου} πλευρού του θώρακα και φτάνει από το πλάγιο άκρο του στέρνου στην εσωτερική πλευρά του, ενώ στην εξωτερική του πλευρά έως την μέση μασχαλαία γραμμή. Μπορεί να χωριστεί νοητά σε 4 τεταρτημόρια με οριζόντιες και κάθετες γραμμές που τέμνονται στην θηλή του μαστού. Στο εξωτερικό άνω τεταρτημόριό του υπάρχει μία γλωσσοειδής προεκβολή, η μασχαλαία απόφυση του Spence [5]. Συνήθως τα 2/3 του εντοπίζονται άνω του μείζονος θωρακικού μυός ενώ το 1/3 άνω του μείζονος ραβδοειδούς μυός [6].

Στο κέντρο του μαστού βρίσκεται η θηλή οποία περιβάλλεται από την θηλαία άλω που έχει δισκοειδές σχήμα. Η άλως περιέχει τροποποιημένους ιδρωτοποιούς αδένες (σημηγματογόνοι αδένες Μοντγκομερι) οι οποίοι λιπαίνουν και προστατεύουν τη θηλή καθώς και λείους μύες που βοηθούν στο τάισμα του βρέφους [7]. Οι αγωγοί των θηλών έχουν διάμετρο περίπου 0.5mm και συσφίγγονται από λείους μύες [8].

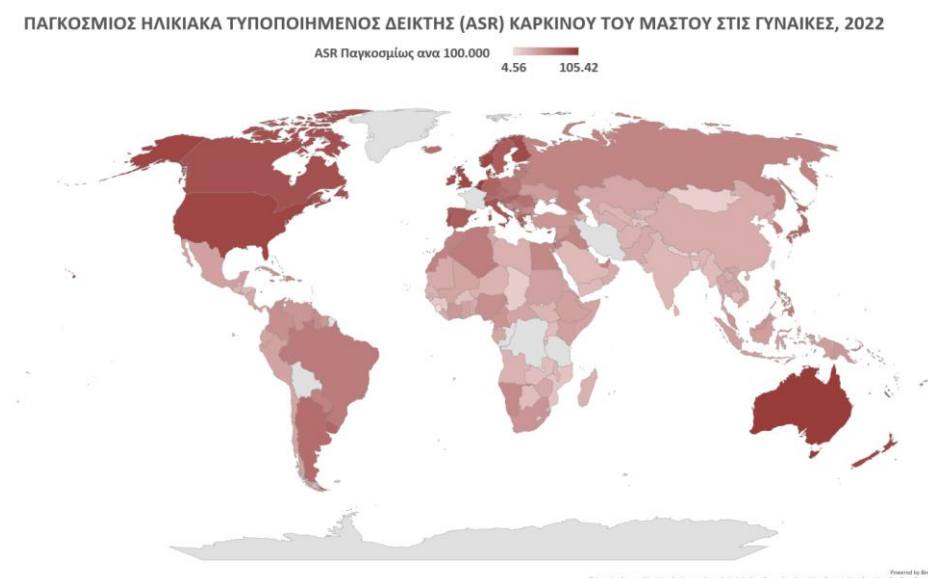
Από ιστολογικής άποψης, ο μαστός αποτελείται από: 1) Επιδερμίδα, 2) Επιτολή Περιτονία, 3) Μαστικό Παρέγχυμα, 4) Σύμπλοκο Θηλής-Άλως, 5) Εν τω Βάθει Περιτονία. Το μαστικό παρέγχυμα αποτελείται κυρίως από αδενικό επιθήλιο, ινώδες υποστηρικτικό στρώμα (σύνδεσμοι του Cooper) και λιπώδη ιστό που διαμορφώνουν το σχήμα του οργάνου. Οι σύνδεσμοι του Cooper διαχωρίζουν τα λόβια και παρέχουν στήριξη και σύναψη μεταξύ υποδόριου ιστού και της περιτονίας των μυών [9]. Το αδενικό επιθήλιο περιέχει περίπου 15-20 αδενικά λόβια που αντίστοιχα συνίστανται από λοβίδια, τα οποία είναι και οι γαλακτοφόροι αδένες του μαστού. Υπάρχουν 3 τύπων λοβίδια, τύπου 1, 2 και 3 [6]. Αυτά αποτελούνται το καθένα από μικροσκοπικά ακίνια και συνδέονται με γαλακτοφόρους αγωγούς που οδηγούν προς 10-15 στόμια που εκβάλλουν στην θηλή. Τέλος, ο μαστός συνδέεται επίσης με δίκτυο αγγείων και λεμφικού ιστού [10].

1.3.2 Επιδημιολογία καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου που εμφανίζεται στις γυναίκες παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας από τα 107,8 εκατομμύρια σταθμιζόμενα έτη ζωής με αναπηρία (Disability-Adjusted Life Years- DALYs) που επιβαρύνουν τις γυναίκες, τα 19,6 εκατομμύρια οφείλονται στον καρκίνο του μαστού, γεγονός που τον κατατάσσει ανάμεσα στις κύριες αιτίες επιβάρυνσης της υγείας του γυναικείου πληθυσμού. Σε παγκόσμια κλίμακα προέκυψαν 2,089 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού το 2018, ενώ αυτά ανήλθαν σε 2,26 εκατομμύρια νέα περιστατικά για το 2020 [12, 13]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής υπολογίζεται ότι ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το 29% όλων των περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες [12]. Η συχνότητά του αυξάνεται παντού στον κόσμο, ωστόσο παραμένει πιο υψηλή σε εκβιομηχανισμένες χώρες, γεγονός που αποδίδεται στον Δυτικό σύγχρονο τρόπο ζωής [13].



Εικόνα 3: Συχνότητα εμφάνισης διάφορων τύπων καρκίνου και στα δύο φύλα παγκοσμίως (Δεδομένα από Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, <https://gco.iarc.fr/today/home>).



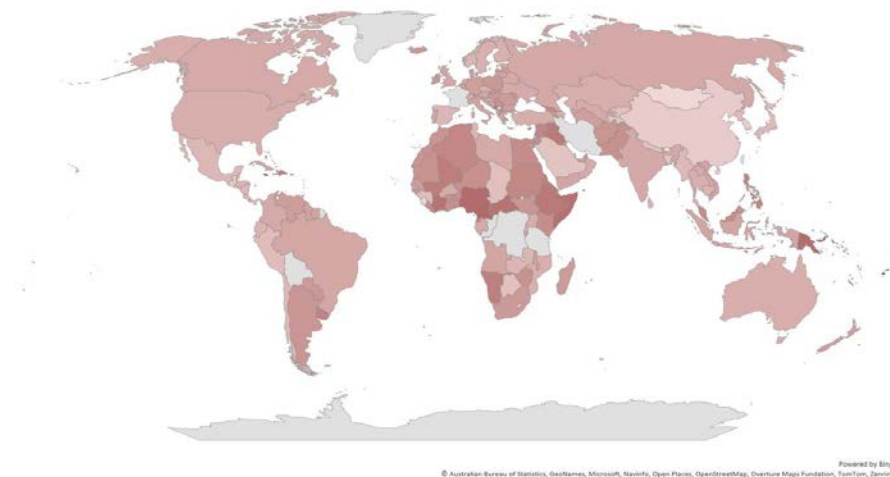
Εικόνα 4: Συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες παγκοσμίως (Δεδομένα από Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, <https://gco.iarc.fr/today/home>).

Παρά την εξέλιξη της επιστήμης, ο καρκίνος του μαστού εξακολουθεί να είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως, με τους θανάτους να αγγίζουν το 2018 τους

626.679 [12]. Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού σε ενήλικες γυναίκες πριν μπουν στην εμμηνόπαυση (20-49 ετών) τα τελευταία 30 χρόνια έχει σχεδόν διπλασιαστεί [13]. Μεταξύ 1990 και 2016 η συχνότητα εμφάνισης του έχει αυξηθεί πάνω από το διπλάσιο σε 60/102 χώρες ενώ οι θάνατοι αντίστοιχα σε 43/102 χώρες. Τωρινές έρευνες καταδεικνύουν ότι ως το 2030 η παγκόσμια καταγραφή νέων περιστατικών θα ανέρχεται στα 2,7 εκατομμύρια ετησίως ενώ οι θάνατοι στους 0,87 εκατομμύρια. Στις αναπτυσσόμενες χώρες επίσης αναμένεται να υπάρξει αύξηση του ρυθμού εμφάνισης της νόσου λόγω υιοθέτησης των δυτικών προτύπων ζωής όπως και της βελτίωσης των μέσων καταγραφής εντοπισμού και διάγνωσης της [12].

ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΣ ΗΛΙΚΙΑΚΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ (ASR) ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ, 2022

ASR Παγκοσμίως ανά 100.000 2.33 38.85



Εικόνα 5: Ποσοστά θνησιμότητας καρκίνου του μαστού (Δεδομένα από Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, <https://gco.iarc.fr/today/home>).

1.3.3 Τύποι καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες αντιπροσωπεύοντας περίπου το 23% του συνόλου των κακοηθειών [14]. Είναι μια ετερογενής κακοήθεια που παρουσιάζει ποίκιλα μορφολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα να παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά και ανταπόκριση στις υπάρχουσες θεραπείες [15]. Για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του, η ταξινόμησή του είναι απαραίτητη και στοχεύει στην ακριβέστερη διάγνωση της ασθένειας αλλά και πρόβλεψη της μελλοντικής εξέλιξης και συμπεριφοράς του όγκου [15]. Η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων (καλοηθών και κακοηθών) εντοπίζεται στο άνω εξωτερικό τεταρτημόριο του στήθους, στην μασχαλιαία απόφυση του Spence [5].

Σημαντικοί παράμετροι αξιολόγησης του καρκίνου του μαστού αποτελούν η βαθμοποίηση (grading) και η σταδιοποίηση (staging) της νόσου.

Η πρώτη αναφέρεται στον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και αξιολογείται συνηθέστερα με το Nottingham Grading System (NGS), βάσει τριών μορφολογικών χαρακτηριστικών: 1) τον βαθμό σχηματισμού σωληναρίων ή αδένων, 2) τον πολυμορφισμό των πυρήνων, 3) τον ρυθμό των μιτωτικών διαιρέσεων. Κάθε μία από τις τρεις παραμέτρους βαθμολογείται με σκορ από το 1 ως το 3 και το άθροισμά τους κατατάσσει τον όγκο από grade 1 ως και grade 3 [15]. Οι όγκοι που ανήκουν στο grade 1 είναι κατά κανόνα καλά διαφοροποιημένοι, όμοιοι με τον φυσιολογικό ιστό και λιγότερο επιθετικοί, ενώ αυτοί του grade 3 πιο αδιαφοροποίητοι και επιθετικοί [16].

Όσον αφορά την σταδιοποίηση, αναφέρεται στο βαθμό εξάπλωσης του όγκου και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την πρόγνωση και την επιλογή της θεραπείας. Αξιολογείται κυρίως με το TNM staging system (Tumor/Nodes/Metastasis) που κατατάσσει την ασθένεια από στάδιο 0 ως και στάδιο IV, συνδυάζοντας τόσο κλινικά όσο και παθολογικά ευρήματα όπως:

- 1) το μέγεθος και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου (T),
- 2) την κατάσταση (προσβολή) των περιφερειακών λεμφαδένων (N),
- 3) την ύπαρξη ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων (M).

Στην τελευταία έκδοση του συστήματος TNM από την AJCC-TNM8, προστέθηκαν επιπλέον βιολογικοί δείκτες λαμβάνοντας υπόψη την βαθμοποίηση αλλά και την έκφραση των υποδοχέων ER, PR, HER2 [15].

Νέα κατάταξη βάσει μοριακών τεχνικών

Πλέον, η δυνατότητα δημιουργίας προφίλ γονιδιακής έκφρασης που προσέφεραν οι νέες τεχνολογίες δημιούργησε μία νέα κατάταξη των τύπων καρκίνου του μαστού, βάσει του μοριακού τους προφίλ, σε 5 υποτύπους, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τον ανοσοφαινότυπο, όσο και το γονιδιακό προφίλ, τις μεταλλάξεις, τα σήματα κυτταρικής σηματοδότησης καθώς και τη δομή του DNA και την ιστολογία του όγκου [15]. Η PAM50 (Prediction Analysis of Microarray using 50 classifier genes plus 5 reference genes) έχει καθιερωθεί ως η μέθοδος που ταξινομεί τους όγκους σε πέντε βασικούς μοριακούς υποτύπους [15]. Αυτοί ορίζονται ως:

- 1) **Luminal A:** Χαρακτηρίζεται από έκφραση γονιδίων που συναντώνται σε φυσιολογικά αυλικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού καθώς και υπερέκφραση των υποδοχέων οιστρογόνου (ER). Ο Luminal A υπότυπος είναι ο πιο κοινός και αντιπροσωπεύει το 40-50% όλων των περιπτώσεων. Συνήθως έχουν χαμηλή βαθμοποίηση, αργή ανάπτυξη και καλή πρόγνωση. Ανταποκρίνεται καλά στην ορμονική θεραπεία, χωρίς να είναι απαραίτητη η χημειοθεραπεία [15].
- 2) **Luminal B:** Είναι παρόμοιος με τον Luminal A ως προς την έκφραση των επιθηλιακών γονιδίων, ωστόσο έχει χαμηλότερη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον υποδοχέα ER, υψηλότερη έκφραση γονιδίων πολλαπλασιασμού καθώς και υψηλότερη βαθμοποίηση. Έτσι, η πρόγνωση είναι γενικά χειρότερη από αυτή του Luminal A υποτύπου. Επιπλέον, η έκφραση του Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER2) ποικίλλει. Στην περίπτωση αυτού του υποτύπου, επιλέγεται συνδυασμός ορμονικής θεραπείας και χημειοθεραπείας [15].
- 3) **HER2-overexpressing:** Αποτελεί το 15% περίπου όλων των καρκίνων του μαστού και χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση HER2 υποδοχέα αλλά και γονιδίων που εμπλέκονται στην σηματοδότησή του ή βρίσκονται στο HER2 αντίγραφο του χρωμοσώματος 17q12. Χαρακτηρίζεται από υψηλή βαθμοποίηση και επιθετικότητα ενώ δεν υπερεκφράζει τους υποδοχείς PR και ER. Ανταποκρίνονται πολύ καλά σε anti-HER2 στοχευόμενες θεραπείες [15].
- 4) **Basal-like/Triple Negative Breast Cancers:** Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple Negative Breast Cancer - TNBC) είναι ένας ιδιαίτερα επιθετικός υπότυπος, που χαρακτηρίζεται από την απουσία έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER), προγεστερόνης (PR) και HER2. Παρά το γεγονός ότι η γενετική του βάση δεν είναι πλήρως κατανοητή, έχει βρεθεί ότι το 60-70% των καρκίνων του μαστού σε φορείς μεταλλάξεων του BRCA1 γονιδίου έχουν TNBC φαινότυπο [14].

Ο TNBC εμφανίζει γονιδιακή έκφραση παρόμοια με αυτή των φυσιολογικών μυοεπιθηλιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της υπερέκφρασης βασικών κυτταροκερατινών. Παράλληλα, παρατηρείται υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση, ενώ απουσιάζει η έκφραση γονιδίων σχετικών με ορμονικούς υποδοχείς και HER2 [15]. Η προγνωστική αξία του δείκτη Ki-67 είναι σημαντική, καθώς συσχετίζεται με υψηλό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κακή πρόγνωση [14].

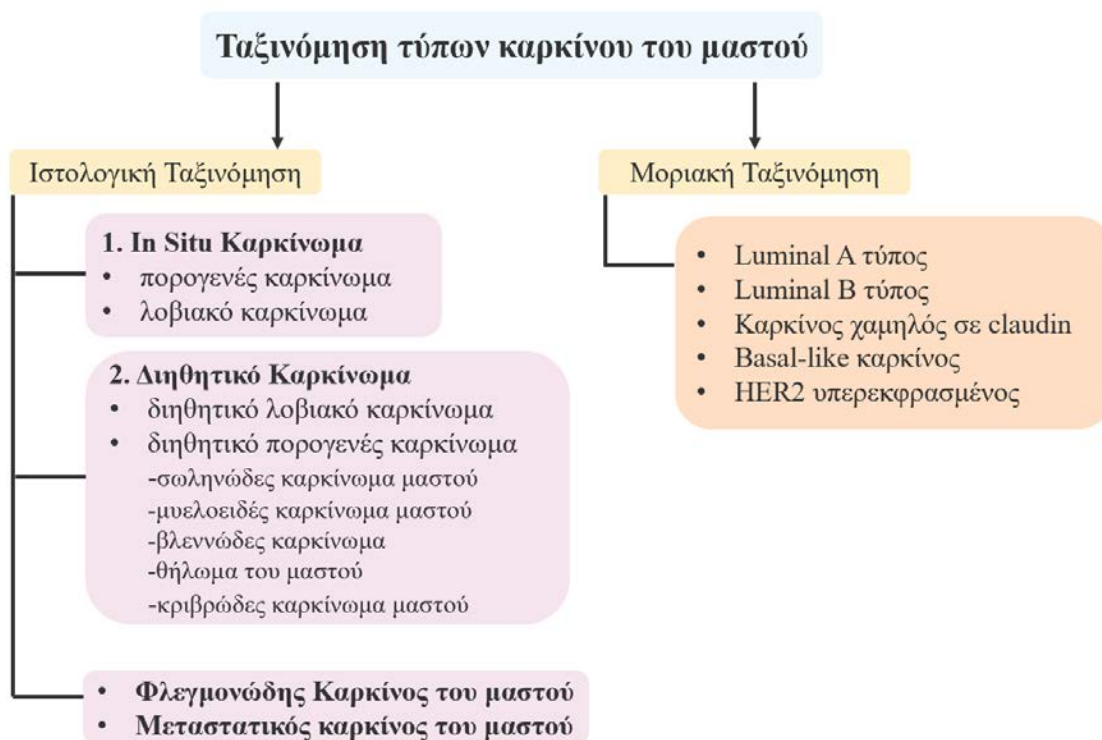
Ο TNBC συχνά εμφανίζεται σε νεότερες γυναίκες, συχνά πριν την ηλικία στην οποία ξεκινά ο συστηματικός προληπτικός έλεγχος. Στο 90% των περιπτώσεων πρόκειται για διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, κατά κανόνα μονοεστιακό [14].

Δεν παρατηρείται σταθερή συσχέτιση ανάμεσα στο μέγεθος του όγκου ή την εμπλοκή λεμφαδένων με τον TNBC, όμως ο τύπος αυτός τείνει να δίνει αιματογενείς μεταστάσεις, κυρίως σε πνεύμονες και εγκέφαλο, σε αντίθεση με άλλους τύπους που δίνουν συχνότερα λεμφαδενικές ή οστικές μεταστάσεις [14].

Η συχνότητα υποτροπών κορυφώνεται εντός των πρώτων τριών ετών μετά την αρχική θεραπεία, ενώ μετά τα 8 έτη η πιθανότητα υποτροπής είναι εξαιρετικά χαμηλή [14].

Ο TNBC είναι ένας υψηλής βαθμολογίας (grade) καρκίνος, με ταχεία εξέλιξη και γενικά κακή πρόγνωση. Η ορμονική θεραπεία και οι θεραπείες στόχευσης HER2 είναι αναποτελεσματικές, επομένως η κύρια θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται στη χημειοθεραπεία [14].

- 5) **Normal-like tumors:** Εδώ κατατάσσονται όσοι καρκίνοι δεν εμπίπτουν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες και καμία φορά αμφισβητείται η χρησιμότητά της ως κατηγοριοποίηση [14, 15].



Εικόνα 6: Κατάταξη τύπων καρκίνου του μαστού (Δεδομένα από VarRuchi Sharma et al., 2019).

Άλλοι πιο σπάνιοι τύποι καρκίνου του μαστού αποτελούν:

1. **Νόσος του Paget:** εμφανίζεται με συχνότητα 0,5-5% και συχνότερα σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Κύρια συμπτώματα αποτελούν η έντονη αίσθηση ερεθισμού και φλεγμονής στην περιοχή της θηλής και της θηλαίας άλως. Επίσης, μπορεί να εμφανιστεί στην περιοχή μια μικρή κρούστα ή ακόμα πιο σπάνια, ορώδεις ή αιμορραγικές εκκρίσεις [63].
2. **Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού:** αυτή η περίπτωση πρόκειται για έναν τύπο διηθητικού καρκίνου του μαστού όπου καρκινικά κύτταρα αποφράσουν τα λεμφαγγεία του δέρματος, γεγονός που οδηγεί σε φλεγμονή [64, 65].
3. **Καρκίνος του μαστού στους άντρες:** αντιπροσωπεύει λιγότερο από 1% των καρκίνων του μαστού και συνήθως πρόκειται για διηθητικό πορογενή καρκίνο [64, 65].
4. **Φυλλοειδείς όγκοι του μαστού:** αποτελούν λιγότερο του 1% των διαγνωσθέντων καρκίνων του μαστού και το 1/4 αυτών είναι κακοήθεις [64, 65].

1.3.4 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού

Η εμφάνιση καρκίνου του μαστού εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες κινδύνου τόσο γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς [13]. Η καταγραφή των παραγόντων αυτών είναι σημαντική καθώς μπορεί να βοηθήσει στην δημιουργία μιας πιο σαφούς επιδημιολογικής εικόνας και άρα να συμβάλλει στον εντοπισμό και την πρόληψη της νόσου.

Ένας τρόπος κατηγοριοποίησης των παραγόντων κινδύνου είναι σε 1) μεταβλητούς και 2) μη μεταβλητούς [12]. Πιο συγκεκριμένα κάποιοι από τους πιο σημαντικούς είναι:

ΜΗ ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1. Φύλο

Σε συνδυασμό με την ηλικία και την οικονομική ανάπτυξη της χώρας αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες. Υπολογίζεται ότι το 99% των περιστατικών αφορά γυναίκες και μόνο το 1% άντρες [13]. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της ενισχυμένης ορμονικής διέγερσης που υφίστανται οι γυναίκες, σε αντίθεση με τους άντρες. Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα που εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος έχουν συσχετιστεί θετικά με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού [12]. Στους άντρες ωστόσο, την στιγμή της διάγνωσης συνήθως η ασθένεια είναι πιο προχωρημένη από ότι συνήθως εντοπίζεται στις γυναίκες, με μέση ηλικία τα 67 χρόνια. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου για τους άντρες αποτελεί αν είναι φορείς BRCA1/2 μεταλλάξεων, η αυξημένη ηλικία, τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων, το σύνδρομο Κλάινεφελτερ, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και η έκθεση σε ακτινοβολία [12].

2. Ηλικία

Με βάση τα σημερινά δεδομένα, είναι γεγονός ότι πάνω από το 80% των ασθενών με καρκίνο του μαστού είναι άτομα άνω των 50 ετών, ενώ παράλληλα περισσότερο από το 40% είναι άνω των 65 ετών. Ωστόσο υπάρχει μια διαφοροποίηση στην περίπτωση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού ο οποίος διαγιγνώσκεται συνήθως σε ηλικίες μικρότερες των 40 ετών, ενώ ο τύπος Luminal A εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ηλικίες άνω των 70 [12].

3. Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών

Το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί από τους πιο σημαντικούς παράγοντες αυξημένου ρίσκου εμφάνισης καρκίνου του μαστού παρά την ηλικία του ασθενούς. Περίπου το 13-19% των ατόμων που έχουν προσβληθεί από την νόσο αναφέρουν έναν συγγενή Α' βαθμού που έχει προσβληθεί επίσης. Το ρίσκο ανεβαίνει με την αύξηση του αριθμού των συγγενών που πάσχουν, και ειδικότερα αν αυτοί είναι κάτω των 50 ετών. Η συσχέτιση αυτή αποδίδεται σε επιγενετικές αλλαγές καθώς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών ειδικά αν συνοδεύεται από BRCA1/2 μεταλλάξεις επίσης πιθανά αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού [12].

4. Γενετικές Μεταλλάξεις

Δύο μείζονα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις σχετίζονται πολύ ισχυρά με αύξηση προδιάθεσης για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού είναι τα BRCA1 (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17) και BRCA2 (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά αποκτώνται κυρίως μέσω αυτοσωμικής επικρατούς κληρονομικότητας, ωστόσο έχουν αναφερθεί επιπλέον σποραδικές μεταλλάξεις. Άλλα γονίδια που συσχετίζονται ισχυρά με καρκίνο του μαστού είναι τα TP53, CDH1, PTEN και STK11. Γονίδια που αλληλοεπιδρούν έμμεσα με τα BRCA1/2 είναι τα ATM, PALB2, BRIP1 και CHEK2, ωστόσο αυτά δεν σχετίζονται το ίδιο ισχυρά με την καρκινογένεση όσο τα BRCA1/2 [12].

5. Φυλή/Εθνικότητα

Είναι γεγονός ότι παρατηρούνται, ανομοιότητες μεταξύ των ατόμων με καρκίνο του μαστού όσον αφορά την φυλή και την εθνικότητα, ωστόσο ο μηχανισμός που εξηγεί αυτό το φαινόμενο ακόμα δεν είναι γνωστός. Ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης παραμένει υψηλότερη σε λευκές μη Ισπανόφωνες γυναίκες. Κατά αντιφατικό τρόπο η θνησιμότητα είναι αξιοσημείωτα αυξημένη στις μαύρες γυναίκες [12].

6. Εγκυμοσύνη και Θηλασμός

Η έκθεση σε ενδογενείς ορμόνες και ειδικά στην προγεστερόνη και τα οιστρογόνα, έχει έναν στενό συσχετισμό με την αυξημένη πιθανότητα νόσησης από καρκίνο του μαστού. Αν η γυναίκα έχει ολοκληρώσει την πρώτη της πλήρη εγκυμοσύνη σε νεαρή ηλικία, μειώνονται οι πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του μαστού, όπως επίσης μειώνονται και με την αύξηση του αριθμού των γεννών που έχει πραγματοποιήσει. Γενικά η εγκυμοσύνη δείχνει να έχει έναν προστατευτικό ρόλο. Ωστόσο, η ίδια προστατευτική δράση δεν έχει επιβεβαιωθεί για εγκυμοσύνες που διήρκεσαν λιγότερο από 33 εβδομάδες. Παράλληλα, γυναίκες με προεκλαμψία όπως και τα παιδιά που προκύπτουν από τέτοιες γέννες έχουν χαμηλότερο ρίσκο εμφάνισης της νόσου, ενώ δεν έχει φανεί θετικός συσχετισμός μεταξύ διακοπής της κύησης και του καρκίνου του μαστού [12]. Επίσης όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια του θηλασμού τόσο λιγότερο και το ρίσκο για ER/PR-θετικούς καρκίνους, αλλά και ER/PR-αρνητικούς [12].

7. Περίοδος και εμμηνόπαυση

Η πρώιμη εκκίνηση της περιόδου συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού αλλά εμπλέκεται πιθανώς και με την βαθμοποίηση και την εμπλοκή των λεμφαδένων. Αντίθετα, η πρώιμη εμμηνόπαυση είτε προκύψει φυσικά, είτε με χειρουργική επέμβαση, μειώνει τον κίνδυνο [12].

8. Πυκνότητα ιστού του μαστού

Υπάρχουν διάφορες κατηγοριοποιήσεις των μαστών στην κλινική πρακτική, όπως πχ υψηλής πυκνότητας, χαμηλής πυκνότητας, λιπώδης μαστοί κτλ. Συνήθως μεγαλύτερη μαστική πυκνότητα παρατηρείται σε νεαρές γυναίκες που θηλάζουν, εγκυμονούν ή βρίσκονται σε θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης. Είναι γεγονός ότι όσο μεγαλύτερη η πυκνότητα του μαστικού ιστού, τόσο υψηλότερη είναι η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού, το οποίο παρατηρείται στις γυναίκες πριν αλλά και μετά την εμμηνόπαυση [12].

9. Προηγούμενο ιστορικό καρκίνου του μαστού/Ασθένειες μαστών

Το προσωπικό ιστορικό καρκίνου του μαστού σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο νέων προσβολών σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Επίσης η ύπαρξη άλλων μη καρκινικών εκδηλώσεων, όπως η ατυπική υπερπλασία, το in situ καρκίνωμα ή άλλων καρκινικών και μη αλλοιώσεων, επίσης αυξάνει τον κίνδυνο [12].

10. Προηγούμενη έκθεση σε ραδιοθεραπεία

Οι ασθενείς που υφίστανται ραδιοθεραπεία πριν την ηλικία των 30 ετών διατρέχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του μαστού. Ωστόσο αυτό εξαρτάται από τα ατομικά χαρακτηριστικά τους, αν και είναι ένα συχνό φαινόμενο που εγείρει τις ανησυχίες των κλινικών [12].

ΜΕΤΑΒΛΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1. Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης

Πολυάριθμες μελέτες υποδεικνύουν ότι γυναίκες που βρίσκονται υπό θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης για περισσότερο από 5 με 7 χρόνια διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού [12].

2. Διαιθυλοστυλβεστρόλη

Η χρήση της διαιθυλοστυλβεστρόλης (ένα συνθετικό οιστρογόνο που χορηγούταν μεταξύ 1940 και 1971 για να αποτρέψει τις αποβολές, τον πρόωρο τοκετό αλλά και άλλες επιπλοκές [57]) κατά την εγκυμοσύνη έχει συσχετιστεί με αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού όχι μόνο στην ίδια την μητέρα αλλά και στους απογόνους της. Αυτή η σχέση παρατηρείται παρά την έκφραση η μη των υποδοχέων οιστρογόνων ή προγεστερόνης και πιθανώς αφορά κάθε τύπο καρκίνου του μαστού. Η πιθανότητα αυξάνεται δοσοεξαρτώμενα αλλά και με βάση την ηλικία της μητέρας, όπου σε γυναίκες άνω των 40 έχει παρατηρηθεί ότι αυτή ανεβαίνει κατά 1.9 φορές [12].

3. Φυσική άσκηση

Η φυσική δραστηριότητα θεωρείται προστατευτικός παράγοντας έναντι του καρκίνου του μαστού, αν και ο μηχανισμός πίσω από αυτό δεν είναι ακόμα εξακριβωμένος. Ωστόσο έχουν δημιουργηθεί αρκετές υποθέσεις που προσπαθούν να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο, κάποιες εκ των οποίων αναφέρουν πως η φυσική δραστηριότητα δρα προστατευτικά μειώνοντας την έκθεση σε ενδογενείς φυλετικές ορμόνες, τροποποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα ή τα επίπεδα του insulin-like growth factor-1 [12].

4. Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού, και ακόμα περισσότερο όταν η γυναίκα βρίσκεται μετά την εμμηνόπαυση. Ωστόσο, ανεξάρτητα από την εμμηνορρυσιακή τους κατάσταση, οι παχύσαρκες γυναίκες έχουν χειρότερη πρόγνωση. Επιπρόσθετα οι επιστήμονες παρατήρησαν ότι το υψηλό BMI σχετίζεται με πιο επιθετική συμπεριφορά του όγκου από ότι ασθενών με χαμηλότερο BMI, όπως επίσης και περισσότερες μεταστάσεις μέσω λεμφαδένων αλλά και μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου. Το αυξημένο σωματικό λίπος πιθανώς ενισχύει την φλεγμονή και επηρεάζει τα επίπεδα των ορμονών της κυκλοφορίας προωθώντας έτσι τα συμβάντα πριν την καρκινογένεση [12].

5. Κατανάλωση Αλκοόλ

Μελέτες ως τώρα έχουν αποδείξει τον πιθανό ρόλο της υπέρμετρης κατανάλωσης αλκοόλ στον σχηματισμό κακοηθειών στο γαστρεντερικό σύστημα, ωστόσο πλέον υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι κάτι αντίστοιχο ισχύει και για την σχέση του αλκοόλ με τον καρκίνο του μαστού. Πιο συγκεκριμένα αυτό που βρέθηκε να επηρεάζει δεν ήταν το είδος του αλκοολούχου ποτού, αλλά η περιεκτικότητά του σε αλκοόλη. Η εξήγηση πίσω από αυτόν τον συσχετισμό είναι η αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων που προκαλεί η κατανάλωση αλκοόλης δημιουργώντας έτσι μια ορμονική ανισορροπία, επηρεάζοντας την καρκινογένεση στα θηλυκά όργανα. Άλλες υποθέσεις προσπαθούν να δώσουν εξηγήσεις αναφέροντας πως οι μεταβολίτες της αλκοόλης πιθανώς να έχουν άμεσα ή έμμεσα καρκινογόνες ιδιότητες ή να συσχετίσουν την καρκινογένεση με την έλλειψη πρόσληψης θρεπτικών που οφείλεται στην κατανάλωση αλκοόλ [12].

6. Κάπνισμα

Οι καρκινογόνες ουσίες που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου μεταφέρονται στον ιστό του μαστού αυξάνοντας έτσι την επιρρέπεια σε μεταλλάξεις πρωτοογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, και ειδικά του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53. Σε αυτό συμβάλλει τόσο το ενεργητικό όσο και το παθητικό κάπνισμα, ενώ η μακρά διάρκεια καπνίσματος και το κάπνισμα πριν την πρώτη ολοκληρωμένη εγκυμοσύνη αυξάνουν επιπλέον τον κίνδυνο [12].

7. Έλλειψη βιταμινών

Είναι γνωστό ότι οι βιταμίνες διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες που πιθανώς αποτρέπουν αρκετές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού, ωστόσο δεν είναι γνωστή κάποιος μηχανισμός που μπορεί να υποστηρίξει αυτόν τον ισχυρισμό.. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην βιταμίνη D, επιβεβαιώνοντας τις προστατευτικές της δράσεις. Για παράδειγμα, υψηλή 25-υδροξυβιταμίνη D στον ορό συσχετίζεται με μικρότερη συχνότητα καρκίνου του μαστού σε γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση, αλλά και μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας λόγω της νόσου. [12].

8. Υπερβολική έκθεση σε τεχνητό φως

Το τεχνητό φως κατά την διάρκεια της νύχτας (ALAN) πρόσφατα συνδέθηκε με την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η πιθανή εξήγηση για αυτό ίσως είναι η διατάραξη του ρυθμού έκκρισης της μελατονίνης που συνδέεται με επιγενετικές αλλαγές στο γονιδίωμα. Σύμφωνα με έρευνες το ρίσκο είναι αξιοσημείωτα μεγαλύτερο σε άτομα με

αυξημένη έκθεση σε ALAN από ότι αυτά σε λιγότερη. Ωστόσο χρειάζεται περισσότερη έρευνα πάνω στο ζήτημα [12].

9. Διατροφή και πρόσληψη επεξεργασμένων τροφών

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το υψηλής επεξεργασίας κρέας έχει ταξινομηθεί ως καρκινογόνο ομάδας 1 που ίσως αυξάνει όχι μόνο την πιθανότητα καρκίνων του γαστρεντερικού αλλά και του μαστού. Παρόμοιοι συσχετισμοί έχουν γίνει και για την υπέρμετρη κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών. Επίσης επεξεργασμένα τρόφιμα πλούσια σε αλάτι, λιπαρά και ζάχαρη που προδιαθέτουν για παχυσαρκία επίσης αυξάνουν τις πιθανότητες και για καρκίνο του μαστού. Γενικά έχει παρατηρηθεί πως 10% αύξηση τροφίμων υψηλής επεξεργασίας στην διατροφή ισοδυναμεί με 11% υψηλότερο ρίσκο για καρκίνο του μαστού. Αντιθέτως, μία δίαιτα πλούσια σε λαχανικά, φρούτα, σιτηρά ολικής άλεσης και άπαχη πρωτεΐνη μειώνει τον κίνδυνο. Επιπλέον, μία δίαιτα που περιέχει υψηλές ποσότητες n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, βιταμίνη D, φυτικές ίνες, φολικό οξύ, και φυτοοιστρογόνα ίσως είναι ωφέλιμη για αποφυγή της νόσου, ενώ ορισμένες ουσίες που εντοπίζονται στο πράσινο τσάι ή τον κουρκουμά όπως η σουλφοραφάνη παρουσιάζουν κάποιες αντικαρκινικές ιδιότητες [12].

10. Έκθεση σε χημικά και άλλα φάρμακα

Οι ουσίες του περιβάλλοντος μπορεί να προδιαθέσουν θετικά για την εμφάνιση καρκίνου επηρεάζοντας το μικροπεριβάλλον του όγκου και άρα προκαλώντας επιγενετικές τροποποιήσεις που οδηγούν σε συμβάντα καρκινογένεσης. Επίσης θετικά συσχετίζεται και ο χρόνος της έκθεσης. Ο αριθμός των ουσιών που πιθανώς προκαλούν καρκινογένεση στον μαστό είναι μεγάλος, εκ των οποίων οι DDT και PCB είναι από τις πιο μελετημένες, καθώς έχει βρεθεί ότι η πρώιμη έκθεση σε αυτές διαταράσσει την ανάπτυξη των μαστικών αδένων. Επίσης ένας συσχετισμός έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις έκθεσης σε πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες, συνθετικές ίνες, οργανικούς διαλύτες, εντομοκτόνα και νέφη λαδιού από πχ καύσιμα. Επιπλέον ουσίες που αποτελούν πιθανούς παράγοντες κινδύνου είναι τα αντιβιοτικά, τα αντικαταθλιπτικά, οι στατίνες, τα αντιυπερτασικά φάρμακα και τα NSAIDS [12].

Παράγοντες κινδύνου για τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού

Όσον αφορά συγκεκριμένα τους παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, αξίζει να σημειωθεί ότι ο TNBC εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες νεότερης ηλικίας (42 ετών η λιγότερο) σε μεταγενέστερο στάδιο κατά την διάγνωση ενώ συχνά συνδέεται με την παχυσαρκία. Αν και ο TNBC δεν χαρακτηρίζεται από έκφραση υποδοχέων PR, ER και HER2, το ρίσκο εμφάνισής του φαίνεται να σχετίζεται με ορμονικές αλλαγές κατά την διάρκεια ζωής της γυναίκας. Η πολυτοκία και νεαρή ηλικία της πρώτης εγκυμοσύνης αυξάνουν τον κίνδυνο για εμφάνιση τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, αν και ο θηλασμός, ειδικά όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια του και όσο πιο πολλοί απόγονοι θηλαστούν, μειώνει τον κίνδυνο. Το ίδιο ισχύει και για την ατεκνία. Μεγαλύτερη αναλογία περιφέρειας μέσης/λεκάνης επίσης καταδείχθηκε να αυξάνει το ρίσκο για TNBC. Τέλος, μία ακόμα μελέτη έδειξε ότι οι γυναίκες με TNBC είχαν πιο συχνά μεταβολικό σύνδρομο, που χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη και υπέρμετρο βάρος [14].

1.3.5 Διάγνωση και θεραπεία καρκίνου του μαστού

1.3.5.1 Συμπτωματολογία και διάγνωση

Συνήθως όταν ο καρκίνος του μαστού είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο και ο όγκος μικρότερος σε μέγεθος, δεν παρουσιάζεται κάποια συμπτωματολογία, για αυτό και ο προληπτικός έλεγχος είναι ζωτικής σημασίας για την διάγνωση. Η εμφάνιση μάζας στο στήθος είναι το πιο κοινό σύμπτωμα. Λιγότερο κοινά συμπτώματα είναι ο πόνος, η ενόχληση ή το αίσθημα βάρους στον μαστό, οι αλλαγές κατά διαστήματα στην εμφάνιση της θηλής, όπως ξηρότητα ή αναστροφή της θηλής [17].

Σε γενικές γραμμές ο καρκίνος του μαστού διαγιγνώσκεται είτε στα πλαίσια του προληπτικού ελέγχου είτε μετά την εκδήλωση κάποιου από τα παραπάνω συμπτώματα ή εντοπισμό κάποιας απτής μάζας που οδηγούν σε διαγνωστικό τεστ. Ο προληπτικός έλεγχος των υγιών γυναικών βοηθά στον εντοπισμό των όγκων ακόμα και όταν είναι μικροί σε μέγεθος, και έτσι υπάρχουν λιγότερες πιθανότητες για μετάσταση και μπορούν να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση χωρίς να αφαιρέσουν όλο τους το στήθος ή ακόμα ίσως σε σπάνιες περιπτώσεις και να αποφύγουν την χημειοθεραπεία [18].

Η πιο συνήθης μέθοδος που έχειδειχθεί ότι προλαμβάνει την θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού συγκεκριμένα είναι ως τώρα η μαστογραφία [18]. Η διαγνωστική μαστογραφία χρησιμοποιεί ακτίνες Χ για να δημιουργήσει εικόνα του στήθους χρησιμοποιώντας έτσι μικρές δόσεις ακτινοβολίας. Χρησιμοποιείται συνήθως όταν παρατηρηθούν απρόσμενα ευρήματα στην κλινική εξέταση του μαστού ή στην προληπτική μαστογραφία [19]. Η μέθοδος αυτή μειώνει την θνησιμότητα των γυναικών από καρκίνο του μαστού ως και 19%. Τα οφέλη είναι ακόμα περισσότερα σε γυναίκες πιο μεγάλης ηλικίας παρά σε γυναίκες νεότερες των 40 ετών, για αυτό η American Cancer Society προτείνει οι γυναίκες των 45 και άνω ετών να υποβάλλονται σε προληπτική μαστογραφία, ή και νωρίτερα, ανάλογα το ατομικό ιστορικό και προτιμήσεις [18].

Πέρα από την μαστογραφία, για την παρατήρηση του μαστού μπορεί να αξιοποιηθεί και ο υπέρηχος. Ο υπέρηχος ειδικά σε γυναίκες με υψηλή πυκνότητας μαστού μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό επιπλέον περιστατικών [20]. Πιο συγκεκριμένα, αυτός έχει την ικανότητα να απεικονίζει διάφορα μέρη του σώματος χρησιμοποιώντας υψηλής συχνότητας ηχητικά κύματα. Αξιοποιείται συχνά ώστε να προσδιοριστεί αν μια μάζα είναι συμπαγής όγκος ή απλά κύστη. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί πιο καλά το σημείο που θα υποστεί βιοψία [19].

Η MRI (Magnetic Resonance Imaging) έχει επίσηςδειχθεί ως υψηλής ευαισθησίας τεχνική για τον εντοπισμό του καρκίνου αγγίζοντας το 90-93% συγκριτικά με το 48-63% της ευαισθησίας της μαστογραφίας και του υπέρηχου μαζί. Ωστόσο η χρήση της έχει περιοριστεί σε κάποιες χώρες σε γυναίκες που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [20].

Παρόλα αυτά, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να ταυτοποιηθεί με ακρίβεια μόνο μέσω βιοψίας. Κατά την διάρκεια αυτής αφαιρείται ο ιστός ή τα κύτταρα από το σώμα της ασθενούς για να εξεταστούν στο εργαστήριο από παθολόγο, συνήθως σε νοσοκομείο, ο οποίος και θα καθορίσει αν εμπεριέχονται στο δείγμα καρκινικά κύτταρα ή όχι. Επίσης ο τύπος βιοψίας εξαρτάται από το αν ο όγκος είναι απτός ή όχι. Προκειμένου να εντοπιστεί το σημείο που πρέπει να εξεταστεί χρησιμοποιείται μαστογραφία ή υπέρηχος [19].

1.3.5.2 Θεραπεία

Στην περίπτωση του μη μεταστατικού καρκίνου του μαστού, πρωταρχικοί στόχοι της θεραπείας είναι η εξάλειψη του όγκου από τον μαστό αλλά και τους περιφερειακούς λεμφαδένες, καθώς και η αποτροπή επανεμφάνισής ή μετάστασής του. Η τοπική θεραπεία για τον μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού, περιλαμβάνει χειρουργική αφαίρεση και δειγματοληψία, ή αφαίρεση των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Επίσης εκτιμάται αν απαιτείται ακτινοθεραπεία μετεγχειρητικά. Η συστηματική θεραπεία μπορεί να απαιτείται πριν ή μετά την χειρουργική επέμβαση, ή και τα δύο. Ανάλογα τον υπότυπο του καρκίνου του μαστού επιλέγεται και η κατάλληλη συστηματική θεραπεία [21].

Όγκοι θετικοί σε ορμονικούς υποδοχείς: Συνήθως, χορηγείται ενδοκρινική θεραπεία στους όγκους που είναι θετικοί σε ορμονικούς υποδοχείς (HR+), με κάποιους να απαιτούν και χημειοθεραπεία. Κύρια μέθοδος αποτελεί η λήψη δια στόματος αντιοιστρογονικών φαρμάκων καθημερινώς για διάρκεια πέντε ετών. Οι επιλογές θεραπείας διαφέρουν για τις γυναίκες που βρίσκονται πριν ή μετά την εμμηνόπαυση [21].

1. **Θεραπεία σε γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση:** Η ταμοξιφαίνη είναι αποτελεσματική σε αυτή την κατηγορία ασθενών και δρα ως εκλεκτικός ρυθμιστής των οιστρογονικών υποδοχέων, αναστέλλοντας την πρόσδεση των οιστρογόνων σε αυτούς [21].
2. **Θεραπεία σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση:** Η ταμοξιφαίνη παραμένει αποτελεσματική και σε αυτή την κατηγορία. Επίσης διαθέσιμη θεραπεία αποτελούν και οι αναστολείς αρωματάσης (anastrozole, exemestane, letrozole) οι οποίοι μειώνουν τα επίπεδα των οιστρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος αναστέλλοντας την μετατροπή των αδρογόνων σε οιστρογόνα. Οι αναστολείς αρωματάσης είναι αποτελεσματικοί μόνο για γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση [21].

Ωστόσο, αν η γυναίκα βρίσκεται πριν την φάση της εμμηνόπαυσης θα πρέπει να αποφασιστεί αν θα γίνει καταστολή των ωοθηκών φαρμακευτικά με αγωνιστές της ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπινών (GnRH) όπως οι leuprolide acetate και goserelin, ή αν θα πραγματοποιηθεί ωοθηκεκτομή για χειρουργική επαγωγή της εμμηνόπαυσης. Η δεύτερη περίπτωση αντιμετωπίζεται όπως και οι φυσικά εμμηνοπαυσιακές γυναίκες [21].

Όσον αφορά το **χημειοθεραπευτικό σχήμα**, υπάρχουν αρκετά υποψήφια για τον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Σε γενικές γραμμές τα σχήματα docetaxel/cyclophosphamide, adriamycin/cyclophosphamide, και cyclophosphamide/ methotrexate/5-fluorouracil είναι καλές επιλογές για ασθενείς χαμηλότερου κινδύνου, όπου η τοξικότητα είναι σημαντικός παράγοντας. Χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιέχουν τόσο ανθρακυκλίνες (πχ. adriamycin) όσο και ταξάνες (πχ. adriamycin/cyclophosphamide ακολουθούμενες από taxane) επιτυγχάνουν μεγάλη μείωση του κινδύνου και ενδείκνυνται για ασθενείς υψηλού ρίσκου [21].

Όγκοι που ανήκουν στον HER2+ υπότυπο: στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται θεραπεία με trastuzumab, το οποίο είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την εξωκυτταρική επικράτεια του υποδοχέα ERBB2, ενώ συνδυάζεται και με χημειοθεραπεία. Τα δύο πιο συνήθη επικουρικά (χορηγούνται συμπληρωματικά ή προφυλακτικά μετά την χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία [58]) και νεοεπικουρικά (χορηγούνται πριν την κύρια επέμβαση με σκοπό την συρρίκνωση του όγκου) χημειοθεραπευτικά σχήματα είναι adriamycin/cyclophosphamidepaclitaxel και docetaxel/carboplatin (σε συνδυασμό με ενδοκρινική θεραπεία σε περίπτωση που ο όγκος είναι θετικός σε ορμονικούς υποδοχείς). Σε ασθενείς με υψηλού ρίσκου HER2+ καρκίνο του μαστού, χορηγούνται δύο ακόμα παράγοντες:

οι pertuzumab και neratinib. Το πρώτο είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την επικράτεια διμερισμού του ERBB2 υποδοχέα, ενώ το δεύτερο είναι μικρός σε μέγεθος αναστολέας κινάσης τυροσίνης πολλών μελών της οικογένειας των HER2 υποδοχέων [21].

Όγκοι που ανήκουν στον υπότυπο του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού: στην περίπτωση αυτή χορηγείται αποκλειστικά χημειοθεραπεία σε όγκους από 5mm και άνω, ακόμα και αν δεν υπάρχει μετάσταση στους λεμφαδένες [21].

Ωστόσο, αν ο **καρκίνος είναι μεταστατικός** ο κύριος θεραπευτικός στόχος είναι η αύξηση του προσδόκιμου ζωής και η ανακούφιση των συμπτωμάτων του ασθενή. Σε αυτό το στάδιο ο καρκίνος είναι μη ιάσιμος και χρησιμοποιούνται οι ίδιες κύριες θεραπείες που εφαρμόζονται και στην περίπτωση του μη μεταστατικού. Οι τοπικές μέθοδοι είναι κυρίως ανακουφιστικές παρά θεραπευτικές [21].

Συμπερασματικά, η έγκαιρη διάγνωση καθώς και η εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι άμεσες ανάγκες για την αποτελεσματική και αίσια αντιμετώπιση όλων των τύπων καρκίνου του μαστού.

1.4 PDK1 και καρκίνος

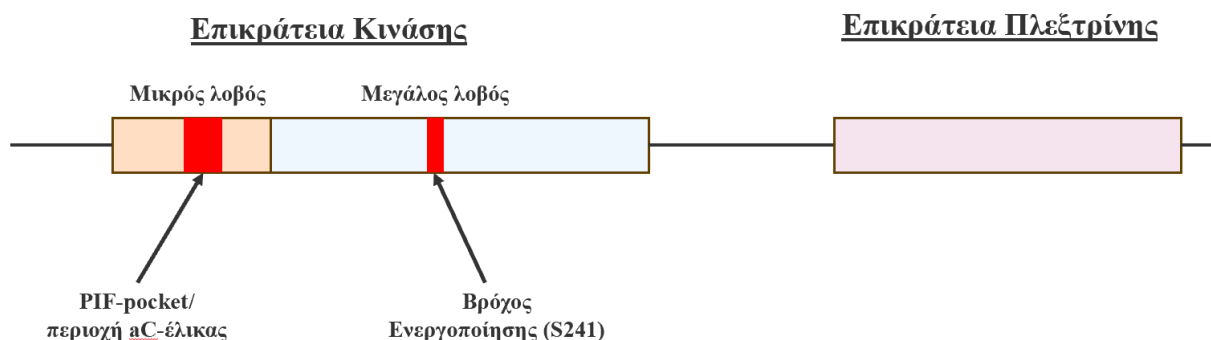
1.4.1 PDK1

1.4.1.1 Γενικές Πληροφορίες

Η PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/ πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από την 3-φωσφοινοσιτιδίδη), που εκφράζεται από το γονίδιο PDK1, είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης και έχει μέγεθος 556 αμινοξέων. Είναι ένα από τα πιο σημαντικά μέλη της οικογένειας των AGC κινασών, μίας ευρύτερης οικογένειας με τουλάχιστον 60 μέλη (εκ των οποίων και οι Akt, RSK, S6K, PKC, PKA) με ιδιαίτερη θεραπευτική δυναμική, ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού. Απομονώθηκε πρώτη φορά κατά το 1997 από σκελετικά μυϊκά κύτταρα κουνελιού ενώ έπειτα και σε HEK293 κύτταρα, που είναι αθανатоποιημένα ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα. Η PDK1 φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, μέσω μηχανισμών που είναι τόσο εξαρτώμενοι όσο και ανεξάρτητοι από την οδό PI3K/Akt. Συγκεκριμένα, εμπλέκεται στην ογκογένεση, την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, τη μετάσταση, την τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, καθώς και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε φάρμακα και θεραπείες [22].

Λόγω του γεγονότος ότι η PDK1 είναι μια ιδιόσυστατα ενεργή κινάση, ως τώρα δεν έχουν βρεθεί στο γονιδιό της ενεργοποιητικές μεταλλάξεις. Ωστόσο, σε πολλούς τύπους όγκων και ιδιαίτερα στις περισσότερες περιπτώσεις νεοπλασιών του μαστού παρατηρείται υπερέκφραση της PDK1, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις αποδίδεται σε αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου. Πέρα από τα δεδομένα έκφρασης, ισχυρές ενδείξεις για τον ρόλο της στην ογκογένεση προέρχονται από πειράματα υπερέκφρασης σε κυτταρικά μοντέλα καρκίνου μαστού, στα οποία αυξημένη έκφραση της PDK1 προάγει την ανάπτυξη ανεξάρτητη από προσκόλληση (anchorage independent growth), καθώς και τον σχηματισμό όγκων σε in vivo μοντέλα ανοσοκατεσταλμένων ποντικών οι οποίοι έχουν εμβολιασθεί με καρκινικά κύτταρα μαστού που υπερεκφράζουν την PDK1 [23].

Κύρια Δομή της PDK1



Εικόνα 7: Δομή της PDK1 (Δεδομένα από Paolo Armando Gagliardi et al. 2018).

1.4.1.2 Δομή της PDK1

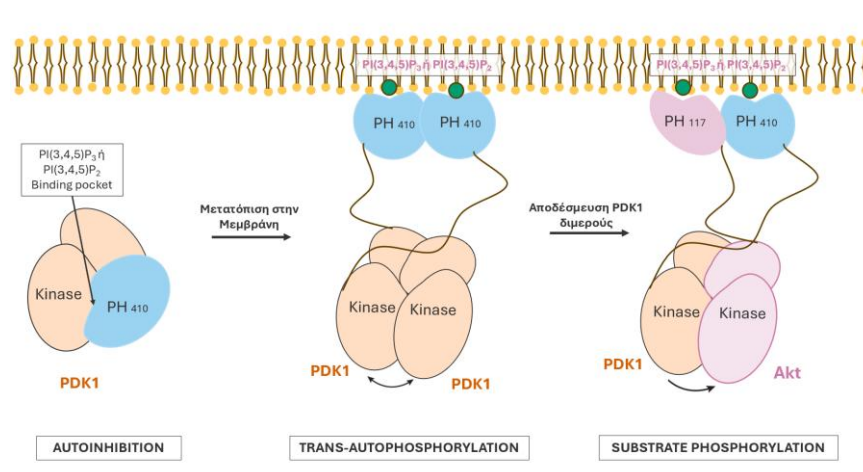
Η PDK1 είναι μία μεσαίου μεγέθους πρωτεΐνη (48 kDa), σφαιρική και διαλυτή, η οποία έως πρόσφατα θεωρούνταν κυρίως κυτταροπλασματική. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν και πιθανό ρόλο της στον πυρήνα, όπου φαίνεται να συμβάλλει στην ογκογένεση, είτε ενισχύοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε αναστέλλοντας την απόπτωση [22].

Δομικά, η PDK1 είναι μία κινάση με δίλοβη αναδίπλωση και συνεπώς συνίσταται από δύο λοβούς, έναν στην αμινοτελική περιοχή αποτελούμενο κυρίως από β-πτυχωτά φύλλα και έναν στην καρβοξυτελική της περιοχή αποτελούμενο κυρίως από α-έλικες. Το σημείο πρόσδεσης του ATP βρίσκεται ανάμεσα στους δύο λοβούς [24]. Δομικά, διαθέτει δύο βασικές λειτουργικές επικράτειες: 1) Την καταλυτική (ή T-loop) επικράτεια στην αμινοτελική περιοχή (θέσεις 71–359), υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση και ρύθμιση άλλων κινασών της οικογένειας AGC, όπως οι Akt, RSK, S6K και SGK και 2) την επικράτεια πλεξτρίνης (PH domain) στην καρβοξυτελική περιοχή (θέσεις 459–550), η οποία αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης όπως η φωσφατιδυλοϊνositόλη-(3,4)-διφωσφορική (PIP2) και η φωσφατιδυλοϊνositόλη(3,4,5)-τριφωσφορική (PIP3), καθώς και με πρωτεΐνες όπως η AMIGO2, διευκολύνοντας τη στρατολόγηση της PDK1 στη μεμβράνη και την ενεργοποίησή της [22].

1.4.1.3 Λειτουργία της PDK1

Η PDK1 αποτελεί μία ιδιόσυστατα ενεργή κινάση, με την ικανότητα να trans αυτοφωσφορυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο σερίνης το οποίο εντοπίζεται στο βρόχο ενεργοποίησης της (Ser241). Η φωσφορυλίωση αυτή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή της. Επιπλέον η φωσφορυλιωμένη Ser241 είναι δυσπρόσιτη σε φωσφατάσες, καθιστώντας έτσι την αποφωσφορυλίωση της δύσκολη συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ενεργούς κατάστασης της κινάσης. Η ρύθμιση της PDK1 περιλαμβάνει επίσης επιπρόσθετες τροποποιήσεις, όπως άλλες φωσφορυλιώσεις καθώς και ομο- ή ετεροδιμερισμούς οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πιο λεπτομερή ρύθμιση της PDK1. Παράλληλα, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαδραματίζει η περιοχή PIF-pocket, η οποία επιτρέπει την πρόσδεση

στο υδρόφοβο μοτίβο (hydrophobic motif, HM) αρκετών υποστρωμάτων της PDK1 και υποβοηθά την αλληλεπίδρασή τους [23, 24].



Εικόνα 8: Ενεργοποίηση της PDK1 μέσω τρας αυτοφωσφορυλίωσης. (Δεδομένα από Levina A. et al. 2022).

Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt από την PDK1 απαιτεί την πρόσδεση τους στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω αλληλεπίδρασης με την τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη(3,4,5) (PIP₃) της μεμβράνης η οποία παράγεται κατόπιν ενεργοποίησης της 3 κινάσης της φωσφοϊνοσιτίδης (phosphoinositide 3 kinase, PI3K). Η περιοχή πλεξτρίνης της PDK1 αναγνωρίζει την PIP₃ και επιτρέπει την στρατολόγησή της στη μεμβράνη. Κατά παρόμοιο τρόπο στρατολογείται και η Akt στην κυτταρική μεμβράνη και έτσι οι δύο κινάσες προσεγγίζουν η μία την άλλη με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της Akt από την PDK1 στην T308 του T-βρόχου της και επακόλουθη ενεργοποίησή της [24].

Ωστόσο, η PDK1 δεν ρυθμίζει όλα τα υποστρώματά της με τον ίδιο τρόπο καθώς δεν στρατολογούνται όλα στην κυτταρική μεμβράνη. Για παράδειγμα οι κινάσες της οικογένειας AGC όπως οι S6K, RSK και SGK απαιτούν προηγούμενη φωσφορυλίωση στο υδρόφοβο μοτίβο καρβοξυτελικής τους περιοχής, γεγονός που επιτρέπει στη συνέχεια την αλληλεπίδραση με την PIF-pocket της PDK1 και επακόλουθη φωσφορυλίωσή τους. Οι κινάσες που καταλύουν αυτή την αρχική φωσφορυλίωση στο HM παραμένουν δεν είναι γνωστές, ωστόσο η ενεργοποίησή τους φαίνεται να εξαρτάται από το μονοπάτι PI3K [24].

Πέρα από κινάσες της AGC οικογένειας η PDK1 φωσφορυλιώνει και άλλες πρωτεΐνες όπως η p21 ενεργοποιούμενη κινάση (PAK), η polo-like kinase 1 και η β3-ιντεγκρίνη. επίσης ανεξαρτήτως της καταλυτικής της δραστηριότητας, η PDK1 ρυθμίζει καθοδικούς τελεστές όπως η Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK1) και η Myotonic Dystrophy Kinase-Related Cdc42-Binding Kinase alpha (MRCKa) [23].

1.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκεται η PDK1

1.4.2.1 Μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR

Το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR είναι ένα περίπλοκο και θεμελιώδες μονοπάτι το οποίο ρυθμίζει κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες όπως: ο μεταβολισμός, η κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η αγγειογένεση [25]. Υπερενεργοποίηση του μονοπατιού παρατηρείται σχεδόν σε όλους τους συμπαγείς όγκους ενώ έχει καταγραφεί απορρύθμιση διαφόρων συστατικών του σε ποικίλους τύπους καρκίνου [26].

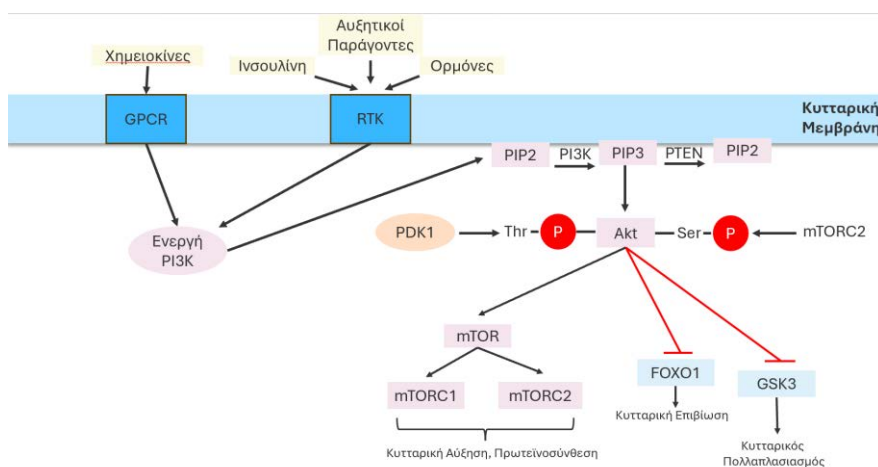
Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αρχίζει με τη δέσμευση αυξητικών παραγόντων ή ορμονών σε έναν μεμβρανικό υποδοχέα όπως οι υποδοχείς-κινάσες τυροσίνης (RTKs) ή υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες (GPCRs) [25]. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης PI3K (phosphoinositide 3 kinase/3 κινάση της φωσφοϊνοσιτίδης), η οποία καταλύει τη μετατροπή της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (3,4) PIP2 σε τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (3,4,5) PIP3 [26]. Η PIP3 έχει την ιδιότητα να στρατολογεί δύο πρωτεΐνες που διαθέτουν επικράτειες ομόλογες της πλεξτρίνης (PH domains) στην κυτταρική μεμβράνη: την Akt και την PDK1 [25].

Η PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση της Akt. Αφού η Akt προσδεθεί στην PIP3 και τροποποιηθεί αρχικά από το σύμπλοκο mTORC2 (mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) στη θέση Ser473, η PDK1 την φωσφορυλιώνει στη θέση Thr308, οδηγώντας στην πλήρη ενεργοποίησή της κινάσης [25]. Η ενεργοποιημένη Akt ρυθμίζει μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων που σχετίζονται με την επιβίωση, την ανάπτυξη, τη μεταβολική δραστηριότητα και την αναστολή της απόπτωσης [25].

Μεταξύ των βασικών στόχων της Akt περιλαμβάνονται οι:

- TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), της οποίας η φωσφορυλίωση οδηγεί σε ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1, προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη και τη σύνθεση πρωτεϊνών [25, 26],
- GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3), που όταν αναστέλλεται, αυξάνεται η σύνθεση γλυκογόνου και προάγεται η κυτταρική επιβίωση [26],
- BAD (Bcl-2-associated death promoter), με αντι-αποπτωτική δράση όταν φωσφορυλιώνεται [27],
- και τους κυτταρικούς αναστολείς του κύκλου p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) και p27 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), επηρεάζοντας την κυτταρική πρόοδο και τον πολλαπλασιασμό [27].

Συνεπώς, η PDK1, ενεργοποιώντας την Akt, λειτουργεί ως βασικός ρυθμιστής πολλαπλών κρίσιμων σηματοδοτικών αξόνων. Η θέση της σε αυτό το δίκτυο καθιστά την PDK1 δυνητικό θεραπευτικό στόχο σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται, υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR.

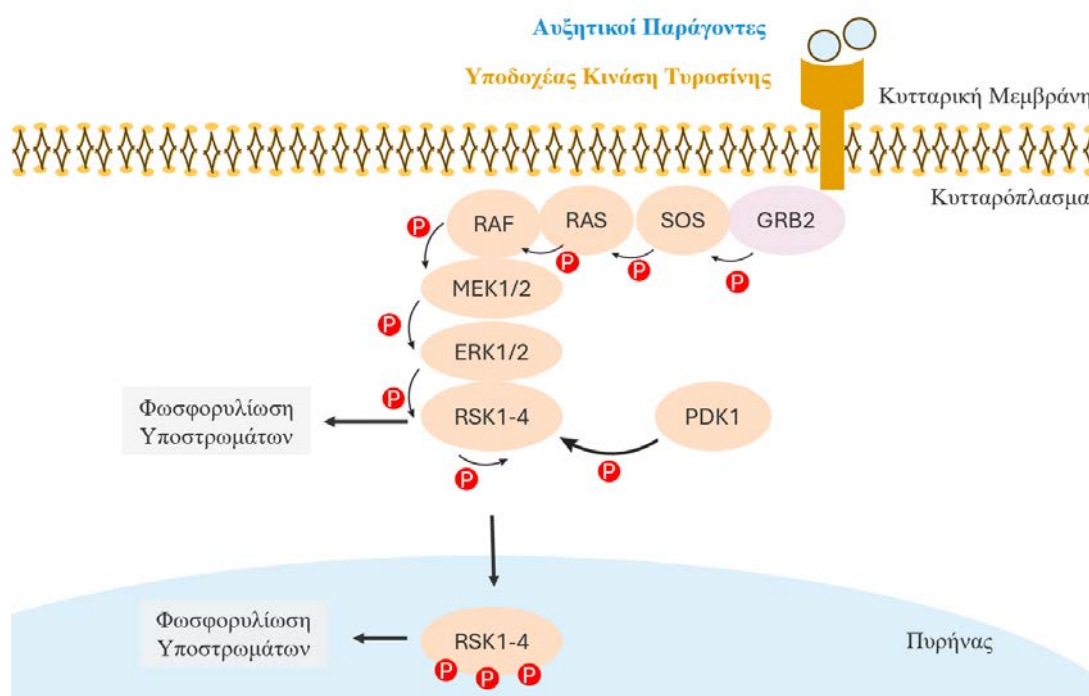


Εικόνα 9: Μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR. (Δεδομένα από Miricescu D. et al. 2020).

1.4.2.2 Μονοπάτι RAS/MAPK

Το μονοπάτι Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), γνωστό και ως Ras/Raf/MEK/ERK διαδραματίζει καίριο ρόλο σε πλήθος φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της καρκινογένεσης. Είναι υπεύθυνο για την μεταφορά εξωκυτταρικών μηνυμάτων προς το ενδοκυτταρικό περιβάλλον ενώ ρυθμίζει κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, η διαφοροποίηση, η μίτωση, η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση [28].

Η ενεργοποίησή του ξεκινά με την πρόσδεση αυξητικών παραγόντων ή κυτοκινών σε υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης της μεμβράνης, προκαλώντας τον διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση τους [29]. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της GTPάσης Ras, μέσω του συμπλόκου GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) -SOS (Son-of-Sevenless), το οποίο προάγει την ανταλλαγή GDP με GTP στη Ras [29]. Έτσι η ενεργοποιημένη Ras, οδηγεί στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίησή της πρωτεΐνης RAF, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την κινάση MEK1/2 (MAPKK) [29]. Η MEK ενεργοποιεί την ERK1/2 (MAPK), η οποία μετατοπίζεται στον πυρήνα ή δρα στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνοντας διάφορους στόχους [29].

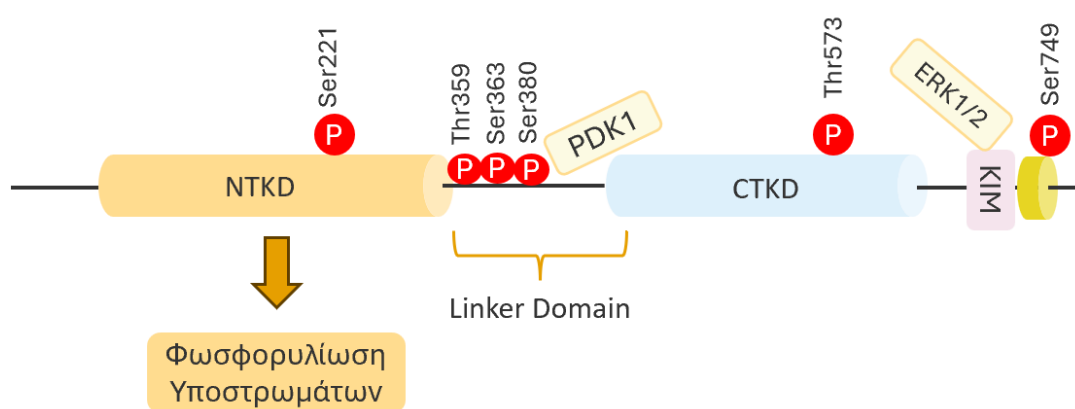


Εικόνα 10: Μονοπάτι Ras/MAPK/MEK και RSK. (Λεδομένα από Koutsougianni F. et al. 2023)

Ένας σημαντικός καθοδικός στόχος της ERK1/2 είναι η RSK (Ribosomal S6 Kinase), μια κινάση σερίνης/θρεονίνης με δύο ενεργές καταλυτικές περιοχές, την καρβοξυτελική περιοχή που είναι μέλος της οικογένειας των CAMK κινασών, και την αμινοτελική επικράτεια κινάσης (NTKD) που είναι μέλος της οικογένειας των AGC κινασών, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μια περιοχή συνδέτη (linker domain) [30]. Οι RSKs συμμετέχουν σε διεργασίες όπως η κυτταρική επιβίωση, η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός. Κομβικό ρόλο στην ενεργοποίηση των κινασών αυτών διαδραματίζει η κινάση PDK1, η οποία είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της κινάσης [30].

Συνοπτικά, η ενεργοποιημένη ERK1/2 φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα κατάλοιπα στην καρβοξυτελική επικράτεια της RSK (T573), οδηγώντας σε αυτοφωσφορυλίωση της κινάσης στο κατάλοιπο Ser380 στη περιοχή συνδέτη [30]. Αυτή η φωσφορυλίωση δημιουργεί σημείο πρόσδεσης για την PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1), η οποία προσδένεται μέσω της επικράτειας PIF-pocket και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο Ser221 στην αμινοτελική περιοχή της RSK, οδηγώντας στην πλήρη ενεργοποίησή της [30]. Στο συγκεκριμένο πλαίσιο, η ενεργοποίηση της PDK1 είναι ανεξάρτητη από την PI3K/Akt, γεγονός που υπογραμμίζει τον ευρύτερο ρυθμιστικό ρόλο της PDK1 σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, πέραν του PI3K [30].

Δομή της RSK



Εικόνα 11: Δομή της RSK. (Δεδομένα από Koutsougianni F. et al. 2023)

1.5 Στόχευση της PDK1

1.5.1 Φαρμακολογικοί αναστολείς της PDK1

Πλήθος δεδομένων υποδεικνύουν ότι η PDK1 διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην ογκογένεση, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η φαρμακολογική αναστολή της μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων [31].

Η μεγαλύτερη κατηγορία αναστολέων της PDK1 που έχουν αναπτυχθεί είναι μικρά μόρια που ανήκουν στην τάξη αναστολέων που ανταγωνίζονται για την θέση πρόσδεσης του ATP. Αυτοί οι τύποι αναστολέων ωστόσο συχνά εμφανίζουν περιορισμένη εκλεκτικότητα, επηρεάζοντας και άλλες κινάσες. Πέραν αυτών, έχουν περιγραφεί δυο επιπλέον κατηγορίες αναστολέων: α) αναστολείς που προσδένονται αλλοστερικά στο PIF pocket και β) αναστολείς που στοχεύουν την RH επικράτεια (επικράτεια πλεξτρίνης) [31]. Ενδεικτικά παρατίθενται παρακάτω μερικά μόρια της κάθε κατηγορίας:

Μόρια προσδενόμενα στην θέση πρόσδεσης του ATP

OSU-03012 και OSU-03013: Πρόκειται για δύο μικρομοριακές ενώσεις που δημοσιεύτηκαν πρώτη φορά το 2004 και αναπτύχθηκαν βάσει της δομικής βελτιστοποίησης του μορίου celecoxib [32]. Ο OSU-03012 έχει παρατηρηθεί πως επάγει την απόπτωση σε κύτταρα πρωτοπαθούς χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, κύτταρα γλοιοβλαστώματος, κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου αλλά και καρκίνου του μαστού [33]. Όσον αφορά τον OSU-03013 επάγει G1 arrest και απόπτωση σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη μέσω σηματοδότησης PDK1/Akt. Επίσης στον καρκίνο του μαστού επέδειξε υψηλή κυτταροτοξικότητα ειδικά για τον τύπο HER2-overexpressing [34].

BX-912, BX-320, BX-795: Τα μόρια αυτά, διαθέτουν έναν σκελετό αμινοπυριμιδίνης μέσω του οποίου μπορούν και μπλοκάρουν την θέση πρόσδεσης του ATP της PDK1. Πιο συγκεκριμένα, οι BX-912 και BX-320 ανέστειλαν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-468 κυττάρων και επίσης φάνηκε να επάγουν επί 12 φορές την ενεργότητα των κασπασών 3 και 7 μετά από επώαση 48 ωρών, που σημαίνει ότι πιθανώς επάγεται και η διαδικασία της απόπτωσης. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα οι δύο αυτοί αναστολείς δρουν ανασταλτικά ως προς την ανάπτυξη των MDA-468 μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G2/M [35]. Ωστόσο, αν και ενώ αρχικά τα μόρια αυτά που ανακαλύφθηκαν από ερευνητές της Berlex Biosciences, θεωρήθηκαν εκλεκτικοί αναστολείς της PDK1, μετέπειτα στοιχεία υποδεικνύουν ότι δρουν ανασταλτικά και σε άλλες κινάσες [32]. Ο BX-912 είναι ο αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία.

BX-517: Χαρακτηρίστηκε ως ιδιαίτερα ικανός αναστολέας της PDK1. Διαθέτει περίπου 320 φορές εκλεκτικότητα για την PDK1 σε σχέση με την Pka και 100 φορές σε σχέση με άλλες 7 κινάσες τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης. Πιο συγκεκριμένα, ο πυρήνας πυρρόλης ινδολινόνης σχηματίζει 3 δεσμούς υδρογόνου στην περιοχή δέσμευσης του ATP της επικράτεια κινάσης με αποτέλεσμα να ανταγωνίζεται το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου. Παρά την ανασταλτική του ικανότητα ο BX-517 διαθέτει κακό φαρμακοκινητικό προφίλ, όπως μικρό χρόνο ημιζωής, χαμηλή σταθερότητα και κακή διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα [36].

GSK2334470: Ανακαλύφθηκε το 2011 από την GlaxoSmithKline εκ των αρχικών της οποίας έχει λάβει και το όνομά του. Η ένωση αυτή επέδειξε εξαιρετική εκλεκτικότητα για την PDK1 ακόμα και σε σύγκριση με άλλες 13 κινάσες της οικογένειας AGC, αλλά και με άλλες που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο όπως η Aurora A και η Aurora B [32]. Συγκεκριμένα, μελέτες υποδεικνύουν ότι ο GSK2334470 όχι μόνο αναστέλλει την ενεργοποίηση της Akt από την PDK1 αλλά και την αυτοφωσφορυλίωση της ίδιας της PDK1 [22].

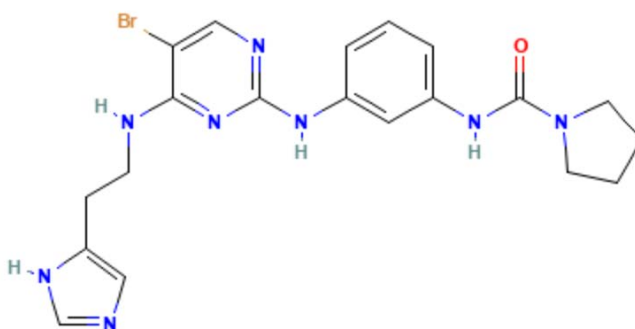
Μόρια που προσδένονται αλλοστερικά στο PIF pocket

PDK1-IN-RS2: Πρόκειται για ένα πεπτιδίο που προσομοιάζει το μοτίβο πρόσδεσης του PIF και δρα έτσι ως ένας εκλεκτικός αναστολέας της PDK1. Η σουλφονυλομάδα του αλληλεπιδρά μέσω της Asp16 του πεπτιδίου με την Arg131 της PDK1 μέσω ενός δεσμού άλατος, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι η σουλφοναμίδα ιονίζεται υπό συνθήκες κρυσταλλοποίησης. Αν και αυτή η αλληλεπίδραση διεγείρει την ενεργότητα της PDK1 ως προς την φωσφορυλίωση μικρών πεπτιδικών υποστρωμάτων, εν τέλει παρεμποδίζει την κίνηση να φωσφορυλιώσει άλλα μεγαλύτερα σε μέγεθος πρωτεϊνικά υποστρώματα όπως οι S6K, SGK και RSK [37].

Μόρια που αγωνίζονται για πρόσδεση στην επικράτεια πλεξτρίνης

PHT-427: Η ένωση αυτή αναπτύχθηκε με σκοπό να αναστέλλει μέσω πρόσδεσης στην PH επικράτεια (επικράτεια ομολογίας πλεξτρίνης). Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να προσδένεται στις επικράτειες αυτές τόσο στην Akt αλλά και στην PDK1. Επίσης έχει βρεθεί πως διαθέτει υψηλή αντικαρκινική δράση σε καρκίνο του παγκρέατος αλλά και του μαστού, ενώ σε καρκίνους μαστού και πνεύμονα προάγει την απόπτωση και εμφανίζει ακόμα μεγαλύτερη αντικαρκινική δραστηριότητα όταν συγχρησιμοποιείται με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [38].

1.5.1.1 BX-912



Εικόνα 12: Χημική δομή του BX-912. PubChem Identifier: **CID 11754511**
URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bx-912>

Ο BX-912 είναι ένα μικρό χημικό μόριο που χαρακτηρίστηκε από την ομάδα του Feldman et al. το 2005. Σκοπός της σύνθεσής του ήταν η αναστολή της PDK1, η οποία είναι κρίσιμη στις σηματοδοτικές οδούς PI3K/PDK1/Akt και Ras/MAPK. MEK που εμπλέκονται σε αρκετούς τύπους καρκίνου [35].

Ο χημικός του τύπος είναι $C_{20}H_{23}BrN_8O$, ενώ η πλήρης χημική του ονομασία N-(3-(4-(2-(1Hιμιδαζολ-5-υλ)αιθυλαμινο)-5-βρωμοπυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλ)πυρρολιδίνη-1καρβοξαμίδη. Διατίθεται σε μορφή λευκής σκόνης η οποία είναι διαλυτή ως και σε συγκέντρωση 100 Mm σε DMSO, ενώ είναι αδιάλυτη σε νερό [39].

Το μόριο βασίζεται σε μία αμινοπυριμιδινική δομή και θεωρείται ως ένας ισχυρός και εκλεκτικός ανταγωνιστικός αναστολέας της PDK1, με IC₅₀ περίπου 26 nM [39]. Δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο δέσμευσης ATP της PDK1, εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης AKT και άλλων υποστρωμάτων της [35].

Το BX-912 παρουσιάζει τουλάχιστον 20 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την PDK1 σε σχέση με άλλες κινάσες, όπως την PKA όπου η εκλεκτικότητα του για την PDK1 είναι περίπου 9 φορές μεγαλύτερη. Επίσης, αναστέλλει ισχυρά την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων, όπως τα PC-3 (καρκίνος προστάτη) και MDA-468 (καρκίνος μαστού), ιδιαίτερα σε συνθήκες όπου τα κύτταρα δεν είναι προσκολλημένα (soft agar). Παράλληλα, προκαλεί μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M [35].

Η ικανότητά του να μπλοκάρει την οδό PDK1/AKT το καθιστά υποσχόμενο εργαλείο για τη μελέτη της σηματοδότησης αυτής της οδού και πιθανό υπόστρωμα για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών θεραπειών.

1.5.2 Μετα-μεταγραφική αποσιώπηση με τη χρήση siRNA

Η RNAi (RNA interference) είναι μία ενδογενής διεργασία των κυττάρων βάσει της οποίας μπορεί να επιτευχθεί γονιδιακή αποσιώπηση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο [59]. Παρουσία μικρών δίκλωνων μορίων RNA, τα miRNA (micro RNA) που έχουν μήκος περίπου 21-25 ζεύγη βάσεων, επάγεται ο μηχανισμός της RNAi. Αρχικά αυτά συνδέονται στο RISC (RNA-induced silencing complex), ένα ειδικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο, αφαιρεί τον έναν κλώνο του δίκλωνου miRNA μέσω της Argonaut 2 (AGO2), και έπειτα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου και αν βρεθούν μόρια RNA με συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων με το miRNA που φέρει το προσδένει πάνω του και το καταστρέφει. Συνήθως αυτό επιτυγχάνεται από το RISC διασπώντας το συμπληρωματικό RNA σε μικρότερα κομμάτια τα οποία δεν διαθέτουν πλέον την αρχική τους χρησιμότητα (μετάφραση σε πρωτεΐνη). Με την ολοκλήρωση της παραπάνω διεργασίας, το RISC μπορεί να επαναλάβει την διαδικασία αναστέλλοντας έτσι σε ικανοποιητικό βαθμό την παραγωγή της πρωτεΐνης[60].

Η RNAi αποτελεί έναν αρχέγονο μηχανισμό άμυνας ο οποίος πρώτη φορά παρατηρήθηκε στον *Caenorhabditis elegans* την δεκαετία του 1990 ενώ το 1998 δημοσιεύτηκε το πρώτο άρθρο που αφορούσε αυτό το φαινόμενο στο περιοδικό Nature με τίτλο «Potent and Specific genetic interference by double -stranded RNA in *C.elegans*» [61]. Η ανακάλυψη αυτής της ενδογενούς διεργασίας μετέπειτα από τους Andrew Z. Fire και Craig C. Mello το 2006 έδωσε την ευκαιρία στην επιστήμη να χρησιμοποιήσει αυτό τον μηχανισμό, εισάγοντας συνθετικά siRNA (small interfering RNA) τα οποία είχαν την δυνατότητα να αποσιωπήσουν την έκφραση ενός γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, τα siRNA διαθέτουν συμπληρωματική αλληλουχία με αυτή του mRNA στόχου και έτσι με τον μηχανισμό που ήδη περιεγράφηκε το τελευταίο καταστρέφεται, αποτρέποντας την μετάφρασή του [59].

Κάποια από τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας αποτελούν: 1) τα siRNA δεν δρουν σε χρωμοσωμικό DNA καθώς η παρεμβολή γίνεται εκτός του πυρήνα, 2) τα siRNA μπορούν να επιτύχουν θεωρητικά την καταστολή της έκφρασης οποιουδήποτε γονιδίου, εφόσον έχουν σχεδιαστεί κατάλληλα, κάτι ως τώρα μη εφικτό από πολλά κλασσικά φάρμακα [62].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε χρήση ειδικά σχεδιασμένου siRNA σκοπό τη αποσιώπηση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη την PDK-1. Σκοπός αυτής της τροποποίησης είναι η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της σίγησης της PDK1 στην αύξηση των κυττάρων MDA-MB-231 τόσο μετα-μεταγραφικά όσο και φαρμακολογικά.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της αναστολής της κινάσης PDK1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231, τόσο φαρμακολογικά με τον αναστολέα BX-912 όσο και μετα-μεταγραφικά με μεθοδολογίες μοριακής βιολογίας (RNAi). Επιπλέον διερευνάται η επίδραση της αναστολής στον κυτταρικό κύκλο, αλλά και στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων.

2. ΥΛΙΚΑ/ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αναλώσιμα

Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια της καρκινικής σειράς MDA-MB-231	Προέλευση
Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640	Gibco, κωδικός:2194780
Αδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS: Fetal bovine serum)	PanBiotec, κωδικός: P30-3306
L-γλουταμίνη	Gibco, κωδικός: 2165253
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	Gibco, κωδικός: 2145465
Θρυψίνη	Gibco, κωδικός: 15090-046

Πίνακας 1: Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των MDA-MB-231

Πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν	Προέλευση
Φλάσκες T75 (επιφάνειας 75 cm ²)	Thermo Scientific, κωδικός:169389
Πιπέτες των 5 ml	Corning Costar Incorporated, κωδικός: 4051
Φιαλίδια των 10 ml (Falcon)	Corning, κωδικός: 430921
Φιαλίδια του 1,5 ml (Eppendorfs)	Thermo Scientific, κωδικός: 3456
Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials)	Corning, κωδικός: 430487
Σύριγγες των 5 ml	Bio Medical Distribution Integrity, κωδικός: 2021031005
Πιάτο 96 θέσεων	Corning Costar Incorporated, κωδικός: 4051
Πιάτα καλλιέργειας	Greiner Bio-One, κωδικός: E220435K

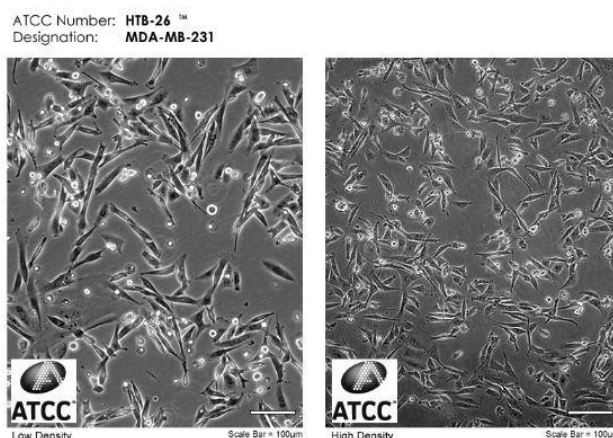
Πίνακας 2: Πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν

Επιπλέον αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων	Προέλευση
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	ThermoFisher Scientific, κωδικός: 0N013586
BX-912	MedChem Express, κωδικός: HY-11005
BX-517	MedChem Express, κωδικός: HY-13842
PDK1-IN-RS2	MedChem Express, κωδικός: HY-114645
GSK2334470	MedChem Express, κωδικός: HY-14981
Control siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology, κωδικός: SC-37007
FlexiTube siRNA Hs_PDPK1_8	QIAGEN, κωδικός: SI00605780
Opti-Mem TM	Gibco TM , κωδικός: 31985062
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific: 11668-030
Διάλυμα NaCl	Demo ABEE, κωδικός: 2107757
Απιονισμένο H ₂ O	Demo ABEE, κωδικός: 2006777
Trypan Blue	Gibco, ThermoFisher Scientific, κωδικός: 15250-061

PBS 1X	bioSera, κωδικός: MS00HR100N
Κιτρικό	SIGMA, κωδικός: BCBF2311V
PI	SIGMA, κωδικός: BCCB3059
RIPA	Cell signaling, κωδικός: 9806S
RNase A	Macherey-Nagel, κωδικός: 740505.50
Protease Inhibitor	Cell signaling, κωδικός: 5872S
Αλβουμίνη	Thermo, κωδικός: 23227
Pierce™ BCA Protein Assay kit	Thermo, κωδικός: 23227
Μάρτυρας (ProSieve QuadColor Protein Marker)	Lonza, κωδικός: 00193837
Acrylamide	Serva, κωδικός: 10687.01
Triton X-100	AppliChem, κωδικός: 56897
APS 10% (Ammonium peroxodisulfate)	Serva, κωδικός: 131055
TEMED	Sigma, κωδικός: BCBV7969
Tris (0,5M), pH=6,8	PanReac AppliChem, κωδικός: 0M013429
SDS 20% (sodium dodecyl sulfate)	PanReac AppliChem, κωδικός: 1H012254
Γλυκερόλη	PanReac AppliChem, κωδικός: 1Y012251
Μπλε βρωμοφαινόλης	Sigma, κωδικός: B0124-5G
Ακρυλαμίδιο (30%)	Serva, κωδικός: 10687.01
SDS 10% (sodium dodecyl sulfate)	Sigma, κωδικός: SLBL3120V
Μεθανόλη	HPLC grade, κωδικός: CLOO.1363.2500
Tween 20 0,1%	Fisher Scientific, κωδικός: 126796
TrisBase (Trizma Base)	SIGMA, κωδικός: SLBZ6109
Γλυκίνη	Applichem, κωδικός: OEO11237
Μεμβράνη PVDF (Immobilon-PSQ Transfer Membrane)	Merck Millipore, κωδικός: ISEQ85R
Ponceau	AppliChem, κωδικός: 5J003858
Coomassie Brilliant Blue G	Acros Organics, κωδικός: A019889501
Acetic acid	Fluka, κωδικός: 45731
Clarity Western ECL Substrate	Biorad, κωδικός: 170-5060
SRB	SIGMA, κωδικός: S9012
Οξικό οξύ	Fluka, κωδικός: 45731

Πίνακας 3: Αναλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

2.2 Κυτταρική σειρά



Εικόνα 13: Κυτταρική σειρά MDA-MB-231. ATCC

Προκειμένου να διεκπεραιωθούν τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MDA-MB-231. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά με προέλευση από ιστό τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, επιθηλιακού τύπου και μορφολογίας. Δημιουργήθηκε από ένα μόνο δείγμα πλευριτικής συλλογής που αποκτήθηκε στις 17 Οκτωβρίου του 1973, από μία λευκή καυκάσια γυναίκα 51 ετών η οποία έπασχε από μεταστατικό αδеноκαρκίνωμα μαστού. [40]. Φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια TP53 και KRAS ενώ εκφράζουν EGF (epidermal growth factor) και TGF-α (transforming growth factor alpha) [41, 42]. Είναι ανευλοειδή κύτταρα με εύρος αριθμού χρωμοσωμάτων από 52 ως και 68,. Τα χρωμοσώματα N8 και N15 απουσιάζουν [41].

2.3 Συνθήκες Καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των κυττάρων MDA-MB-231 πραγματοποιήθηκε σε πλαστικές αποστειρωμένες φλάσκες, μεγέθους εμβαδού είτε 25 cm² ή 75 cm². Η σύσταση του θρεπτικού μέσου στο οποίο αναπτύχθηκαν παρουσιάζεται στον κάτωθι πίνακα:

Σύσταση Θρεπτικού Μέσου Κυτταροκαλλιιεργειών
RPMI
5% FBS
1% Pen-Strep
1% L-γλουταμίνη

Πίνακας 4: Σύσταση θρεπτικού μέσου κυτταροκαλλιιεργειών.

Αρχικά, το RPMI είναι ένα μέσο που περιέχει πολύτιμα συστατικά για την σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Κάποια από αυτά είναι ένας αναγωγικός παράγοντας, η γλουταθειόνη, η βιταμίνη B-12, η βιοτίνη αλλά και το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ, που δεν συναντώνται σε άλλα θρεπτικά μέσα. Πέρα από αυτά, περιέχει σε ικανοποιητική συγκέντρωση και τις βιταμίνες

ινοσιτόλη και χολίνη, ενώ κρίσιμο για την διατήρηση του φυσιολογικού PH σε περιβάλλον με 5-10% CO₂ είναι το διττανθρακικό νάτριο. Το RPMI είναι κατάλληλο για φυσιολογικές αλλά και καρκινικές καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών, όπως οι HeLa, MCF-7 και MDA-MB-231. Ωστόσο, αν και περιέχει πολλά απαραίτητα συστατικά, δεν περιέχει λιπίδια, αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες. Προκειμένου να εξισορροπηθεί αυτή η απώλεια και να εξασφαλιστεί η σωστή ανάπτυξη των κυττάρων στην καλλιέργεια προστίθεται ο αδρανοποιημένος ορός βοοειδούς [43].

Ο αδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοοειδούς (Fetal Bovine Serum-FBS), περιέχει έναν αριθμό παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη, την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα στις καλλιέργειες κυττάρων και ιστών. Σύμφωνα με έρευνες θεωρείται πως κατά προσέγγιση στον ορό περιέχονται 1.800 πρωτεΐνες και περισσότερο από 4.000 μεταβολίτες [44].

Η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη είναι αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στις *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες για αποφυγή των μολύνσεων από μικροοργανισμούς όπως μύκητες και βακτήρια που θα απέτρεπαν την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων την καλλιέργειας [45].

Η L-γλουταμίνη είναι ένα αμινοξύ που προστίθεται ως συμπλήρωμα σε θρεπτικά μέσα καλλιέργειας. Επιτελεί ρόλο εναλλακτικής πηγής ενέργειας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις κυττάρων που διαιρούνται με υψηλούς ρυθμούς, όπως τα καρκινικά. Επίσης συμβάλλει στην σύνθεση νουκλεοτιδίων, αμινοξέων, γλουταθειόνης και L-γλουταμικού, αλλά και στην παραγωγή γλυκόζης και πρωτεϊνών [46].

Το θρεπτικό μέσο μετά την προσθήκη των παραπάνω συμπληρωμάτων και αντιβιοτικών διατηρείται στους 4°C, ενώ πριν την χρήση του στις καλλιέργειες κυττάρων θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 37°C.

Η επώαση των κυττάρων MDA-MB-231 πραγματοποιείται σε κλίβανο σε συνθήκες που θεωρείται ότι προσομοιάζουν σε ικανοποιητικό βαθμό τις συνθήκες του εσωτερικού του ανθρώπινου σώματος. Πιο συγκεκριμένα, διατηρείται σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, καθώς και σταθερή παροχή CO₂ 5% ενώ τα επίπεδα της υγρασίας βρίσκονται στο 95%.

2.4 Κανόνες Υγιεινής

Πριν την διεξαγωγή οποιουδήποτε πειράματος είναι απαραίτητο να εξασφαλιστεί η τήρηση των κανόνων υγιεινής, ώστε να επιτυγχάνεται τόσο η ασφάλεια του εργαστηριακού προσωπικού όσο και η ασφάλεια και αξιοπιστία των πειραμάτων. Έτσι, κατά την διενέργεια των πειραμάτων αξιοποιήθηκαν τα μέτρα ατομικής προστασίας, δηλαδή η χρήση εργαστηριακής ποδιάς και γαντιών, αλλά τηρήθηκε τακτικά και ο καθαρισμός όλων των επιφανειών του εργαστηρίου και των εργαστηριακών πάγκων με διάλυμα αιθανόλης 70%. Όλα τα πειράματα και οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο κάθαρης νηματικής ροής, ο οποίος αποστειρωνόταν πριν και μετά από κάθε πείραμα με χρήση UV υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα πλαστικά φιαλίδια, οι φλάσκες, οι πιπέτες αλλά και τα multi-well plates ήταν αποστειρωμένα και προορίζονταν για μία μόνο χρήση και έπειτα απορρίπτονταν. Τέλος, εξασφαλίστηκε η καθαριότητα του επωαστικού κλιβάνου, αλλά και όλων των υπόλοιπων συσκευών που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά. Όλα τα εργαλεία όπως η πλάκα Neubauer και η ηλεκτρική πιπέτα απολυμαίνονταν με διάλυμα αιθανόλης 70% τόσο πριν όσο και μετά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Κατά αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η αποφυγή μολύνσεων των καλλιέργειών των κυττάρων.

2.5 Ανανέωση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Η ανανέωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας είναι απαραίτητη ενέργεια κατά την καλλιέργεια των κυττάρων μετά από διάστημα μερικών ημερών από την έναρξή της. Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους: ο πρώτος είναι η αποφυγή της εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για την σωστή ανάπτυξη και επιβίωση της καλλιέργειας, και ο δεύτερος είναι η απόρριψη βλαβερών και ανεπιθύμητων προϊόντων του μεταβολισμού των κυττάρων που μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργία και την βιωσιμότητά τους. Επομένως πρωταρχικός στόχος είναι η εξασφάλιση των βέλτιστων συνθηκών.

Τα βήματα που ακολουθούνται για την ανανέωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε φιάλη 75 cm² είναι τα εξής: 1) απόχυση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού μέσου από την φλάσκα, 2) προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-γλουταμίνη).

2.6 Ανακαλλιέργεια/Θρυψινοποίηση

Μετά από κάποιο σημείο, όταν τα κύτταρα της καλλιέργειας επεκταθούν ως και στο 80% της επιφάνειας της φλάσκας (confluency), είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Κατά την διαδικασία αυτή γίνεται χρήση του ενζύμου θρυψίνης και κατά συνέπεια η διαδικασία αυτή ονομάζεται και θρυψινοποίηση. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να αποφευχθούν οι αρνητικές συνέπειες της υπερβολικής συσσώρευσης των κυττάρων στην φλάσκα, μειώνοντας τον αριθμό τους σε αυτή. Κάποιες από αυτές είναι ο θάνατος των κυττάρων λόγω αυξημένου ανταγωνισμού μεταξύ τους για θρεπτικά συστατικά, η υπερβολική συσσώρευση ανεπιθύμητων αποβλήτων του μεταβολισμού τους και η έλλειψη χώρου που αποτρέπει την σωστή διάταξη και ανάπτυξή τους.

Όπως αναφέρθηκε, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η θρυψινοποίηση είναι απαραίτητη η θρυψίνη, ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που επιτυγχάνει να αποκολλά τα προσκολλημένα κύτταρα από τον πάτο της φλάσκας. Πιο συγκεκριμένα είναι μία παγκρεατική πρωτεάση που δρα στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη, διασπώντας έτσι τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των κυττάρων [47]. Φυλάσσεται και αυτή σε θερμοκρασία 4°C και πριν από την χρήση της θερμαίνεται σε υδατόλουτρο.

Το ακριβές διάστημα μεταξύ της κάθε ανακαλλιέργειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον χρόνο διπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς αλλά και από τις ανάγκες και απαιτήσεις των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα για την ολοκλήρωση της διαδικασίας σε πλαστικές φλάσκες 75 cm² είναι τα εξής:

1. Απόχυση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού από την φλάσκα.
2. Πλύση της φλάσκας με 2-4 ml διαλύματος NaCl, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα FBS που απενεργοποιεί την θρυψίνη και συνεπώς σε αυτό το στάδιο θα εμποδίζει την δράση της.
3. Προσθήκη στην φλάσκα 2ml θρυψίνης 1X και ήπια ανακίνηση ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλη την επιφάνεια όπου είναι προσκολλημένα τα κύτταρα.
4. Επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C για βελτιστοποίηση της δράσης της θρυψίνης και αποκόλληση όσο το δυνατόν περισσότερων κυττάρων από την φλάσκα. Ο χρόνος επώασης διαφέρει ανάλογα την κυτταρική σειρά, ωστόσο είναι σημαντικό να τηρείται αυστηρά και με ακρίβεια, σύμφωνα με τις ανάγκες της σειράς. Εάν τα κύτταρα αφεθούν για λιγότερο χρονικό

διάστημα δεν θα αποκολληθούν καλά, ενώ αν αφεθούν περισσότερο υπάρχει κίνδυνος θανάτωσής τους.

5. Απόσυρση της φλάσκας από τον κλίβανο και εφαρμογή ήπιων χτυπημάτων στα τοιχώματά της προκειμένου να αποκολληθούν όσο το δυνατόν περισσότερα κύτταρα. Παρατηρείται στο μικροσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθεί ότι όντως αποκολλήθηκαν όλα τα κύτταρα. Εφόσον αυτό δεν έχει συμβεί συνεχίζεται η επώαση στον κλίβανο για επιπλέον ένα λεπτό.
6. Τοποθέτηση της φλάσκας στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και προσθήκη σε αυτή 4 ml RPMI που περιέχει 5% ορό ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Γίνεται ανάδευση με πιπέτα ώστε να καλυφθεί όλη η φλάσκα και να εξασφαλιστεί η πλήρης απενεργοποίηση της θρυψίνης.
7. Συλλογή του εναιωρήματος της φλάσκας (6 ml) σε φιαλίδιο falcon των 10 ml και φυγοκέντρησή του στα 1.200 rpm για 6 λεπτά. Έτσι τα κατάλοιπα θρυψίνης θα παραμείνουν στο υπερκείμενο και θα απομακρυνθούν.
8. Απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με προσθήκη 6 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) και ανάδευση στο vortex. Η αραιώση ωστόσο μπορεί να διαφέρει ανάλογα την κυτταρική σειρά.
9. Προσθήκη 1 ml από το επαναδιαλυτοποιημένο ίζημα στην φλάσκα. Η ποσότητα αυτή επίσης μπορεί να εξαρτάται ανάλογα την κυτταρική σειρά, τον ρυθμό ανάπτυξης και τον ρυθμό των κυττάρων.
10. Τέλος, προσθήκη 14 ml θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) στην φλάσκα, ώστε συνολικά να υπάρχει όγκος 15 ml. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο.

2.7 Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων

Η καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων είναι απαραίτητη διαδικασία στα διάφορα στάδια των πειραμάτων, που εξασφαλίζει τόσο την ομαλή διεξαγωγή τους όσο και την ακρίβεια και αξιοπιστία τους. Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, μια γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα διαστάσεων 30 mm x 70 mm και πάχους 4 mm, είναι η βασική συσκευή που χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση αυτή. Η πλάκα αυτή περιλαμβάνει στο κέντρο της μία περιοχή διαστάσεων 3 mm x 3 mm που χωρίζεται σε 9 τετράγωνα πλάτους 1 mm όπου γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων. Από τα 9 τετράγωνα, χρησιμοποιούνται τα 4 που βρίσκονται στις γωνίες για την λήψη της μέτρησης. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Μετά την θρυψινοποίηση συλλογή των κυττάρων σε falcon των 15 ml.
2. Ανάδευση σε vortex και μεταφορά 90 µl από το εναιώρημα των κυττάρων με πιπέτα 200 µl σε erppendorf του 1,5 ml.
3. Προσθήκη 10 µl χρωστικής Trypan Blue στο erppendorf. Αυτή προσδίδει μπλε χρώμα στα νεκρά κύτταρα καθώς μπορεί και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμά τους διαπερνώντας την κυτταρική τους μεμβράνη. Αντιθέτως, τα ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται από την χρωστική και κατέχουν ένα έντονο φωτεινό λευκό ή κιτρινωπό χρώμα.

4. Τοποθέτηση καλυπτρίδας στην πλάκα Neubauer στην κατάλληλη περιοχή όπου γίνεται η καταμέτρηση.
5. Ανάδευση erpendorf στο vortex και συλλογή 20 μl δείγματος βαμμένων κυττάρων με πιπέτα 20 μl. Αυτό εισάγεται στην περιοχή μέτρησης μέσω της εισδοχής που δημιουργείται μεταξύ καλυπτρίδας και πλάκας Neubauer.
6. Καταμέτρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο στις 4 περιοχές της πλάκας Neubauer που προαναφέρθηκαν.

Ο ακριβής αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται με τον εξής μαθηματικό τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = (X/4) \times 10^4 \times Y$$

Όπου

X: το άθροισμα των κυττάρων που μετρήθηκαν και στα 4 τετράγωνα

Y: ο συνολικός όγκος του δείγματος σε ml

2.8 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα συχνά αποθηκεύονται στους -80°C προκειμένου να διατηρηθούν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Όμως προκειμένου να καλλιεργηθούν ξανά είναι απαραίτητη η απόψυξή τους. Αυτή επιτελείται βάσει συγκεκριμένης μεθόδου, ώστε η μετάβαση των κυττάρων από τους -80°C στους 25°C (δηλαδή η θερμοκρασία δωματίου) να είναι ομαλή. Έτσι θα αποφευχθεί ο θάνατός τους και θα συνεχίσουν να αναπτύσσονται φυσιολογικά στην νέα πλέον καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Ανάδευση των κυττάρων στο υδατόλουτρο που είναι ρυθμισμένο στους 37°C , ώστε να αποκρυσταλλωθεί το περιεχόμενο του φιαλιδίου κατάψυξης (cryovial).
2. Σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής μεταφορά του δείγματος σε falcon των 10 ml.
3. Προσθήκη 7 ml θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) σε μικρές ποσότητες και στα τοιχώματα του falcon ώστε να μην είναι πολύ απότομη η αλλαγή της θερμοκρασίας των κυττάρων.
4. Φυγοκέντρηση στα 800 rpm για 8 λεπτά
5. Απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 5 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut).
6. Μεταφορά σε φλάσκα εμβαδού 75 cm^2 και προσθήκη επιπλέον θρεπτικού μέσου ως ότου ο τελικός όγκος να είναι 15 ml.
7. Μεταφορά της φλάσκας στον κλίβανο όπου επικρατεί θερμοκρασία 37°C και σε συνθήκες που προαναφέρθηκαν, προκειμένου να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα.

2.9 Κατάψυξη κυττάρων

Προκειμένου να αποθηκευτούν τα κύτταρα είναι απαραίτητη η διαδικασία της βαθιάς κατάψυξης (-80°C). Έτσι τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα, ακολουθώντας πάντα την κάτωθι διαδικασία:

1. Παρασκευή ειδικού μέσου-διαλύματος κρυοσυντήρησης (freezing medium) σε φιαλίδιο που περιέχει 90% FBS και 10% DMSO (dimethylsulfoxide-κρυοπροστατευτικός παράγοντας που αποτρέπει τον θάνατο των κυττάρων στην πολύ χαμηλή θερμοκρασία). Αξιοποιείται 1 ml freezing medium για κάθε 1-2 εκατομμύρια κύτταρα, επομένως έχει προηγηθεί καταμέτρηση των κυττάρων.
2. Συλλογή των κυττάρων σε φιαλίδιο των 10 ml μετά από θρυψινοποίηση.
3. Μετά την φυγοκέντρηση της θρυψινοποίησης γίνεται απόχυση του υπερκειμένου και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με το freezing medium στην αναλογία διαλύματος/κυττάρων που αναφέρθηκε στο βήμα 1.
4. Μεταφορά 1 ml εναιωρήματος σε ειδικό φιαλίδιο cryovial.
5. Φύλαξη του δείγματος στους -80°C .

2.10 Μέθοδος Κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB (SRB Assay)

Στο πρώτο σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, επιχειρήθηκε η στόχευση της κινάσης PDK1 με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων φαρμακολογικών αναστολέων. Έτσι, με σκοπό την επιλογή του δραστικότερου αναστολέα, πραγματοποιήθηκε αρχικά η *in vitro* μέθοδος κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB, τεσσάρων αναστολέων της PDK1 (BX912, BX517, PDK1-IN-RS2, GSK2334470) στα κύτταρα MDA-MB-231.

Αναλυτικότερα, η μέθοδος σουλφοροδαμίνης B εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας βάσει της ποσότητας του κυτταρικού περιεχομένου σε πρωτεΐνες. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα αρχικά μονιμοποιούνται με χρήση τριχλωροακετοξικού οξέος (TCA) ενώ έπειτα προστίθεται η χρωστική SRB η οποία έχει την ιδιότητα να προσδένεται στις πρωτεΐνες των κυττάρων και ειδικότερα στα βασικά αμινοξικά τους κατάλοιπα. Υπό ήπιες όξινες συνθήκες η χρωστική αποσυνδέεται. Η οπτική πυκνότητα μετριέται στα 540 nm και αντικατοπτρίζει την ποσότητα της χρωστικής και συνεπώς και της κυτταρικής μάζας. Η διαδικασία είναι η εξής:

Ημέρα 1^η: Αλλαγή θρεπτικού μέσου και έλεγχος των κυττάρων

Αρχικά γίνεται έλεγχος των κυττάρων ώστε να βεβαιωθεί ότι αναπτύσσονται σωστά και χωρίς επιμολύνσεις και έπειτα πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού όπως περιγράφεται στην παραπάνω ενότητα 2.5.

Ημέρα 2^η : Θρυψινοποίηση των κυττάρων και στρώσιμο σε πιάτο 96 θέσεων.

Έπειτα, προκειμένου να μπορεί να γίνει έλεγχος της δράσης των αναστολέων είναι απαραίτητη η τοποθέτηση των κυττάρων σε πιάτο καλλιέργειας 96 θέσεων όπως περιγράφεται:

1. Αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα καλλιέργειας με την διαδικασία της θρυψινοποίησης που περιγράφεται στην ενότητα **2.6**.
2. Συλλογή εναιωρήματος κυττάρων με θρεπτικό μέσο (αφήνεται μία μικρή ποσότητα στην φλάσκα για την συνέχιση της καλλιέργειας). Τοποθέτηση του υπόλοιπου εναιωρήματος σε φιαλίδιο των 50 ml.
3. Το φιαλίδιο τοποθετείται στο vortex και γίνεται καλή ανάδευση.
4. Καταμέτρηση κυττάρων με χρήση του αιμοκυτταρομέτρου Neubauer (**ενότητα 2.7**).
5. Υπολογισμός συνολικής ποσότητας κυττάρων καθώς και της απαραίτητης ποσότητας ώστε σε κάθε θέση να υπάρχουν 5.000 κύτταρα.

Συνολικά υπήρχαν οι εξής κατηγορίες κυττάρων:

- Κύτταρα που επωάζονται με BX-912 σε συγκεντρώσεις 100, 10, 1, και 0,1 μM .
 - Κύτταρα που επωάζονται με GSK2334470 σε συγκεντρώσεις 100, 10, 1, και 0,1 μM .
 - Κύτταρα που επωάζονται με PDK1-IN-RS2 σε συγκεντρώσεις 100, 10, 1, και 0,1 μM .
 - Κύτταρα που επωάζονται με BX-517 σε συγκεντρώσεις 50, 10, 1, και 0,1 μM .
 - Κύτταρα control στα οποία δεν προστίθεται κάποια ουσία ώστε να συγκριθεί ο ρυθμός ανάπτυξης.
 - Κύτταρα control T-zero που μονιμοποιούνται την χρονική στιγμή 0, δηλαδή την στιγμή που θα χορηγηθούν οι αναστολείς στα κύτταρα, ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση τους για την χρονική περίοδο του πειράματος.
6. Συλλογή οριστικού αριθμού κυττάρων που είναι απαραίτητα και προσθήκη θρεπτικού μέσου RPMI ώστε σε κάθε θέση να αντιστοιχούν 100 μl .
 7. Καλή ανάδευση σε vortex ώστε να υπάρχει ομοιομορφία στην κατανομή των κυττάρων στις θέσεις.
 8. Μεταφορά 100 μl εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι.
 9. Τοποθέτηση των κυττάρων στον κλίβανο.

Ημέρα 3^η: Προσθήκη του αναστολέων και μονιμοποίηση των κυττάρων ελέγχου T-zero

Μετά από κατά προσέγγιση 24 ώρες από το στρώσιμο των κυττάρων MDA-MB-231 στο πιάτο καλλιέργειας 96 θέσεων, γίνεται η προσθήκη των αναστολέων ενώ μονιμοποιούνται τα κύτταρα ελέγχου T-zero την χρονική στιγμή μηδέν. Πιο συγκεκριμένα, οι αναστολείς που χορηγήθηκαν παρασκευάστηκαν από αρχικό stock 20 mM μετά από αραιώσεις με θρεπτικό υλικό.

Συνεπώς τα βήματα που ακολουθούνται για την χορήγηση τους είναι τα εξής:

1. Ανάδευση του διαλύματος αναστολέα με vortex.
2. Προσθήκη 100 μl από κάθε συγκέντρωση του BX-912, BX-517, GSK2334470 και PDK1-IN-RS2 στις αντίστοιχες θέσεις.
3. Προσθήκη 100 μl θρεπτικού μέσου RPMI 5% στα κύτταρα control.
4. Επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες.

Έπειτα προχωρήσαμε στην μονιμοποίηση των δειγμάτων ελέγχου T-zero. Συνοπτικά:

1. Προσθήκη 100 μl TCA, 20% σε κάθε θέση.

2. Επώαση για 60 min στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C.
3. Απομάκρυνση του περιεχομένου των πιάτων με απότομη κίνηση κάθετα.
4. Πλύση με απιονισμένο νερό.
5. Στέγνωμα πιάτου σε θερμοκρασία δωματίου 25°C και μόλις στεγνώσει χρωματομετράται.

Ημέρα 4^η : Έλεγχος κυττάρων στο μικροσκόπιο

Ελέγχονται στο μικροσκόπιο τα δύο πιάτα με τα κύτταρα ώστε να βεβαιωθεί η ομαλή εξέλιξη του πειράματος.

Ημέρα 5^η : Μονιμοποίηση και χρώση των υπόλοιπων κυττάρων

Μονιμοποίηση

Μετά από 48 ώρες από την χορήγηση των αναστολέων, γίνεται μονιμοποίηση των κυττάρων που έχουν επωαστεί με αυτούς, όπως και των κυττάρων ελέγχου όπου δεν έχει προστεθεί κάποιος αναστολέας, με τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκε παραπάνω για τα T-zero.

Χρώση με Σουλφοροδαμίνη B (Sulforhodamine B, SRB)

Αφού τα πιάτα έχουν στεγνώσει καλά ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Προσθήκη 50 µl 0,4% w/v SRB σε 1% οξικό οξύ.
2. Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Πλύσεις των πιάτων με 1% οξικό οξύ, επί τρεις φορές, ώστε να απομακρυνθεί η χρωστική που δεν δεσμεύτηκε στις πρωτεΐνες των κυττάρων.
4. Στέγνωμα πιάτων.
5. Προσθήκη σε κάθε θέση 150 µl Trizma base σε συγκέντρωση 10 mM (ελαφρώς βασικό ρυθμιστικό διάλυμα) που βοηθά στην απελευθέρωση της δεσμευμένης χρωστικής από τα κύτταρα ώστε να γίνει ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας.
6. Επώαση για 10 min στον κλίβανο.
7. Ήπια ανάδευση για 10 min στις 30 rpm
8. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 540 nm σε φωτόμετρο microplate reader Biotek microelisa (Biotek, El-311), αυτοματοποιημένο για πιάτο 96 θέσεων Elisa.

Τέλος, γίνεται ο υπολογισμός των παρακάτω παραμέτρων για την κάθε υπό εξέταση ουσία με χρήση του EXCEL:

1. **GI50 (Growth Inhibition of 50%)**: η συγκέντρωση της ουσίας που μειώνει κατά 50% την ανάπτυξη των κυττάρων σε σχέση με τα δείγματα control. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση αυτής ισχύει ο τύπος: $100(*T - **T_0)/(***T_c - T_0) = 50$
2. **TGI (Total Growth Inhibition)**: η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση αυτής ισχύει ο τύπος:
 $(T - T_0)/T_0 = -50$

3. **LC50 (Lethal Concentration of 50%):** είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50% κυτταρικό θάνατο. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση αυτής ισχύει ο τύπος:

$$100 \times (T - T_0)/(T_c - T_0) = 0.$$

4. **TI (Therapeutic Index): Θεραπευτικός δείκτης,** ο οποίος εκφράζει το εύρος της διαφοράς μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (GI₅₀) και της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης (LC₅₀):

$$LC_{50}/GI_{50}$$

Όπου:

T= η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού έπειτα από χορήγηση του αναστολέα

T₀= η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού τη στιγμή προσθήκης του αναστολέα

T_c = η οπτική πυκνότητα ενός πηγαδιού δείγματος ελέγχου control μετά από 48 ώρες

2.11 Μέθοδος Ελέγχου Επούλωσης Πληγών (Wound Healing Assay)

Η μέθοδος ελέγχου επούλωσης πληγών χρησιμοποιείται για την μελέτη της μετανάστευσης των κυττάρων in vitro. Μέσω της δημιουργίας ενός τεχνητού κενού (πληγής) σε έναν πληθυσμό κυττάρων εξετάζεται η ικανότητα των κυττάρων που βρίσκονται στις δύο άκρες της πληγής να μεταναστεύουν ώστε να επουλώσουν την πληγή και να δημιουργήσουν ξανά διακυτταρικούς δεσμούς μεταξύ τους. Έτσι, σε έναν πληθυσμό κυττάρων που έχουν την ιδιότητα αυτή, χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτταροτοξικού παράγοντα ώστε να διαπιστωθεί αν είναι δυνατόν να αποτρέψει ή να καθυστερήσει την επούλωση της πληγής των κυττάρων [56].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί η αντιμεταναστευτική ικανότητα του BX-912, ο οποίος κρίθηκε ως ο δραστικότερος από τα πειράματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας SRB έναντι των κυττάρων MDA-MB-231. Η πειραματική διαδικασία ακολουθείται ως εξής:

Ημέρα 1^η: Αλλαγή θρεπτικού μέσου και έλεγχος των κυττάρων

Αρχικά γίνεται έλεγχος των κυττάρων ώστε να βεβαιωθεί ότι αναπτύσσονται σωστά και χωρίς επιμολύνσεις και έπειτα πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού όπως περιγράφεται στην παραπάνω ενότητα 2.5.

Ημέρα 2^η : Θρυψινοποίηση των κυττάρων και στρώσιμο σε πιάτο 96 θέσεων.

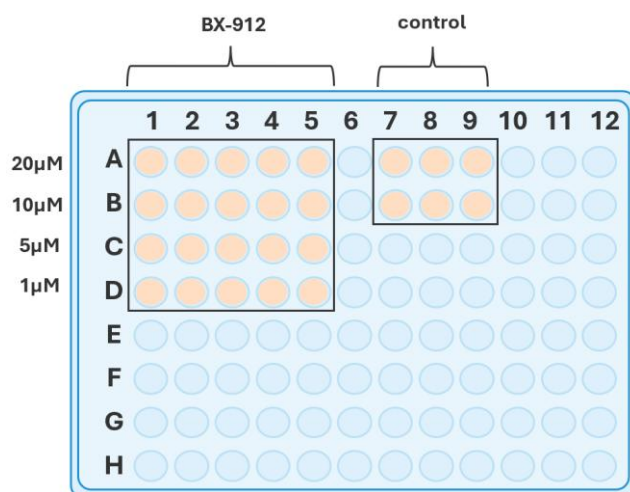
Έπειτα, προκειμένου να μπορεί να γίνει έλεγχος της δράσης του BX-912 είναι απαραίτητη η τοποθέτηση των κυττάρων σε πιάτο καλλιέργειας 96 θέσεων όπως περιγράφεται:

1. Αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα καλλιέργειας με την διαδικασία της θρυψινοποίησης που περιγράφεται στην ενότητα 2.6.

2. Συλλογή εναιωρήματος κυττάρων με θρεπτικό μέσο και τοποθέτηση του σε φιαλίδιο των 50 ml.
3. Το φιαλίδιο τοποθετείται στο vortex και γίνεται καλή ανάδευση.
4. Καταμέτρηση κυττάρων με χρήση του αιμοκυτταρομέτρου Neubauer (2.7).
5. Υπολογισμός συνολικής ποσότητας κυττάρων καθώς και της απαραίτητης ποσότητας ώστε σε κάθε θέση να υπάρχουν 30.000 κύτταρα.

Συνολικά υπήρχαν οι εξής κατηγορίες κυττάρων:

- Κύτταρα που επωάζονται με BX-912 σε συγκεντρώσεις 20, 10, και 5 μM .
 - Κύτταρα control στα οποία δεν προστίθεται κάποια ουσία ώστε να συγκριθεί ο ρυθμός ανάπτυξης.
 - Κύτταρα control T-zero τα οποία μονιμοποιούνται την χρονική στιγμή 0, δηλαδή την στιγμή που χορηγείται ο BX-912, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση του αναστολέα για την χρονική περίοδο του πειράματος.
6. Συλλογή οριστικού αριθμού κυττάρων που είναι απαραίτητα και προσθήκη θρεπτικού μέσου RPMI ώστε σε κάθε θέση να αντιστοιχούν 100 μl .
 7. Καλή ανάδευση σε vortex ώστε να υπάρχει ομοιομορφία στην κατανομή των κυττάρων στις θέσεις.
 8. Μεταφορά 100 μl εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε θέση.



Εικόνα 14: Πιάτα καλλιέργειας 96 θέσεων για τα πειράματα ελέγχου επιβίωσης πληγών με BX-912 σε MDA-MB-231. Picture made by Powerpoint.

Ημέρα 3^η :Δημιουργία πληγής και προσθήκη του BX-912 στα κύτταρα

Προκειμένου να εξεταστεί η δράση του αναστολέα πρέπει να δημιουργηθεί η πληγή πριν την χορήγησή του, το οποίο γίνεται με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Δημιουργία πληγής με ρύγχος (tip) των 200 μl σε κάθε θέση.
2. Αφαίρεση του εναιωρήματος των θέσεων.
3. Πλύσεις σε κάθε θέση με PBS 1X με πιπέτα πολύ προσεκτικά ώστε να φύγουν τα υπολείμματα των κυττάρων που αποκολλήθηκαν, χωρίς ωστόσο να αποκολληθούν τα υπόλοιπα κύτταρα που παρέμειναν γύρω από την πληγή.

4. Προσθήκη 200 μ l αναστολέα BX-912 με γρήγορες αλλά προσεκτικές κινήσεις στα κύτταρα που προορίζονται για επώαση, 200 μ l RPMI στα κύτταρα control. Η διαδικασία πρέπει να ολοκληρωθεί γρήγορα καθώς τα κύτταρα σε αυτή την φάση είναι ευαίσθητα.

Αμέσως μετά τη δημιουργία της πληγής και την προσθήκη του αναστολέα (χρονικό σημείο 0 h), πραγματοποιήθηκε παρατήρηση στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών από κάθε πηγαδάκι, για όλες τις συγκεντρώσεις του αναστολέα και τα control. Η καταγραφή των εικόνων έγινε με την κάμερα AxioCam ERc5s της εταιρείας Zeiss, με τρόπο που να απεικονίζεται καθαρά η περιοχή της πληγής και τα γειτονικά κύτταρα.

Ημέρα 4^η: Παρατήρηση και λήψη φωτογραφιών των κυττάρων στις 24 ώρες επώασης με τον αναστολέα BX-912

Μετά το πέρας των 24 ωρών γίνεται ξανά παρατήρηση των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών στο ίδιο ακριβώς σημείο των θέσεων και με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκαν κατά την 3^η ημέρα του πειράματος.

Ημέρα 5^η: Παρατήρηση και λήψη φωτογραφιών των κυττάρων στις 48 ώρες επώασης με τον αναστολέα BX-912

Μετά το πέρας των 48 ωρών γίνεται ξανά παρατήρηση των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκαν κατά την 4^η ημέρα του πειράματος.

Τα τελικά αποτελέσματα εξαρτώνται από τις μετρήσεις των εμβαδών των πληγών που μετριοούνται στις φωτογραφίες σε κάθε ώρα ελέγχου (0, 24 και 48 ώρες) και μετατροπή τους σε ποσοστό μετανάστευσης κυττάρων. Τέλος, διενεργείται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το T-test του Microsoft Excel. Έτσι, υπολογίζεται και το p-value των πειραμάτων.

2.12 Πρωτόκολλο αποσιώπησης της PDK1 στην σειρά MDA-MB-231

Στο δεύτερο σκέλος της εν λόγω διπλωματικής εργασίας επιχειρήθηκε στόχευση της PDK1 μέσω μετα-μεταγραφικής αποσιώπησης του mRNA που κωδικοποιεί την κινάση PDK1 στα κύτταρα MDA-MB-231. Στηριζόμενοι σε παρατηρήσεις προηγούμενων πειραμάτων του εργαστηρίου με αποσιώπηση της PDK1 σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος, όπου και δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του κυτταρικού κύκλου και της μεταναστευτικής ικανότητας σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, επιχειρήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση της σίγησης της PDK1 στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού στην επιβίωση και τον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων.

Η αποσιώπηση επιτεύχθηκε με χρήση του κατάλληλου siRNA, (Fluxtube siRNA Hs_PDPK1_8, SI00605780, Qiagen) με αλληλουχία AAGCGGTTAGGCTGTGAGGAA, που είναι ειδικό για την κινάση PDK1. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα Scrambled siRNA (Control siRNA-A, sc-37007, Santa Cruz Biotechnology) το οποίο πρόκειται για ένα μη στοχευόμενο μόριο siRNA με τέτοιο τρόπο σχεδιασμένο ώστε να μην στοχεύει καμία αλληλουχία του κυττάρου. Το τελευταίο χρησιμοποιείται ώστε να είναι δυνατόν να συγκριθούν οι μη ειδικές επιδράσεις του siRNA στα κύτταρα σε σχέση με αυτά που έχουν στοχευθεί ειδικά για την

PDK1. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία με siRNA, ούτε έχουν υποστεί κάποια τροποποίηση, δηλαδή κύτταρα Untreated. Προκειμένου να μεταφερθεί το siRNA στο εσωτερικό των κυττάρων και να γίνει η επιμόλυνση αποτελεσματικά, χρησιμοποιείται και διάλυμα λιποαφεκταμίνης (Lipofectamine RNAi Max, 11668-030, Invitrogen by Thermo Fischer Scientific). Πρόκειται για ένα κατιονικό αντιδραστήριο που παρέχει in vitro υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης και υψηλά επίπεδα έκφρασης διαγονιδίων [48].

Η επώαση των κυττάρων με τα ειδικά siRNA διήρκησε 72 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική σίγηση της PDK1. Η χρονική στιγμή των 72 ωρών από την προσθήκη του siRNA ορίστηκε ως “χρονικό σημείο 0h” για τα επακόλουθα πειράματα. Από το σημείο αυτό και έπειτα, συλλέχθηκαν δείγματα στις 24h (δηλαδή 96 ώρες συνολικά από την αρχική προσθήκη του siRNA) και στις 48h (120 ώρες συνολικά). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της σίγησης είναι η εξής:

Ημέρα 1^η: Έλεγχος και ανανέωση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων

Αρχικά ελέγχεται η φλάσκα εμβαδού 75 cm² όπου βρίσκεται η κυτταροκαλλιέργεια για τυχόν επιμολύνσεις καθώς είναι ζωτικής σημασίας για την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα να αναπτύσσονται ομαλά και υγιή.

Έπειτα γίνεται ανανέωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με την μεθοδολογία που έχει αναλυθεί σε προηγούμενη ενότητα (2.5). Τέλος η φλάσκα αφήνεται να επωαστεί στον κλίβανο.

Ημέρα 2^η: Ανακαλλιέργεια των κυττάρων και διαμοιρασμός τους σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων.

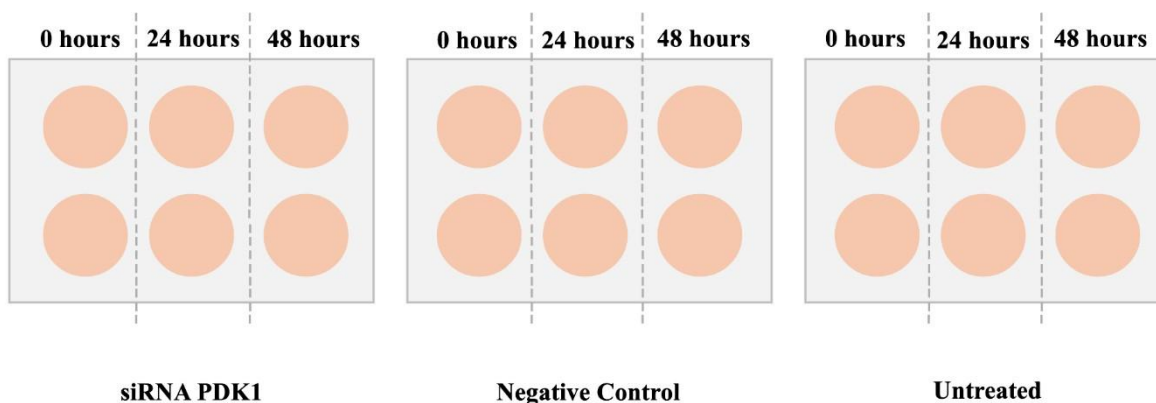
Απαραίτητο βήμα για την επιμόλυνση των κυττάρων με το ειδικό για την PDK1 siRNA, είναι ο διαμοιρασμός τους σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Αποκόλληση των κυττάρων από την αρχική φλάσκα καλλιέργειας μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης η οποία έχει αναλυθεί και παραπάνω (2.6). Σε αυτή την περίπτωση ωστόσο, το RPMI (5% FBS, 1% L-glutamine) που προστίθεται δεν περιέχει κάποιο αντιβιοτικό, καθώς μπορεί να παρεμποδίσει τη διαδικασία πρόσληψης του siRNA από τα κύτταρα.
2. Αφού γίνει η συλλογή των αποκολλημένων κυττάρων από τη φλάσκα ακολουθεί φυγοκέντρηση (περιγράφεται στην ενότητα 2.6) και έπειτα τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS, 1% L-glutamine).
3. Τα κύτταρα καταμετρούνται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer όπως έχει ήδη αναλυθεί (2.7).
4. Έπειτα γίνεται υπολογισμός της συνολικής ποσότητας κυττάρων που χρειάζεται ώστε να μεταφερθούν σε κάθε θέση 2ml εναιωρήματος, έτσι ώστε εν τέλει να έχουμε 150.000 κύτταρα/θέση σε κάθε πιάτο καλλιέργειας και να υπάρξει η βέλτιστη δυνατή ανάπτυξη τους.

- Τέλος, τα πιάτα καλλιέργειας τοποθετούνται στον κλίβανο ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στον πάτο των πιάτων 6 θέσεων, καθώς και να προσαρμοστούν στην νέα συνθήκη.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τρία πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων, ένα για κάθε πειραματική συνθήκη (Εικόνα 18):

- siRNA ειδικό για την PDK1:** Σε αυτό το πιάτο δύο θέσεις χρησιμοποιήθηκαν για συλλογή κυττάρων στη χρονική στιγμή 0h (δηλαδή 72 ώρες μετά την προσθήκη του siRNA, όπου αναμένεται να έχει επιτευχθεί η μέγιστη σίγηση της PDK1), δύο θέσεις για τη χρονική στιγμή 24h (δηλαδή 96 ώρες μετά την αρχική transfection), και δύο θέσεις για τη χρονική στιγμή 48h (δηλαδή 120 ώρες συνολικά).
- Αρνητικός έλεγχος (Negative Control):** Αντίστοιχα, δύο θέσεις συλλέχθηκαν στη χρονική στιγμή 0h, δύο θέσεις στις 24h, και δύο θέσεις στις 48h, μετά την ίδια χρονική εκκίνησης (0h = 72h μετά την προσθήκη του αντίστοιχου control siRNA).
- Ακατέργαστα κύτταρα (Untreated):** Δύο θέσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε χρονικό σημείο (0h, 24h, 48h), χωρίς προηγούμενη έκθεση σε siRNA ή κάποια τροποποίηση (Untreated).



Εικόνα 15: Πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων για πείραμα αποσίωπησης της PDK1 στα MDA-MB-231. Picture made by Powerpoint

Ημέρα 3^η: Παρασκευή διαλυμάτων και επιμόλυνση των MDA-MB-231 με το siRNA 1^ο

Βήμα

Σε αυτή την φάση παρασκευάζονται τα διαλύματα που είναι απαραίτητα τόσο για την επιμόλυνση των κυττάρων με το ειδικό για την PDK1 siRNA, όσο και με το Scrambled siRNA. Μετά από κατάλληλους υπολογισμούς προσδιορίστηκε ότι ο τελικός όγκος κάθε well θα πρέπει να είναι 2 ml εκ των οποίων τα 1.750 μl θα είναι το θρεπτικό μέσο RPMI (5% FBS, 1% L-glut) και τα 250 μl θα είναι μείγμα που περιέχει το ειδικό siRNA ή το Negative Control αντίστοιχα για την κάθε περίπτωση.

Τα δύο μείγματα όπου περιέχονται τα siRNA, αποτελούνται τόσο από λιποαφεκταμίνη καθώς και από μέσο Opti-MemTM (Gibco, 31985062, Thermo Fisher Scientific) το οποίο χρησιμοποιείται στην επιμόλυνση γενετικών μορίων σε κύτταρα θηλαστικών και είναι ένα μέσο μειωμένου ορού [49].

Συνεπώς, για το μείγμα του ειδικού siRNA ετοιμάζονται δύο φιαλίδια erppendorfs με τις εξής αναλογίες:

1^ο erppendorf: 15 μl siRNA+ 735 μl Opti-MemTM (συνολικά 750 μl)

2^ο erppendorf: 15 μl lipofectamine + 735 μl Opti-MemTM (συνολικά 750 μl)

Το περιεχόμενο των δύο αυτών φιαλιδίων erppendorfs αναμειγνύεται σε έναν συνολικό όγκο 1,5 ml που περιέχει 1.470 μl Opti-MemTM, 15 μl λιποαφεκταμίνη, και 15 μl siRNA. Το μείγμα αυτό επωάζεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Η ίδια διαδικασία ακριβώς ακολουθείται και για το Scrambled siRNA .

2^ο Βήμα

Κατά την επώαση των siRNA γίνεται η κατάλληλη προετοιμασία των κυττάρων:

1. Απόρριψη του θρεπτικού μέσου RPMI από τα πιάτα καλλιέργειας
2. Πλύση κάθε θέσης με 1 ml φυσιολογικού ορού PBS με προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα από τις θέσεις.
3. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των 15 min, κατανέμονται στις θέσεις οι εξής αναλογίες διαλυμάτων:

Στα Untreated κύτταρα: 250 μl Opti-MemTM + 1.750 μl θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS και 1% L-glut)

Στα Negative Control κύτταρα: 250 μl μείγματος Scrambled siRNA (1.470 μl OptiMemTM, 15 μl λιποαφεκταμίνη, και 15 μl μη στοχευόμενου siRNA) + 1.750 μl θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS και 1% L-glut)

Στα PDK1-silenced κύτταρα: 250 μl μείγματος PDK1 siRNA (1.470 μl Opti-MemTM, 15 μl λιποαφεκταμίνη, και 15 μl ειδικού για την PDK1 siRNA) + 1.750 μl θρεπτικού μέσου RPMI (5% FBS και 1% L-glut)

4. Επώαση των πιάτων καλλιέργειας 6 θέσεων στον κλίβανο για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα.

Τα επιμολυσμένα με siRNA κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα ελέγχου συλλέχθηκαν τις χρονικές στιγμές που αναφέρθηκαν παραπάνω με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης ώστε να χρησιμοποιηθούν σε ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες όπως η κυτταρομετρία ροής, ο έλεγχος βιωσιμότητας και η ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.13 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η μέθοδος Western Blot χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της μετα-μεταγραφικής σίγησης της PDK1 μετά από την επώαση των κυττάρων με το ειδικό siRNA. Συγκεκριμένα, μέσω της ανίχνευσης των επιπέδων της πρωτεΐνης PDK1 στα δείγματα, αξιολογήθηκε η επιτυχία της διαδικασίας αποσιώπησης σε σύγκριση με τα κύτταρα αρνητικού ελέγχου Scrambled siRNA. Επιπλέον, με δεδομένο ότι παρατηρήθηκε αυξημένος κυτταρικός θάνατος κατά την παρατήρηση των πειραματικών δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση των επιπέδων της προ- κασπάσης-3 (caspase3), ενός βασικού δείκτη απόπτωσης, προκειμένου να διερευνηθεί εάν η απώλεια της PDK1 σχετίζεται με επαγωγή αποπτωτικού μηχανισμού.

2.13.1 Αρχή της Μεθόδου

Η Western Blot είναι μία τεχνική που εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ένα εκχύλισμα που έχει εξαχθεί από κύτταρα. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς των βιολογικών επιστημών. Η διαδικασία ακολουθεί κυρίως τρία στάδια. Αρχικά οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται σε μια πηκτή SDSπολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide gel) και διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους βάρους. Έπειτα οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF και τέλος οπτικοποιούνται με επώαση της μεμβράνης με χρήση κατάλληλων πρωτογενών αντισωμάτων που είναι ειδικά για την πρωτεΐνη, καθώς και δευτερογενών, που στοχεύουν το δευτερογενές αντίσωμα και με κατάλληλη διέγερση εκπέμπουν χημειοφωταύγεια. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η παρατήρηση μιας ζώνης στην περιοχή όπου αναμένεται να εμφανιστεί η πρωτεΐνη σύμφωνα πάντα με το μοριακό της βάρος. Όσο πιο παχιά και έντονη η ζώνη τόσο μεγαλύτερη και η ποσότητα της πρωτεΐνης [53].

2.13.2 Διαδικασία

2.13.2.1 Δημιουργία Λυμάτων

Η δημιουργία λυμάτων από τα δείγματα που προέκυψαν κατά τη διαδικασία αποσιώπησης της PDK1 που περιεγράφηκε στην ενότητα (2.12) πραγματοποιείται προκειμένου να ληφθεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων με σκοπό την ηλεκτροφόρηση των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Πριν από τη διαδικασία αυτή συλλέγονται τα δείγματα μελέτης με τον εξής τρόπο:

1. Συλλογή του εναιωρήματος των πιάτων καλλιέργειας 6 θέσεων σε φιαλίδιο των 10 ml.
2. Πλύση του πιάτου καλλιέργειας 6 θέσεων με 1 ml διαλύματος NaCl με χρήση πιπέτας 1 ml προκειμένου να αφαιρέσουμε υπολείμματα ορού που θα εμποδίσουν την δράση της θρυψίνης. Έπειτα συλλογή του εναιωρήματος κυττάρων και προσθήκη του στο φιαλίδιο.
3. Προσθήκη 0.5 ml θρυψίνης 1X και επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 2 λεπτά ως ότου αποκολληθούν.
4. Αφαίρεση του πιάτου καλλιέργειας από τον επωαστικό κλίβανο και επιστροφή του στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.
5. Προσθήκη 1 ml RPMI (5% FBS, 1% L-glut) και καλή ανάδευση με πιπέτα 1 ml προκειμένου να απενεργοποιηθεί καλά η θρυψίνη. Το εναιώρημα συλλέγεται και τοποθετείται και αυτό στο φιαλίδιο των 10 ml.
6. Ξέπλυμα των πιάτων καλλιέργειας με 1 ml διαλύματος NaCl και συλλογή του εναιωρήματος και προσθήκη του στο φιαλίδιο ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν μικρότερη απώλεια κυττάρων.
7. Το πιάτο καλλιέργειας ελέγχεται στο μικροσκόπιο προκειμένου να ελεγχθεί ότι όντως έχουν μεταφερθεί τα κύτταρα στο φιαλίδιο και δεν έχουν μείνει σημαντικές ποσότητες στο πιάτο 6 θέσεων.
8. Μέτρηση των κυττάρων με χρήση του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer σύμφωνα με την διαδικασία που περιεγράφηκε (ενότητα 2.7).
9. Καλή ανάδευση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε vortex και φυγοκέντρωση (1.400 rpm για 10 min).

10. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος κυττάρων σε 5 ml διαλύματος NaCl.
11. Ξανά καλή ανάδευση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε vortex και φυγοκέντρωση (1.400 rpm για 10 min).
12. Απόρριψη του υπερκειμένου.
13. Τέλος, μετά από τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80°C, μέχρι να ολοκληρωθεί η προετοιμασία και των υπόλοιπων δειγμάτων.

Λύση των κυττάρων

Αφού τα δείγματα έχουν συλλεχθεί το καθένα στην κατάλληλη χρονική στιγμή και αποθηκευτεί, ακολουθεί η διαδικασία λύσης των κυττάρων με ειδικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και σε πάγο ως εξής:

1. Αφού ολοκληρωθεί σε προηγούμενο στάδιο η μέτρηση των κυττάρων, υπολογίζεται η κατάλληλη ποσότητα συστατικών για την παρασκευή του lysis buffer. Πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε 1.000.000 κύτταρα προσθέτουμε 60 µl lysis buffer με την ακόλουθη σύσταση:

Συστατικά του Lysis Buffer
RIPA Buffer 1X
PI (protease inhibitor) 1X
Απιονισμένο Νερό (H ₂ O)

Πίνακας 5: Συστατικά του Lysis Buffer

Όπου:

PI (protease inhibitor): δρα εναντίον των πρωτεασών που απελευθερώνονται μαζί με τα κυτταρικά λύματα αποτρέποντας έτσι την καταστροφή των πρωτεϊνών. **RIPA:** βοηθά στην σταθεροποίηση του pH και στην αποδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης. Περιέχει:

Συστατικά RIPA Buffer
50 mM Tris-HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
1% Triton X-100
0,5% SDC (sodium deoxycholate)
0,1% SDS

Πίνακας 6: Συστατικά του RIPA buffer

NaCl: διατηρεί σε αποδεκτά επίπεδα την οσμωτική πίεση

Triton X, SDC: απορρυπαντικά που αποτρέπουν τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών.

SDS (sodium dodecylsulfate): ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο.

EDTA: δεσμεύει διασθενή μέταλλα και συνεπώς οδηγεί στην αναστολή των μεταλλοπρωτεασών

2. Αφού προστεθούν όλα τα υλικά του lysis buffer τοποθετείται για καλή ανάδευση στο vortex.
3. Παραλαβή των δειγμάτων από την κατάψυξη (-80°C) και απόρριψη τυχόν υπολείμματος διαλύματος NaCl.
4. Προσθήκη ανάλογης ποσότητας lysis buffer σε κάθε δείγμα μετά από υπολογισμούς.
5. Ανάμιξη με πιπέτα προκειμένου να γίνει καλή ανάδευση και να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα.
6. Μεταφορά με πιπέτα της ποσότητας διαλύματος από τα φιαλίδια falcon σε φιαλίδια erppendorf και τοποθέτησή τους στον πάγο όπου και επωάζονται αρχικά για 5 λεπτά.
7. Ανάδευση των δειγμάτων σε vortex κάθε 5 λεπτά επί 45 λεπτά ώστε να δράσει το lysis buffer και να εξαχθεί το εκχύλισμα των κυττάρων.
8. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 rpm για 20 min σε θερμοκρασία 4°C.
9. Μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το πρωτεϊνικό εκχύλισμα με πιπέτα σε νέα erppendorfs.
10. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9 για περίπου 2-3 φορές ως ότου τα δείγματα είναι εντελώς διαυγή.

Προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης κατά Bradford

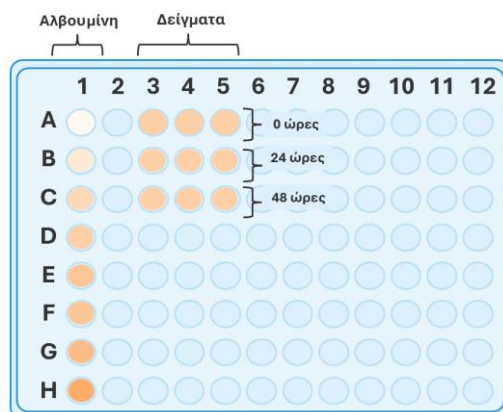
Η μέθοδος προσδιορισμού του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυτταρικών λυμάτων κατά Bradford είναι μία εύκολη και γρήγορη μέθοδος που αποσκοπεί στον προσδιορισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών σε ένα εκχύλισμα. Βασίζεται στην μεταβολή του μεγίστου απορρόφησης από 465 nm στα 595 nm της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, όταν αυτή συνδέεται με πρωτεΐνες σε ένα διάλυμα [54].

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών κατά την Western Blot είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία ώστε να μπορεί να γίνει σωστή φόρτωση των δειγμάτων στην ηλεκτροφόρηση, τόσο ώστε να μπορεί να φανεί το αποτέλεσμα, όσο και για να είναι όσο το δυνατόν πιο ισόποση η φόρτωση και να μπορεί να γίνει σωστή σύγκριση της έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων. Ο υπολογισμός αυτός, για κάθε δείγμα, γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται με χρήση αλβουμίνης.

Πιο συγκεκριμένα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Προσθήκη των δειγμάτων που προέκυψαν από τη λύση σε πιάτο καλλιέργειας 96 θέσεων κατά σειρά. Πιο αναλυτικά, σε κάθε θέση προστίθενται με πιπέτα έπειτα από ανάδευση 5 μl δείγματος και 20 μl PBS 1X (αραίωση 1:5).
2. Προσθήκη σε δεύτερη στήλη του πιάτου γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης και PBS πάλι κατά σειρά συγκέντρωσης, με τις οποίες γίνεται και ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.
3. Υπολογισμός αντιδραστηρίων A και B. Σε κάθε well του πιάτου καλλιέργειας προστίθενται 200 μl του αντιδραστηρίου AB το οποίο περιέχει και την χρωστική Coomassie Blue G-250 που προσδένεται στις πρωτεΐνες. Ο λόγος A:B είναι ίσος με 50:1.

4. Επώαση του πιάτου καλλιέργειας στον κλίβανο για 30 min.
5. Φωτομέτρηση των δειγμάτων του πιάτου καλλιέργειας με φωτόμετρο στα 540 nm και υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, μέσω της πρότυπης καμπύλης.



Εικόνα 16: Προετοιμασία δειγμάτων σε 96-well plate για δοκιμασία Bradford. Picture made by PowerPoint

Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, μεταφορά σε μεμβράνη PVDF και επώαση με πρωτογενές αντίσωμα.

Το στάδιο της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους ώστε να είναι ευδιάκριτες μετά την επώασή τους με αντίσωμα.

Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάζονται δύο πηκτές: μία πηκτή διαχωρισμού (running gel), και μια πηκτή επιστοίβασης (stacking gel). Η πρώτη πηκτή είναι αυτή που φέρει αντίσταση κατά την μετακίνηση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μετακινούνται γρηγορότερα αυτές χαμηλότερου μοριακού βάρους και πιο αργά, αυτές υψηλότερου, ενώ η δεύτερη πηκτή είναι αυτή όπου δημιουργούνται μικρά πηγαδάκια όπου φορτώνονται τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν. Τα δείγματα κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε μία ειδική συσκευή, η οποία συνδέεται με τροφοδοτικό, μέσα σε ένα δοχείο με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από: 1) κύτταρα MDA-MB-231 που είχαν υποστεί σίγηση για την PDK1 με siRNA, 2) κύτταρα MDA-MB-231 που τους είχε γίνει ίδια επεξεργασία με τα πρώτα όμως αντί για siRNA ειδικό για την PDK1 χρησιμοποιήθηκε ένα μη στοχευόμενο Scrambled siRNA, και αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως Negative Control, και 3) κύτταρα MDA-MB-231 που δεν είχαν υποστεί κάποια επεξεργασία, ως Untreated Control.

Προετοιμασία για την κατασκευή των πηκτών:

1. Επιμελής καθαρισμός των πλακών όπου θα γίνει ο πολυμερισμός των πηκτών με αιθανόλη. Έπειτα τοποθετούνται και «κλειδώνουν» σε μία ειδική βάση ανά δύο δημιουργώντας έτσι ένα κενό μεταξύ τους όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή.
2. Έλεγχος για τυχόν διαρροές μεταξύ των πλακών με προσθήκη απιονισμένου H₂O στο ενδιάμεσο κενό. Αυτό αφού διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει διαρροή απορρίπτεται.

Κατασκευή πηκτής διαχωρισμού (Running Gel)

Η πυκνότητα της πηκτής διαχωρισμού μπορεί να μεταβάλλεται, πάντα σε συνάρτηση με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που εξετάζονται. Εάν οι πρωτεΐνες διαθέτουν υψηλά μοριακά βάρη κατασκευάζεται πηκτή χαμηλότερης πυκνότητας και αντίστροφα. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία παρασκευάστηκε πηκτή διαχωρισμού 10% w/v. Αυτή περιείχε τα παρακάτω συστατικά:

Συστατικά πηκτής διαχωρισμού 10%	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1,5M, pH=8.8	2,5 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	3,3 ml
SDS 10%	100 μ l
Απιονισμένο H ₂ O	4,1 ml
APS 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

Πίνακας 5: Συστατικά πηκτής διαχωρισμού

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

1. Σε φιαλίδιο των 50 ml προστίθενται το απιονισμένο νερό, το ακρυλαμίδιο (νευροτοξικό), το ρυθμιστικό διάλυμα Tris που είναι υπεύθυνο για την διατήρηση του pH, και το SDS που συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τελευταία προστίθενται τα APS (ammonium peroxodisulfate) και TEMED τα οποία εκκινούν τον πολυμερισμό.
2. Ήπια ανάδευση του φιαλιδίου και εισαγωγή του μίγματος στην διάταξη της ηλεκτροφόρησης, μεταξύ του κενού των δύο πλακών με χρήση πιπέτας.
3. Κάλυψη του μίγματος με απιονισμένο νερό και η πηκτή αφήνεται να πήξει για τουλάχιστον 30 min.
4. Αφού ολοκληρωθούν τα 30 min, το νερό αποχύνεται και ξεκινά η παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης (πυκνότητα 5%).

Κατασκευή πηκτής επιστοίβασης (Stacking Gel)

Η πηκτή αυτή είναι πάντα πυκνότητας 5%. Τα συστατικά που περιέχει αναλύονται στον παρακάτω πίνακα:

Συστατικά πηκτής επιστοίβασης	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,5M, pH=6.8	2,5 ml
Ακρυλαμίδιο 30%	1,7 ml
Απιονισμένο H ₂ O	5,7 ml
SDS 10%	100 μ l
APS 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

Πίνακας 8: Συστατικά πηκτής επιστοίβασης

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή του, αναλύονται παρακάτω:

1. Προσθήκη των συστατικών σε φιαλίδιο των 50 ml, με την ίδια σειρά που περιεγράφηκε και για την πηκτή διαχωρισμού. Τελευταία μπαίνουν πάντα τα APS και TEMED.
2. Ανάδευση και προσθήκη του μίγματος με πιπέτα ανάμεσα από τις δύο πλάκες πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Μέσα σε αυτή την διάταξη προστίθεται ένα ειδικό «χτενάκι» για σχηματισμό των πηγαδιών που θα φορτωθούν τα δείγματα πάνω στην πηκτή επιστοίβασης. Αφήνεται να πήξει για τουλάχιστον 20 min.

Προετοιμασία δειγμάτων

Η επόμενη φάση αυτού του σταδίου είναι η προετοιμασία των δειγμάτων που θα μουν στην ηλεκτροφόρηση:

1. Προσθήκη 7 ml loading buffer και PBS στο κάθε δείγμα. Η ποσότητα του PBS υπολογίζεται ξεχωριστά για κάθε δείγμα, ανάλογα την συγκέντρωση των πρωτεϊνών που προέκυψε από την δοκιμασία Bradford. Τα συστατικά του loading buffer είναι:

Συστατικά loading buffer	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,5 M, pH=6,8	100 μl
Γλυκερόλη	400 μl
SDS 20%	100 μl
μπλε της βρωμοφαινόλης 0,2% (w/v)	100 μl
B-μερκαπτοαιθανόλη	100 μl

Πίνακας 9: Συστατικά loading buffer

2. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για λίγα λεπτά.
3. Επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 95°C για 5 min ώστε να γίνει μετουσίωση των πρωτεϊνών τους. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση τοποθετούνται αμέσως στον πάγο.

Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης

Αφού η πηκτή επιστοίβασης πήξει, αφαιρείται το «χτενάκι» για τον σχηματισμό των πηγαδιών, και οι πλάκες με τις πηκτές μεταφέρονται στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (running buffer), με pH 8,3 και σύσταση ως εξής:

Συστατικά Running Buffer 10X	Ποσότητα
Tris Base, pH=8,3	30,3 gr
Γλυκίνη	144 gr
Απιονισμένο νερό	1000 ml
SDS	10 gr

Πίνακας 10: Συστατικά Running Buffer

Γίνεται αραίωση του Running Buffer με απιονισμένο νερό μέχρις ότου φτάσει συγκέντρωση 1X.

Ακολουθώς:

1. Φόρτωση δειγμάτων και μάρτυρα σε πηγαδάκια με χρήση πιπέτας (30 μl δείγματος σε κάθε πηγαδάκι).
2. Προσθήκη επιπλέον running buffer μέχρι να καλυφθούν πλήρως οι πηκτές.
3. Σύνδεση συσκευής ηλεκτροφόρησης με το τροφοδοτικό και ρύθμισή της στα 100 Volt.
4. Αναμονή για ολοκλήρωση για περίπου μιάμιση ώρα.

Μεταφορά σε μεμβράνη PVDF

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση πρέπει να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μία μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride), ώστε να μπορεί να γίνει κατάλληλα η επώαση με τα αντισώματα. Η διαδικασία πραγματοποιείται ως εξής:

1. Αφαίρεση της πηκτής από τις πλάκες και μεταφορά της με την βοήθεια ενός ειδικού χαρτιού Whatman.
2. Στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται κατά σειρά από κάτω προς τα πάνω: 1) 1 σφουγγάρι, 2) μεμβράνη PVDF, 3) Πηκτή, 4) 1 Σφουγγάρι

Τα σφουγγάρια έχουν εμποτιστεί με ρυθμιστικό διάλυμα transfer buffer 1X, ενώ η μεμβράνη εισάγεται σε μεθανόλη ώστε να ενεργοποιηθεί και έπειτα ξεπλένεται σε απιονισμένο νερό. Τέλος τοποθετείται σε transfer buffer για 5 min. Το τελευταίο αποτελείται από:

Συστατικά Transfer Buffer 10X	Ποσότητα
Tris Base, pH= 8,5	30,3 gr
Γλυκίνη	144 gr

Πίνακας 11: Συστατικά transfer buffer 10X

Προκειμένου να αραιωθεί το transfer buffer από 10X σε 1X αναμιγνύεται με 200 ml μεθανόλης και 700 ml απιονισμένου νερού.

3. Ο σχηματισμός φυσαλίδων μεταξύ των στρώσεων είναι μη επιθυμητός ώστε να μπορέσει να γίνει ολοκληρωμένα η μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη από την πηκτή.
4. Εισαγωγή διάταξης στο συρτάρι της συσκευής μεταφοράς (Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad) και εκκίνηση της συσκευής ρυθμίζοντάς την στα 1,3 A σταθερά και 25V κυμαινόμενα για 20 min.
5. Εξαγωγή του συρταριού από την συσκευή και χρώση της μεμβράνης με χρωστική Ponceau S. προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη πρωτεϊνικών ζωνών πάνω στην μεμβράνη.
6. Πλύση της μεμβράνης με διάλυμα TBST 1X που αποτελείται από:

Συστατικά TBST 1X	Ποσότητα
-------------------	----------

Υδατικό διάλυμα NaCl 0,9% (w/v)	950 ml
Tris-Cl 1M, pH=7,4	50 ml
TWEEN 20 0,1 %	1 ml

Πίνακας 12: Συστατικά TBST 1X

7. Επώαση για 60 min υπό ανάδευση σε 45 rpm, με TBST 1X που περιέχει 5% FBS, ώστε να αποκλειστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης πάνω στην μεμβράνη.
8. Πλύση της μεμβράνης με TBST 1X για 10 min υπό ανάδευση σε 65 rpm.
9. Επανάληψη του βήματος 8, επί 2-3 φορές μέχρι να ξεπλυθεί καλά η μεμβράνη.
10. Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα το οποίο προσδένεται ειδικά στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Η επώαση είναι ολονύκτια στις 45 rpm και σε θερμοκρασία 4°C.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πρωτογενή όπως και τα δευτερογενή αντισώματα πριν χρησιμοποιηθούν για τις επώσεις αραιώνονται με διάλυμα που περιέχει 1% FBS, TBST 1X και συντηρητικό θυμεροζόλη. Πριν την προσθήκη των συστατικών γίνονται οι ανάλογοι υπολογισμοί των ποσοτήτων.

Επώαση με συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (HRP) αντίσωμα

Ρόλος του αντισώματος συνδεδεμένου με HRP είναι η ανίχνευση του πρώτους ειδικού αντισώματος με παράλληλη εκπομπή χημειοφωταύγειας χάρις στην σύζευξή του με ένα ένζυμο υπεροξειδάσης (HRP -Horseradish Peroxidase) που καταλύει την αντίδραση παραγωγής χημειοφωταύγειας κατά τη μετατροπή ειδικού υποστρώματος του ενζύμου. Έτσι, μπορούμε να έχουμε έμμεσα τον εντοπισμό και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Η διαδικασία επώασης με αντίσωμα συνδεδεμένου με HRP, περιγράφεται παρακάτω:

1. Αφαίρεση του πρωτογενούς αντισώματος
2. Πλύση της μεμβράνης με TBST 1X υπό ανάδευση 70 rpm για 10 min.
3. Επανάληψη του βήματος 2 επί 2-3 φορές.
4. Προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος και επώαση για 60 min υπό ανάδευση 45 rpm.
5. Αφαίρεση δευτερογενούς αντισώματος
6. Πλύση της μεμβράνης με TBST 1X υπό ανάδευση 65 rpm για 10 min
7. Επανάληψη του βήματος 6 επί 3 φορές ως ότου ξεπλυθεί καλά η μεμβράνη.

Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πρωτογενές Αντίσωμα	Οργανισμός Προέλευσης	Αραίωση	Εταιρεία
Anti-PDK1	Rabbit	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 13037
Anti-actin β	Mouse	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 3700
Anti- caspase 3	Rabbit	1:1.000	Cell Signaling, κωδικός: 39579

Πίνακας 13: Πρωτογενή αντισώματα για PDK1, Caspase 3 και ακτίνη β .

Συνδεδεμένο με HRP αντίσωμα	Οργανισμός Προέλευσης	Αραίωση	Εταιρεία
Anti-Rabbit	Rabbit	1:10.000	Cell Signaling, κωδικός: 7074
Anti-Mouse	Mouse	1:10.000	Cell Signaling, κωδικός: 7893

Πίνακας 14: Συνδεδεμένα με HRP αντισώματα.

Οπτικοποίηση Αποτελεσμάτων

Προκειμένου να αποτυπωθούν τα αποτελέσματα της Western Blot, χρησιμοποιείται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced chemiluminescence- ECL). Πιο συγκεκριμένα, γίνεται χρήση ειδικών αντιδραστηρίων A και B τα οποία περιέχουν λουμινόλη, H_2O_2 , και κουμαρικό οξύ. Ουσιαστικά γίνεται οξείδωση της λουμινόλης από την HRP παρουσία H_2O_2 και παράγεται το 3-αμινοφθαλικό, το οποίο εκπέμπει φως στα 425 nm μετά από διέγερσή του [55]. Τα βήματα της διαδικασίας οπτικοποίησης είναι τα εξής:

1. Ανάμιξη με πιπέτα 750 μ l αντιδραστηρίου A και 750 μ l αντιδραστηρίου B σε ένα φιαλίδιο erpendorf.
2. Επώαση της μεμβράνης στο παραπάνω διάλυμα που παρασκευάστηκε για 5 min υπό συνθήκες σκότους.
3. Τοποθέτηση μεμβράνης σε ειδική συσκευή Imager Uvitec Cambridge και με χρήση λογισμικού Alliance, Version 16.06 ολοκληρώνεται η οπτικοποίηση.

Αφού ολοκληρωθεί η οπτικοποίηση εμφανίζονται στην μεμβράνη οι ζώνες των πρωτεϊνών και του μάρτυρα. Ο μάρτυρας κινείται όπως και οι πρωτεΐνες δημιουργώντας ζώνες εμφανείς με γνωστά μοριακά βάρη που βοηθούν να προσεγγιστεί το μοριακό βάρος των υπόλοιπων πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, η PDK1 αντιστοιχεί σε ζώνη μεταξύ 58 και 68 kDa, η προκασπάση 3 σε ζώνη περίπου σε ζώνη 32 kDa, ενώ η ακτίνη β που χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη αναφοράς για την ποσότητα πρωτεΐνης που έχει φορτωθεί από κάθε δείγμα (housekeeping gene), εντοπίζεται κατά προσέγγιση στην ζώνη των 45 kDa.

Τα αποτελέσματα ποσοτικοποιούνται μέσω του προγράμματος Image J., με το οποίο μετρείται η πυκνότητα των ζωνών της μεμβράνης (πυκνομετρία). Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων γίνεται πάντα σε σχέση με την ακτίνη. Επίσης χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Microsoft Excel για τους υπολογισμούς, την στατιστική ανάλυση και την δημιουργία ραβδογραμμάτων.

2.14 Έλεγχος Βιωσιμότητας

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της στοχευμένης αναστολής της PDK1 στην κυτταρική επιβίωση, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με χρήση της χρωστικής Trypan Blue. Η μέθοδος εφαρμόστηκε τόσο σε κύτταρα που είχαν υποστεί μετα-μεταγραφική σίγηση της PDK1 μέσω ειδικού siRNA (βλ. 2.12), όσο και σε κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε φαρμακολογική αναστολή με τον BX-912 (βλ. 2.14.2.2). Η Trypan Blue επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ζωντανών (αδιάβατων από τη χρωστική) και νεκρών (διαπερατών) κυττάρων, παρέχοντας μια άμεση εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά την παρέμβαση.

Έλεγχος βιωσιμότητας σε κύτταρα που έχουν επωασθεί με τον αναστολέα BX-912

Η διαδικασία επώασης και συλλογής των κυττάρων είναι ίδια με αυτή που αναλύθηκε στην ενότητα **2.14.2.2** στα πειράματα κυτταρομετρίας στην περιγραφή της συνθήκης με αναστολέα BX-912. Και σε αυτό το κομμάτι χρησιμοποιούνται τρεις συνθήκες 20, 10 και 5 μM συγκέντρωσης BX-912, για χρονικές στιγμές επώασης 0, 24 και 48 ώρες. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν για σύγκριση και κύτταρα control στις που δεν είχαν υποστεί χορήγηση αναστολέα, στις ίδιες χρονικές στιγμές.

Από τον συνολικό πληθυσμό κυττάρων που συγκεντρώθηκε, έγινε μέτρηση τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών κυττάρων με χρήση της χρωστικής Trypan Blue και του αιμοκυτταρομέτρου Neubauer. Τα ποσοστά βιωσιμότητας υπολογίστηκαν με χρήση του τύπου:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = (\text{ζωντανά κύτταρα} / \text{συνολικός πληθυσμός κυττάρων}) \times 100\%$$

Έλεγχος βιωσιμότητας σε κύτταρα με PDK1 siRNA

Αντίστοιχα, για τον έλεγχο βιωσιμότητας των δειγμάτων που αποσιωπήθηκαν με siRNA, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση με τον τρόπο που περιεγράφηκε στην ενότητα **2.12** και έπειτα, η συλλογή, η καταμέτρηση και οι υπολογισμοί των κυττάρων με την ίδια μεθοδολογία που έγινε και ο έλεγχος βιωσιμότητας σε κύτταρα που είχαν επωασθεί με τον αναστολέα BX-912.

2.15 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

2.15.1 Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί ένα σύνολο βιοχημικών διαδικασιών με απώτερο στόχο την ακριβή αντιγραφή του χρωμοσωμικού DNA του κυττάρου και την ισοκατανομή του σε δύο θυγατρικά κύτταρα γενετικά πανομοιότυπα. Η διαδικασία αυτή οργανώνεται σε δύο ευδιάκριτες φάσεις του κυτταρικού κύκλου: την φάση S (synthesis) όπου και πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού και διαρκεί περίπου 10-12 ώρες και την φάση M (mitosis) που ακολουθεί μετά την S και στην οποία οφείλεται ο διαχωρισμός των αντιγράφων. Συνεπώς, η φάση S καταλαμβάνει περίπου το 50% της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων των θηλαστικών [50].

Με το που ολοκληρωθεί η φάση S, ακολουθεί η φάση M κατά την οποία όπως προαναφέρθηκε επιτελείται ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η διαίρεση του κυττάρου σε δύο θυγατρικά. Η φάση M διαρκεί λιγότερο από μία ώρα στα κύτταρα των θηλαστικών. Η φάση M ξεκινά με την μίτωση, δηλαδή την διαίρεση του πυρήνα [50].

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία ξεκινά με το στάδιο της πρόφασης και την συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων: οι αδελφές χρωματίδες είναι ακόμα συνδεδεμένες μεταξύ τους και η χρωματίνη τους συμπυκνώνεται ακόμα περισσότερο σε συμπαγή χρωμοσώματα ώστε να μπορούν έπειτα να διαχωριστούν. Έπειτα ο πυρηνικός φάκελος διαλύεται και μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου συνδέονται στο κεντρόσωμα του κάθε διπλασιασμένου

χρωμοσώματος που αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες. Ακολουθώς, τα χρωμοσώματα μετακινούνται και ευθυγραμμίζονται στην περιοχή της ισημερινής πλάκας της μιτωτικής ατράκτου ώστε να προετοιμαστούν για τον επικείμενο διαχωρισμό τους (μετάφαση). Κατά την ανάφαση, αρχικά διαχωρίζονται οι αδελφές χρωματίδες και έπειτα μεταφέρονται η κάθε μία σε αντίθετους πόλους της μιτωτικής ατράκτου. Όταν φτάσουν στον κάθε πόλο, ξεκινούν να αποσυμπυκνώνονται και να δημιουργούνται οι δύο νέοι πυρήνες (τελόφαση). Τελικά, επιτελείται και η κυτταροκίνηση, δηλαδή ο διαχωρισμός του κυτταροπλάσματος και συνεπώς και η ολοκλήρωση της μίτωσης [50].

Συνήθως για τον διπλασιασμό των πρωτεϊνών και των οργανιδίων των κυττάρων απαιτείται πολύ περισσότερος χρόνος από ότι χρειάζεται ο διπλασιασμός του DNA. Έτσι προκειμένου να υπάρξει περισσότερος χρόνος για ανάπτυξη προστίθενται και ενδιάμεσες φάσεις στους κυτταρικούς κύκλους. Αρχικά η φάση G1 ανάμεσα στις φάσεις M και S, ενώ η G2 μεταξύ των φάσεων S και μίτωσης. Έτσι συνολικά ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτών διακρίνεται σε 4 φάσεις: G1, S, G2, M. Οι τρεις πρώτες ονομάζονται μεσόφαση και καταλαμβάνουν ως και 24 ώρες του κύκλου ενώ η M φάση μόνο 1 ώρα [50].

2.15.2 Κυτταρομετρία ροής

2.15.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) είναι μία μέθοδος που επιτρέπει την ανάλυση πολλών παραμέτρων μεμονωμένων κυττάρων σε διάλυμα. Αξιοποιεί πηγές φωτός laser προκειμένου να παράξει σήματα σκεδασμένου φωτός και φθορισμού που καταλήγουν σε ανιχνευτές όπως φωτοδιόδοι ή σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστή. Τα σήματα αυτά έπειτα μετατρέπονται σε ηλεκτρικά και αναλύονται από έναν υπολογιστή και μετατρέπονται σε ένα στάνταρ format (.fcs). Οι πληθυσμοί των κυττάρων αναλύονται ή διαχωρίζονται βάσει των χαρακτηριστικών της σκέδασης ή του φθορισμού τους [51].

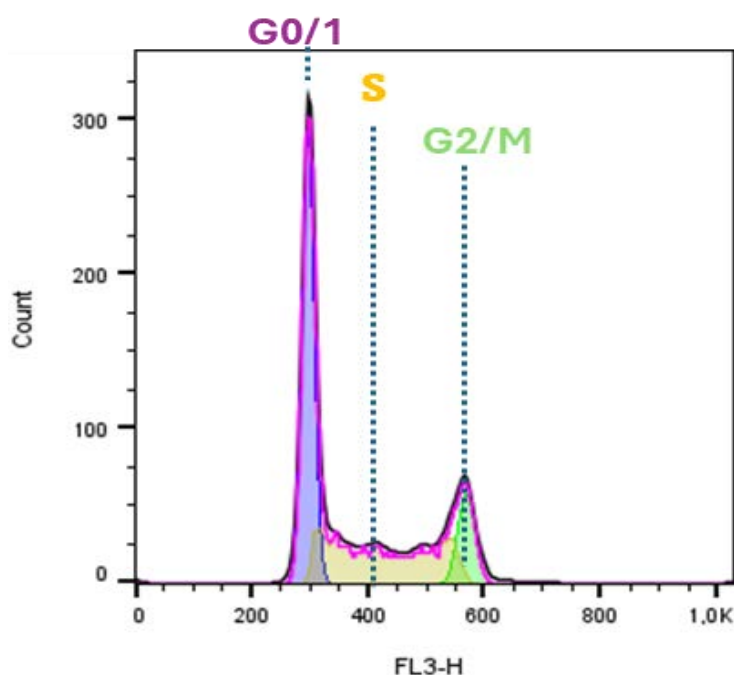
Πιο συγκεκριμένα μέσω της κυτταρομετρίας ροής αναλύονται κύτταρα ή άλλα μικροσωματίδια διερχόμενα ένα-ένα μέσα από μια ή περισσότερες πηγές φωτός laser, ενώ βρίσκονται σε αλκαλικό διάλυμα. Κάθε κύτταρο σκεδάζει το προσπίπτον φως ή φθορίζει μετά από χρήση ορισμένων αντιδραστηρίων [51].

Η σκέδαση μετριέται σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις: 1) την πρόσθια ή αλλιώς πρόσθιο σκεδασμό (forward scatter, FSC) που καταδεικνύει το μέγεθος του κυττάρου και 2) τον πλάγιο σκεδασμό στις 90° (side scatter, SSC) που δίνει πληροφορίες για την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου (granularity). Η μέτρηση της σκέδασης είναι ανεξάρτητη από την μέτρηση του φθορισμού [51].

Κατά την διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων για κυτταρομετρία ροής είναι απαραίτητη η χρήση διάφορων φθορίζουσων χρωστικών όπως το Propidium Iodide (PI), μια χρωστική που προσδένεται στο DNA των κυττάρων και χρησιμοποιείται και στην παρούσα διπλωματική εργασία. Το PI δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και επομένως μπορεί να εισέλθει μόνο εντός νεκρών κυττάρων όπου και δημιουργεί την πρόσδεση στο DNA. Ουσιαστικά παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA ή RNA και εκπέμπει φθορισμό χρώματος κόκκινου. Προκειμένου να διεγερθεί και να ενεργοποιηθεί απαιτείται φως μήκους κύματος 535 nm, ενώ το ίδιο εκπέμπει στα 617 nm [52].

Τέλος, η παρακολούθηση του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής βασίζεται στην μέτρηση της ποσότητας DNA που περιέχει το κάθε κύτταρο. Έτσι, με καταγραφή της περιεκτικότητας σε DNA σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή μπορεί να δημιουργηθεί μια εικόνα με το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου, και πιο συγκεκριμένα G0/G1 (2n), S (μεταξύ 2n και 4n) και G2/M (4n) [51].

Οι διακριτές φάσεις στις οποίες βρίσκεται ένας πληθυσμός κυττάρων φαίνεται στην εικόνα παρακάτω (εικόνα 23). Η πρώτη κορυφή αντιπροσωπεύει κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου το DNA δεν έχει διπλασιαστεί, στη συνέχεια ακολουθεί η φάση S και η επόμενη μικρότερη κορυφή αντιπροσωπεύει κύτταρα που βρίσκονται στη G2 φάση όπου πλέον το DNA είναι διπλασιασμένο.



Εικόνα 17: Αναπαράσταση γραφήματος της προόδου του κυτταρικού κύκλου, που προέκυψε από την ένταση φθορισμού (ποσότητα DNA) και την ποσότητα ασύγχρονων καρκινικών κυττάρων μαστού MB231 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Τα διαφορετικά χρώματα απεικονίζουν τις διαφορετικές περιεκτικότητες σε DNA των κυττάρων και συνεπώς και τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπου βρίσκονται: G1 με 2n (μωβ), S με $2n < x < 4n$ (κίτρινο) και G2/M με 4n (πράσινο).

2.15.2.2 Διαδικασία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με χρήση κυτταρομετρίας ροής σε ασύγχρονα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού και πιο συγκεκριμένα της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο για τα κύτταρα που επώασθηκαν με τον αναστολέα BX-912 όσο και για τα κύτταρα που έχουν υποστεί μετα-μεταγραφική αποσιώπηση της PDK1 με την τεχνολογία του siRNA, με στόχο τη σύγκριση των δυο διαφορετικών μεθόδων στόχευσης της PDK1 και τη μελέτη της επίδρασης που έχει αυτή στην επιβίωση των κυττάρων.

Συνθήκη με χορήγηση του αναστολέα BX-912

Στα κύτταρα τα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας, έγινε χορήγηση του BX-912 σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικούς χρόνους επώασης: 20 μ M, 10 μ M, και 5 μ M,

για 0, 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν την ομάδα κυττάρων ελέγχου στα οποία δεν έγινε καθόλου χορήγηση αναστολέα. Κύριος σκοπός τους πειράματος ήταν η παρατήρηση της επίδρασης της αναστολής της PDK1 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος περιγράφεται παρακάτω:

Ημέρα 1^η: Έλεγχος κυττάρων, ανανέωση θρεπτικού μέσου

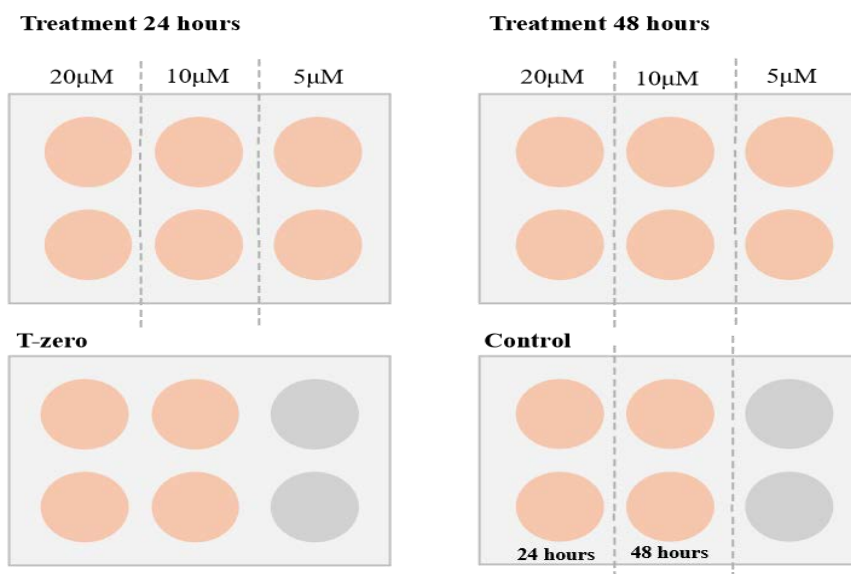
Αρχικά, τα κύτταρα που βρίσκονται στις μεγάλες φλάσκες εμβαδού 75 cm² ελέγχονται για τυχόν επιμολύνσεις καθώς και αν αναπτύσσονται σωστά, ώστε να εξασφαλιστεί πως η κατάλληλη ανάπτυξή τους και η αξιοπιστία των πειραμάτων.

Έπειτα, ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω (2.5).

Ημέρα 2^η: Ανακαλλιέργεια των κυττάρων και διαμοιρασμός σε πιάτα καλλιέργειας

Με σκοπό την παρατήρηση του κυτταρικού κύκλου σε διάφορες χρονικές στιγμές (0, 24 και 48 ώρες) μετά την προσθήκη του αναστολέα, είναι απαραίτητο να γίνει διαμοιρασμός των κυττάρων σε 3 πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα παρακάτω:

1. Αποκόλληση των κυττάρων από την αρχική φλάσκα καλλιέργειας μέσω της θρυψινοποίησης η οποία έχει αναλυθεί και παραπάνω (2.6).
2. Αφού γίνει η φυγοκέντρηση που περιγράφεται κατά την θρυψινοποίηση, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται και γίνεται καλή ανάδευση σε vortex.
3. Τα κύτταρα καταμετρούνται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer όπως έχει ήδη αναλυθεί (2.7).
4. Υπολογισμός της συνολικής ποσότητας κυττάρων καθώς και της ποσότητας εναιωρήματος (2ml) που χρειάζεται ώστε να μεταφερθούν εν τέλει 200.000 κύτταρα σε κάθε πιάτο καλλιέργειας και να υπάρξει η βέλτιστη δυνατή ανάπτυξη.



Εικόνα 18: Πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων για τα πειράματα treatment με BX-912 στα MDA-MB-231 για κυτταρομετρία. Picture made by PowerPoint.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 4 πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων που περιείχαν τα εξής(Εικόνα 20):

- Ένα πιάτο με κύτταρα ελέγχου στα οποία δεν έγινε καθόλου προσθήκη αναστολέα και μονιμοποιήθηκαν την στιγμή που προστέθηκε ο BX-912 στα υπόλοιπα κύτταρα, που ορίζεται ως η χρονική στιγμή 0 (T-zero κύτταρα)
 - Ένα πιάτο με κύτταρα ελέγχου στα οποία επίσης δεν έγινε καθόλου προσθήκη αναστολέα και μονιμοποιήθηκαν τις επόμενες χρονικές στιγμές (24 και 48 ώρες) μαζί με τα κύτταρα στα οποία έγινε η χορήγηση του BX-912.
 - Ένα πιάτο με κύτταρα στα οποία έγινε χορήγηση του BX-912 και αφέθηκαν να επωαστούν για τις επόμενες 24 ώρες μετά την χορήγηση του αναστολέα όποτε και μονιμοποιήθηκαν.
 - Ένα πιάτο με κύτταρα στα οποία έγινε χορήγηση του BX-912 και αφέθηκαν να επωαστούν για τις επόμενες 48 ώρες μετά την χορήγηση του αναστολέα όποτε και μονιμοποιήθηκαν.
5. Συλλογή ανάλογης ποσότητας κυτταρικού εναιωρήματος σε φιαλίδιο των 15 ml και φυγοκέντρωσή του σε 1.200 rpm για 6 min.
 6. Απόχυση υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε RPMI (5% FBS, 1% penstrep, 1% L-glut) και υπολογισμός ποσότητάς του ώστε να υπάρχουν εν τέλει 200.000 κύτταρα/θέση.
 7. Ανάδευση σε vortex και προσθήκη 2 ml από το δείγμα σε κάθε θέση.
 8. Τα κύτταρα αφήνονται στον κλίβανο για 24 ώρες.

Ημέρα 3^η

μηδέν : Προσθήκη του BX-912 και μονιμοποίηση των κυττάρων την χρονική στιγμή

Αφού τα κύτταρα αφεθούν στα πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων στις ιδανικές συνθήκες για περίπου 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν, προστίθεται ο αναστολέας της PDK1 που μελετάται στην παρούσα διπλωματική εργασία (BX-912). Ο τελευταίος διαλύεται σε RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) προστίθεται σε δύο από τα τέσσερα πιάτα καλλιέργειας σε συγκεντρώσεις 20, 10 και 5 μ M. Η διαδικασία ακολούθησε ως έχει:

1. Υπολογισμός απαιτούμενης ποσότητας BX-912 (αρχική συγκέντρωση 20 mM) αλλά και θρεπτικού RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) που χρειάζεται να αναμιχθούν ώστε μετά την προσθήκη 2 ml στα πιάτα ο BX-912 να έχει την κατάλληλη συγκέντρωση.
2. Προσθήκη των ποσοτήτων αναστολέα και θρεπτικού σε φιαλίδιο και ανάδευση σε vortex.
3. Προσθήκη 2 ml μίγματος σε κάθε θέση των δύο πιάτων.
4. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) σε κάθε θέση των πιάτων που περιέχουν κύτταρα control.
5. Επώαση των πιάτων στον κλίβανο μέχρι την στιγμή μονιμοποίησής τους, δηλαδή τις 24 και 48 ώρες.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αμέσως μετά την προσθήκη του BX-912 πραγματοποιείται η μονιμοποίηση των κυττάρων T-zero την χρονική στιγμή 0. Η διαδικασία της μονιμοποίησης περιγράφεται στα παρακάτω βήματα (τα βήματα πραγματοποιήθηκαν εντός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις όπου ήταν απαραίτητο):

1. Συλλογή του εναιωρήματος των 6 θέσεων πιάτων καλλιέργειας σε φιαλίδιο των 10 ml.
2. Πλύση του πιάτου καλλιέργειας 6 θέσεων με 1 ml διαλύματος NaCl με χρήση πιπέτας 1 ml προκειμένου να αφαιρέσουμε υπολείμματα ορού που θα εμποδίσουν την δράση της θρυψίνης. Έπειτα συλλογή του εναιωρήματος κυττάρων και προσθήκη του στο φιαλίδιο.
3. Προσθήκη 0.5 ml θρυψίνης 1X και επώαση των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο για 2 λεπτά ως ότου αποκολληθούν.
4. Αφαίρεση του πιάτου καλλιέργειας από τον επωαστικό κλίβανο και επιστροφή του στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.
5. Προσθήκη 1 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) και καλή ανάδευση με πιπέτα 1 ml προκειμένου να απενεργοποιηθεί καλά η θρυψίνη. Το εναιώρημα συλλέγεται και τοποθετείται και αυτό στο φιαλίδιο των 10 ml.
6. Ξέπλυμα των πιάτων καλλιέργειας με 1 ml διαλύματος NaCl και συλλογή του εναιωρήματος και προσθήκη του στο φιαλίδιο.
7. Το πιάτο καλλιέργειας ελέγχεται στο μικροσκόπιο προκειμένου να ελεγχθεί ότι όντως έχουν μεταφερθεί τα κύτταρα στο φιαλίδιο και δεν έχουν μείνει σημαντικές ποσότητες στο πιάτο 6 θέσεων.
8. Μέτρηση των κυττάρων με χρήση του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer σύμφωνα με την διαδικασία που περιεγράφηκε (**ενότητα 2.7**).
9. Καλή ανάδευση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε vortex και φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 min).
10. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος κυττάρων σε 5 ml διαλύματος NaCl.
11. Ξανά καλή ανάδευση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε vortex και φυγοκέντρηση (1.400 rpm για 10 min).
12. Απόρριψη του υπερκειμένου και πάρα πολύ καλή ανάδευση σε vortex προκειμένου να διαλυθεί το ίζημα από τον πάτο του φιαλιδίου και να διαλυθούν όσο το δυνατόν περισσότερα τα συσσωματώματα.
13. Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 90% στο φιαλίδιο στάγδην και υπό στροβιλισμό στο vortex.
14. Αποθήκευση του μονιμοποιημένου δείγματος στην κατάψυξη στους -20°C.

Η διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω, ακολουθείται με τον ίδιο τρόπο για τα κύτταρα που επωάζονται με τον BX-912 για 24 και 48 ώρες, καθώς για τον πληθυσμό ελέγχου (control).

Συνθήκη με silencing της PDK1

Αφού ολοκληρωθεί η αποσιώπηση με την διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω (**2.12**), και αφεθούν τα κύτταρα να επωαστούν μέχρι την κατάλληλη χρονική στιγμή (0, 24 και 48 ώρες), πραγματοποιείται συλλογή τους με την ίδια διαδικασία που αναλύθηκε προηγουμένως σε αυτή την ενότητα στην συνθήκη χορήγησης του BX-912. Έπειτα ακολουθεί μέτρηση και μονιμοποίηση όλων των δειγμάτων (φαρμακολογικής και μοριακής αποσιώπησης) με την διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

Τελική προετοιμασία όλων των δειγμάτων και ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής

Πριν πραγματοποιηθεί η ανάλυση των κυττάρων στην κυτταρομετρία ροής είναι απαραίτητη η κατάλληλη προετοιμασία τους. Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα για κάθε δείγμα:

1. Αφαίρεση των κυττάρων από την κατάψυξη (-20°C).
2. Προσθήκη 2 ml RPMI (5% FBS, 1% pen-strep, 1% L-glut) στο δείγμα.
3. Προσθήκη 10 ml PBS 1X (Phosphate-buffered saline –αλκαλικό διάλυμα).
4. Φυγοκέντρηση του δείγματος (1.600 rpm για 10 min) ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη 90%.
5. Απόρριψη του υπερκειμένου και ανάδευση σε vortex.
6. Εν τέλει προστίθενται τα παρακάτω:
 - 568 μl διαλύματος κιτρικού νατρίου (sodium citrate).
 - 30 μl Propidium Iodide (PI).
 - 6 μl RNase, ένζυμο για διάσπαση του RNA των κυττάρων ώστε να μην προσδεθεί σε αυτό το PI.
7. Επώαση των δειγμάτων στον επωαστικό κλίβανο για 30 min.

Τέλος γίνεται η ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής και παρατήρηση του κυτταρικού τους κύκλου.

2.16 Στατιστική ανάλυση

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel και ειδικά η δοκιμασία του T-test. Μέσω του τελευταίου υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα (p-value) για τα αποτελέσματα κάθε πειραματικής διαδικασίας. Η σύγκριση για την ανάλυση έγινε κάθε φορά σε σχέση με το εκάστοτε δείγμα control. Κάθε αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό εφόσον για το p-value ίσχυε πως $p\text{-value} < 0,05$.

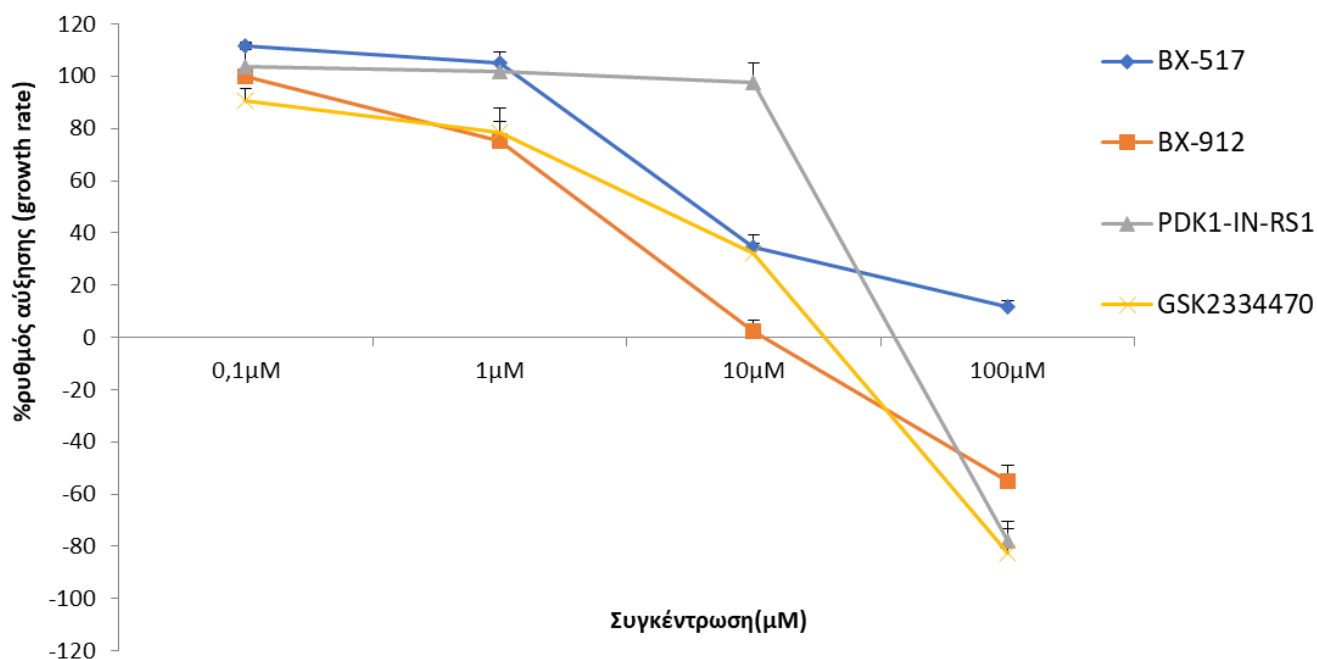
3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα SRB

Κατά την έναρξη των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής, βασιζόμενοι σε δεδομένα προηγούμενων πειραμάτων που διενεργήθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, αλλά και στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, το ενδιαφέρον μας στράφηκε στην PDK1 ως στόχο αναστολής για την κυτταρική σειρά καρκίνου του τριπλά αρνητικού μαστού MDA-MB-231. Σε πρώτη φάση των πειραμάτων, έπρεπε να πραγματοποιηθεί σύγκριση (screening) μεταξύ τεσσάρων αναστολέων της PDK1 όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους. Αυτοί ήταν οι 1) BX-912, 2) BX-517, 3) GSK2334470 και 4) PDK1-IN-RS2.

Πιο συγκεκριμένα, οι τρεις από τους τέσσερις αναστολείς που επιλέχθηκαν, GSK2334470, PDK1-IN-RS2 και BX-912 μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 100, 10, 1 και 0,1 μM ως προς την επίδρασή τους στον ρυθμό ανάπτυξης των MDA-MB-231, ενώ ο τέταρτος, λόγω του ότι στην υψηλή συγκέντρωση των 100 μM ήταν αδιάλυτος σε DMSO μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις 50, 10, 1 και 0,1 μM . Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν και αναλύονται παρακάτω, υπολογίστηκαν οι παράμετροι GI50, TGI, LC50 και TI.

Στο γράφημα (γράφημα 1) φαίνεται η επίδραση των ουσιών για κάθε συγκέντρωση που εξετάστηκε ως προς τον ρυθμό αύξησης των κυττάρων MDA-MB-231 και στον πίνακα (πίνακας) φαίνονται οι τιμές των παραμέτρων για κάθε αναστολέα.



Γράφημα 1: Ρυθμός αύξησης των MDA-MB-231 υπό την επίδραση των 4 αναστολέων.

Όπως φαίνεται και στο γράφημα, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων επηρεάζεται διαφορετικά από τον κάθε αναστολέα αλλά και την συγκέντρωση που εφαρμόζεται στην εκάστοτε περίπτωση.

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του **PDK1-IN-RS2**, στην συγκέντρωση 0,1, 1 και 10 μM ο ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνεται στα ίδια σχεδόν επίπεδα, δηλαδή 100%, 100% και 97% αντίστοιχα. Στην συγκέντρωση 100 μM ωστόσο παρατηρείται απότομη πτώση του αγγίζοντας την αρνητική τιμή του -77%.

Όσον αφορά τον **BX-517**, στην συγκέντρωση 0,1 και 1 μM ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σχετικά σταθερός στο 100%, ενώ έπειτα παρουσιάζει μία έντονη πτώση στην συγκέντρωση 10 μM αγγίζοντας το 34%. Τέλος, στην συγκέντρωση 50 μM η πτώση του ρυθμού ανάπτυξης είναι πιο ήπια φτάνοντας το 11%

Στην περίπτωση του **GSK334470**, ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σχετικά υψηλός μεταξύ των συγκεντρώσεων 0,1 μM και 1 μM , με ποσοστά 90% και 78% αντίστοιχα. Ωστόσο στην συγκέντρωση 10 μM ξεκινά αισθητή μείωσή του στο 32% ενώ σε συγκέντρωση 100 μM η μείωση αγγίζει αρνητικές τιμές στο -82%.

Τέλος, όσον αφορά τον **BX-912**, σε συγκέντρωση 0,1 μM ο ρυθμός αύξησης μένει ανεπηρέαστος στο 100%, ενώ ήδη από την συγκέντρωση 1 μM υπάρχει αισθητή μείωση στο 75%. Παράλληλα, από την συγκέντρωση 10 μM ο ρυθμός μειώνεται ακόμα πιο έντονα στο 2% ενώ στα 100 μM η μείωση είναι δραματική αγγίζοντας το -55%.

Με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης που φαίνεται στο γράφημα και αναλύθηκε ήδη προηγουμένως, υπολογίστηκαν και οι παρακάτω παράμετροι για τον κάθε αναστολέα ξεχωριστά:

	<i>Παράμετροι BX-517 (μM)</i>	<i>BX-912 (μM)</i>	<i>PDK1-IN-RS1(μM)</i>	<i>GSK2334470 (μM)</i>
GI50	7,8	4,2	34	6,6
TGI	74	14,3	60	35
LC50	>100	95	85	75
TI	12	22	2,5	11,4

Πίνακας 6: In vitro κυτταροτοξική δράση των τεσσάρων αναστολέων έναντι των MDA-MB-231. Παρουσιάζονται οι τέσσερις παράμετροι GI50, TGI, LC50 και TI που χαρακτηρίζουν την in vitro δράση των αναστολέων.

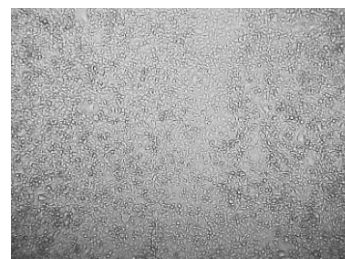
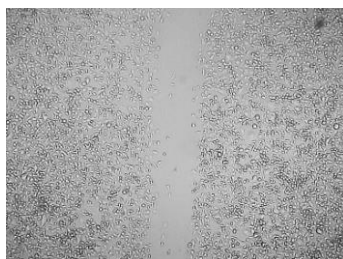
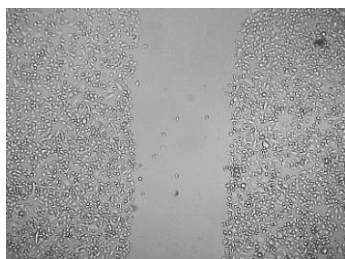
Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, ο **BX-912** εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή **GI50** (συγκέντρωση ουσίας όπου εμφανίζεται 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων) σε σχέση με τους υπόλοιπους αναστολείς, με τις τιμές της GI50 των BX-517 και GSK2334470 να είναι ελαφρώς αυξημένες, ενώ του PDK1-IN-RS2 σχεδόν οκταπλάσια. Όσον αφορά την παράμετρο TGI (συγκέντρωση ουσίας όπου εμφανίζεται ολική αναστολή ανάπτυξης), ο **BX912** διαθέτει με διαφορά την χαμηλότερη τιμή **TGI**, ενώ η TGI του BX-517 είναι σχεδόν πενταπλάσια, του PDK1-IN-RS2 τετραπλάσια και του GSK2334470 σχεδόν 2,5 φορές μεγαλύτερη από του BX-912. Αναφορικά με την τιμή **LC50** (συγκέντρωση ουσίας που αντιστοιχεί σε θάνατο του 50% των κυττάρων), οι τιμές των **PDK1-IN-RS2**, **GSK2334470** και **BX-912** προσεγγίζουν η μία την άλλη, με τον τελευταίο να διαθέτει την υψηλότερη (95 μM), τον δεύτερο την αμέσως επόμενη (85 μM) και τον πρώτο την χαμηλότερη (75 μM). Ωστόσο η διαφορά δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις αναστολέων. Τέλος, στον BX-517, παρατηρείται η υψηλότερη τιμή LC50 (>100 μM).

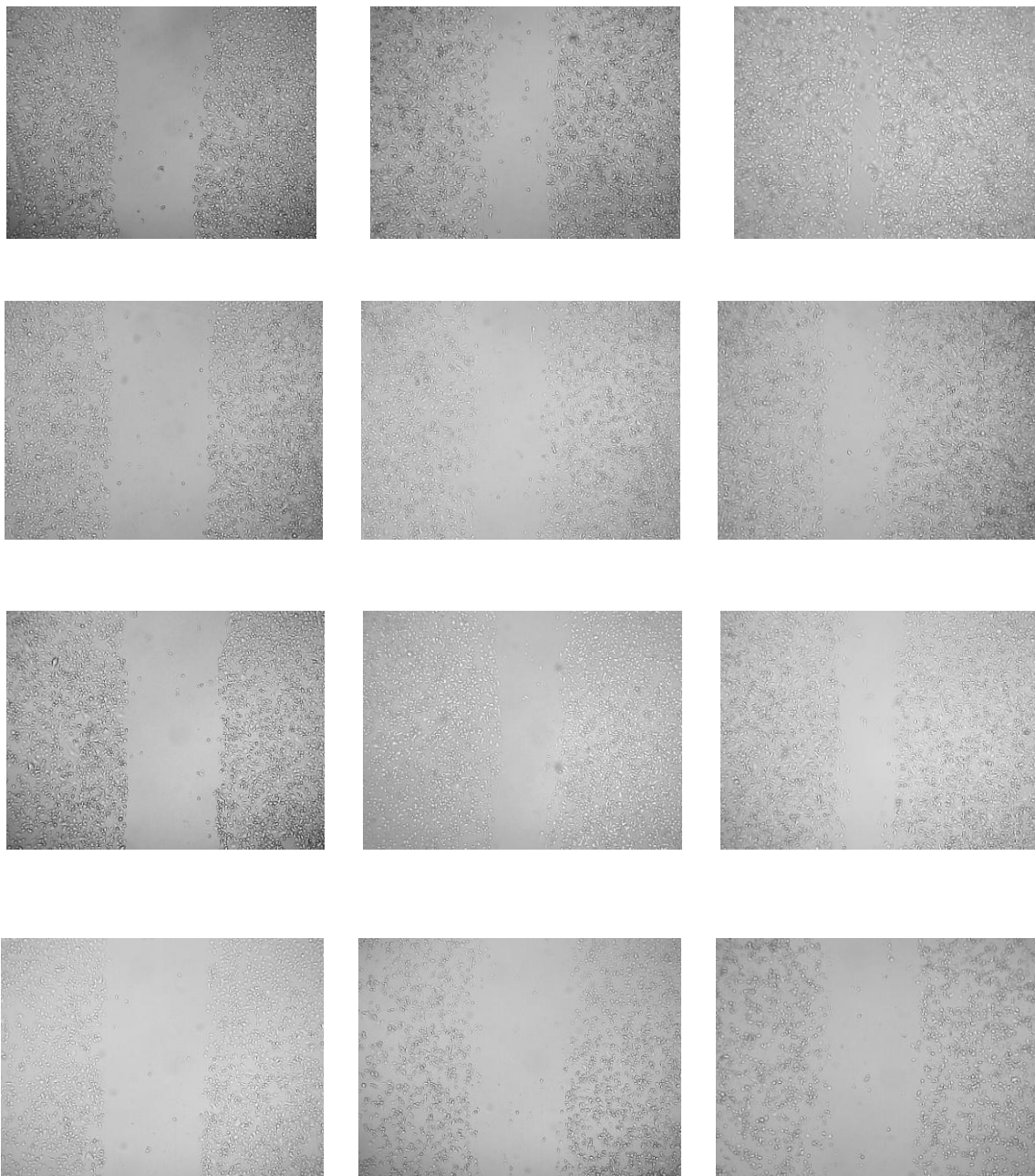
Συμπερασματικά, υπολογίζοντας τον **θεραπευτικό δείκτη (Therapeutic Index, TI)** των επιμέρους αναστολέων -ο οποίος εκφράζει το εύρος της διαφοράς μεταξύ της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (GI_{50}) και της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης (LC_{50})- διαπιστώθηκε ότι ο BX-912 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή TI. Συνεπώς, διαθέτει και το ευρύτερο θεραπευτικό παράθυρο, γεγονός που τον καθιστά τον ασφαλέστερο υποψήφιο από τους αναστολείς που μελετήθηκαν.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις πειραμάτων. Βάσει αυτών, κρίθηκε ότι η πειραματική πορεία θα συνεχιστεί με τον αναστολέα BX-912, του οποίου οι φαρμακολογικές παράμετροι ήταν οι πιο ικανοποιητικές και συμβατές με τις ανάγκες της μελέτης. Συγκεκριμένα, επιδιώκεται η επιλογή αναστολέα με όσο το δυνατόν χαμηλότερες τιμές GI_{50} και TGI, ώστε η ουσία να παρουσιάζει ανασταλτική δράση ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, και ταυτόχρονα υψηλή τιμή LC_{50} , προκειμένου να αποφεύγεται η έντονη κυτταροτοξικότητα, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει και υγιείς κυτταρικούς πληθυσμούς. Τέλος, είναι επιθυμητό ο θεραπευτικός δείκτης (TI) να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερος, καθώς αυτό αντανakλά ένα ευρύτερο θεραπευτικό παράθυρο, δηλαδή μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης και της ελάχιστης αποτελεσματικής δόσης.

3.2 Αποτελέσματα δοκιμασίας ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound Healing Assay/scratch assay)

Μέσω της διαδικασίας ελέγχου επούλωσης πληγών μελετήθηκε η ικανότητα του αναστολέα BX-912 να επηρεάζει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων MDA-MB-231. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων έγινε κατά τις ώρες 0 (στιγμή που δημιουργήθηκε η πληγή), και 24 και 48 μετά την προσθήκη του αναστολέα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Κάτωθι παρατίθενται ενδεικτικές εικόνες των αποτελεσμάτων για κάθε χρονική στιγμή σε κάθε συγκέντρωση, που φωτογραφήθηκαν με ανάστροφο μικροσκόπιο.





Εικόνα 19: Απεικόνιση της μετανάστευσης των κυττάρων MDA-MB-231 στα οποία έχει προστεθεί BX-912 (20, 10, 5, 1 μ M) στα χρονικά σημεία 0, 24 και 48 ώρες σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (CNT).

Λαμβάνοντας υπόψιν με τα εμβαδά των «πληγών» στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό μετανάστευσης σε σχέση με την αρχική πληγή κατά την στιγμή μηδέν. Το γράφημα 2 απεικονίζει τα ποσοστά αυτά σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης και τη συγκέντρωση του αναστολέα .

Πιο συγκεκριμένα, από την ανάλυση του ποσοστού μετανάστευσης των κυττάρων για κάθε συνθήκη ξεχωριστά προέκυψε ότι:

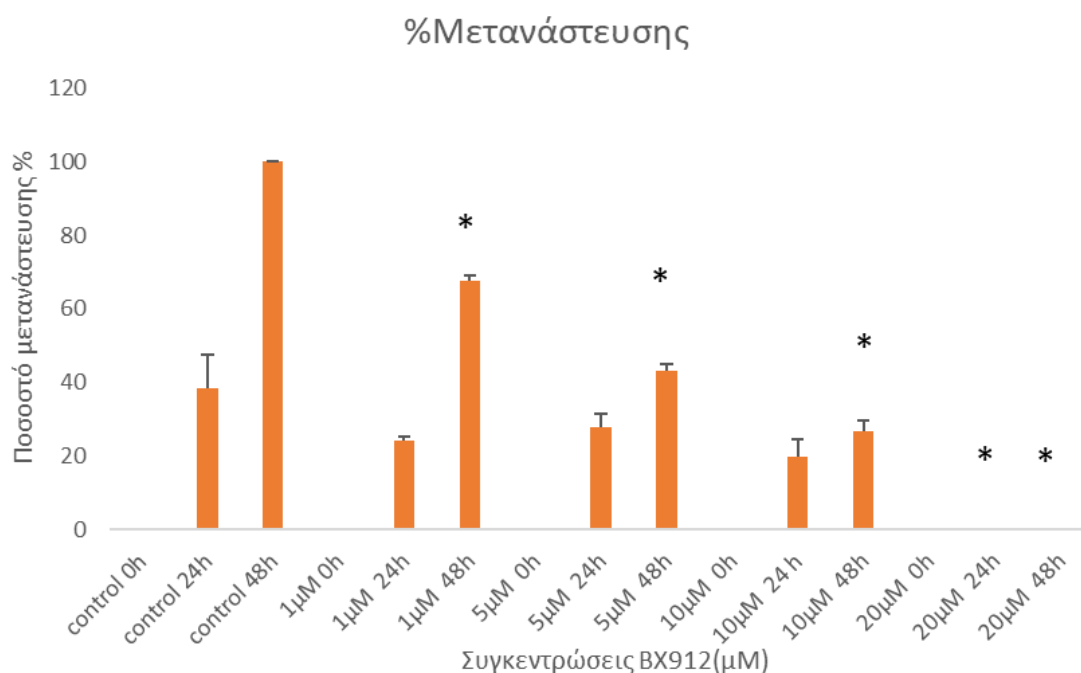
Μετά από **24 ώρες** επώασης με τον αναστολέα BX-912:

- Για τα κύτταρα control προσεγγίζει το 38% - Για την συγκέντρωση 1 μ M προσεγγίζει το 24% - Για την συγκέντρωση 5 μ M προσεγγίζει το 27% - Για την

συγκέντρωση 10 μM προσεγγίζει το 19% - Για την συγκέντρωση 20 μM προσεγγίζει το 0%

Μετά από **48 ώρες** μετά την χορήγηση του BX-912:

- Για τα κύτταρα control φτάνει το 100% - Για την συγκέντρωση 1 μM προσεγγίζει το 67,5% - Για την συγκέντρωση 5 μM προσεγγίζει το 43% - Για την συγκέντρωση 10 μM προσεγγίζει το 26% - Για την συγκέντρωση 20 μM προσεγγίζει το 0%



***Γράφημα 2:** Ποσοστό μετανάστευσης των MDA-MB-231 έπειτα από χορήγηση του BX-912. Οι ράβδοι δείχνουν τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση δυο ανεξάρτητων πειραμάτων. * $p < 0,05$ vs Control 24/48h.*

Συνεπώς, φαίνεται πως η αναστολή της μετανάστευσης των κυττάρων είναι σχετιζόμενη με την συγκέντρωση του αναστολέα, καθώς όσο αυτή αυξάνεται, τόσο μειώνεται η μεταναστευτική ικανότητα των MDA-MB-231. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πιο εμφανή μετά από 48 ώρες επώασης καθώς το ποσοστό μετανάστευσης των κυττάρων παραμένει αισθητά μειωμένο στα κύτταρα που έχουν επωασθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις BX-912 σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (control) τα οποία έχουν μεταναστεύσει πλήρως κλείνοντας την πληγή. Τη μεγαλύτερη αντιμεταναστευτική δράση εμφανίζει η μεγαλύτερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε καθώς ο αναστολέας εμποδίζει την μετανάστευση των κυττάρων τόσο στις 24 όσο και τις 48 ώρες με τον ίδιο τρόπο. Η σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων αποτυπώνεται και στην στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) που καταδεικνύει ότι τα αποτελέσματα δεν είναι τυχαία, αποτελώντας παρατηρήσεις επανάληψης δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

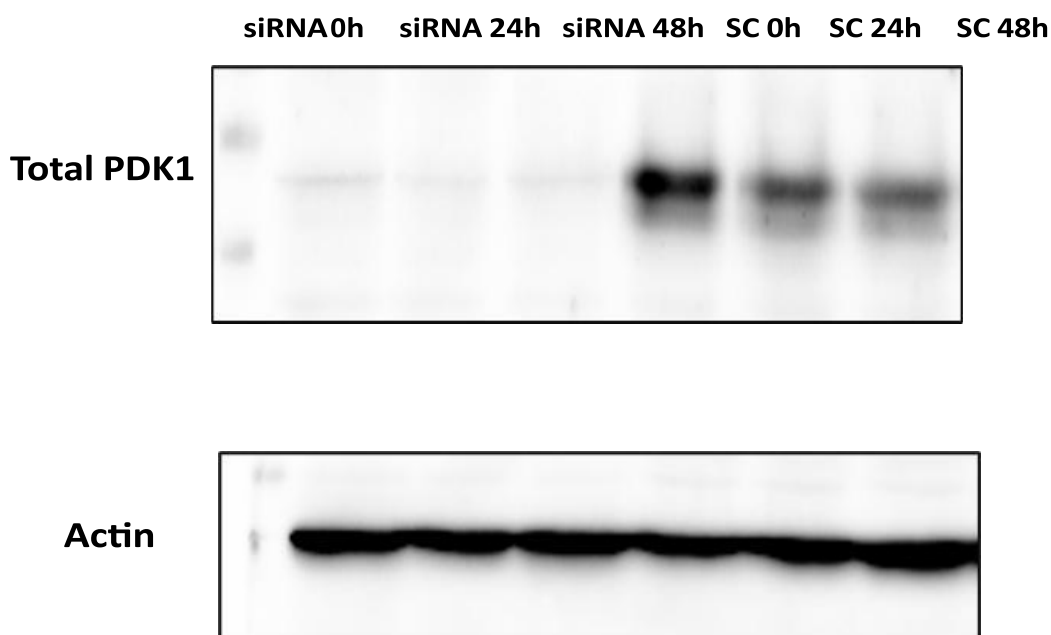
Συμπερασματικά λοιπόν, η δράση του BX-912 στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων είναι τόσο δόσοεξαρτώμενη όσο και χρονοεξαρτώμενη.

3.3 Αποτελεσματικότητα αποσιώπησης της PDK1 βάσει των αποτελεσμάτων της Western Blot

Η Western Blot εφαρμόστηκε σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων MDA-MB-231 που πρωτύτερα είχαν υποστεί σίγηση έκφρασης της πρωτεΐνης PDK1 με χρήση siRNA και λιποαφεκταμίνης. Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν η επιβεβαίωση της αποτελεσματικής σίγησης της PDK1 ώστε να μπορέσουμε να προχωρήσουμε στη μελέτη της επίδρασης αυτής στην επιβίωση των κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων:

1. **Κατηγορία 1^η:** Κύτταρα που υπέστησαν αποσιώπηση με ειδικό για την PDK1 siRNA (siRNA).
2. **Κατηγορία 2^η:** Κύτταρα που υπέστησαν την ίδια επεξεργασία με τα κύτταρα της κατηγορίας 1, με την διαφορά ότι το siRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν μη ειδικό και μη στοχευόμενο (**scrambled, Sc**).

Τα κύτταρα της δεύτερης κατηγορίας χρησιμοποιήθηκαν ως negative control, ενώ τα χρονικά σημεία μελέτης της έκφρασης της πρωτεΐνης καθορίστηκαν στις 0, 24 και 48 ώρες (με χρόνο μηδέν να ορίζονται ως οι 72 ώρες μετά την εφαρμογή του siRNA).



Εικόνα 20: Επίπεδα έκφρασης των PDK1, και ακτίνης σε κύτταρα που επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες μετά την αναστολή της PDK1 με siRNA.

Στα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι:

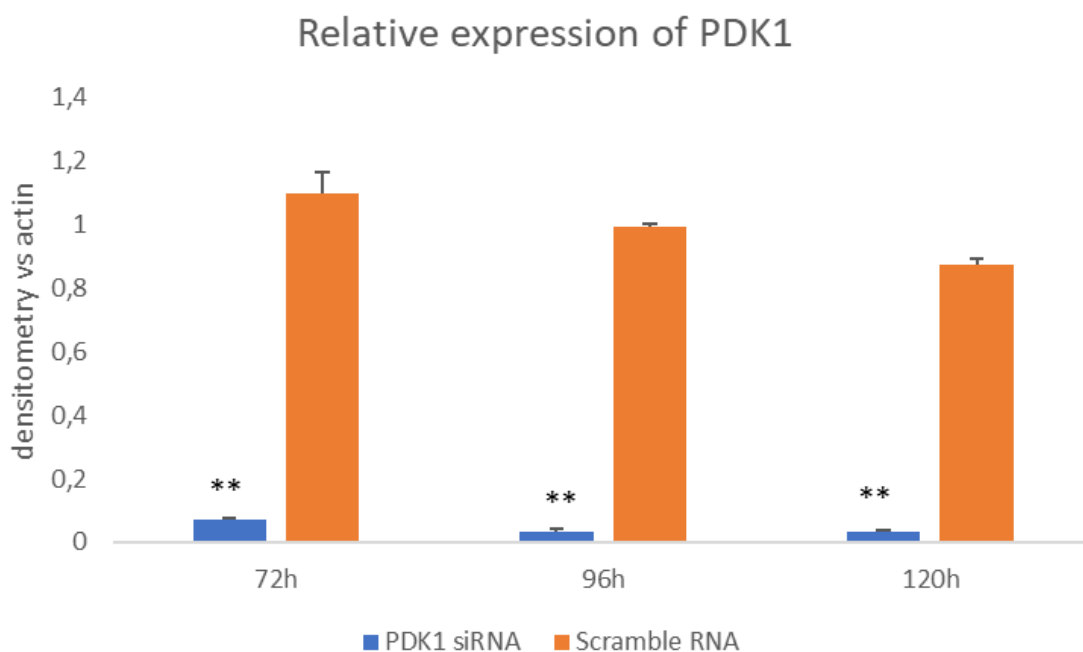
Οι ζώνες της ακτίνης είναι ίδιου πλάτους και έντασης, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι έγινε ισόποσο φόρτωμα πρωτεΐνης σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής κατά την ηλεκτροφόρηση, αφού η ακτίνη είναι ιδιοσύστατο γονίδιο.

Η έκφραση της PDK1 έχει μειωθεί δραματικά λόγω της αποσιώπησης, ήδη από την ώρα μηδέν (72 ώρες), ενώ εμφανίζεται ακόμα περισσότερο μειωμένη έως μηδενική στις 24

και 48 ώρες (96 και 120 ώρες) κάτι που δεν παρατηρείται στα δείγματα Negative Control σε κανένα χρονικό διάστημα. Μάλιστα, η μείωση αυτή που παρατηρήθηκε στα αποσιωπημένα κύτταρα είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (Scrambled Control) ($p\text{-value}<0,005$)

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι η αποσιώπηση της PDK1 πραγματοποιήθηκε επιτυχώς στα κύτταρα MDA-MB-231, επιτυγχάνοντας σχεδόν πλήρη αποσιώπηση των συνολικών επιπέδων της πρωτεΐνης.

Στο παρακάτω γράφημα (γράφημα 3) παρουσιάζεται το ραβδόγραμμα όπου απεικονίζεται η πυκνότητα των επιπέδων έκφρασης της PDK1 σε σχέση με τα επίπεδα ακτίνης (μάρτυρας ισοφορτώματος). Πιο συγκεκριμένα η έκφραση της PDK1 έχει μειωθεί δραστικά, μηδενίζοντας σχεδόν τα επίπεδά της ειδικά ως την χρονική στιγμή των 120 ωρών. Συνεπώς η αποσιώπηση ήταν αποτελεσματική. Η μέτρηση της πυκνότητας έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο λόγος της πυκνότητας της πρωτεΐνης ως προς την πυκνότητα της ακτίνης.



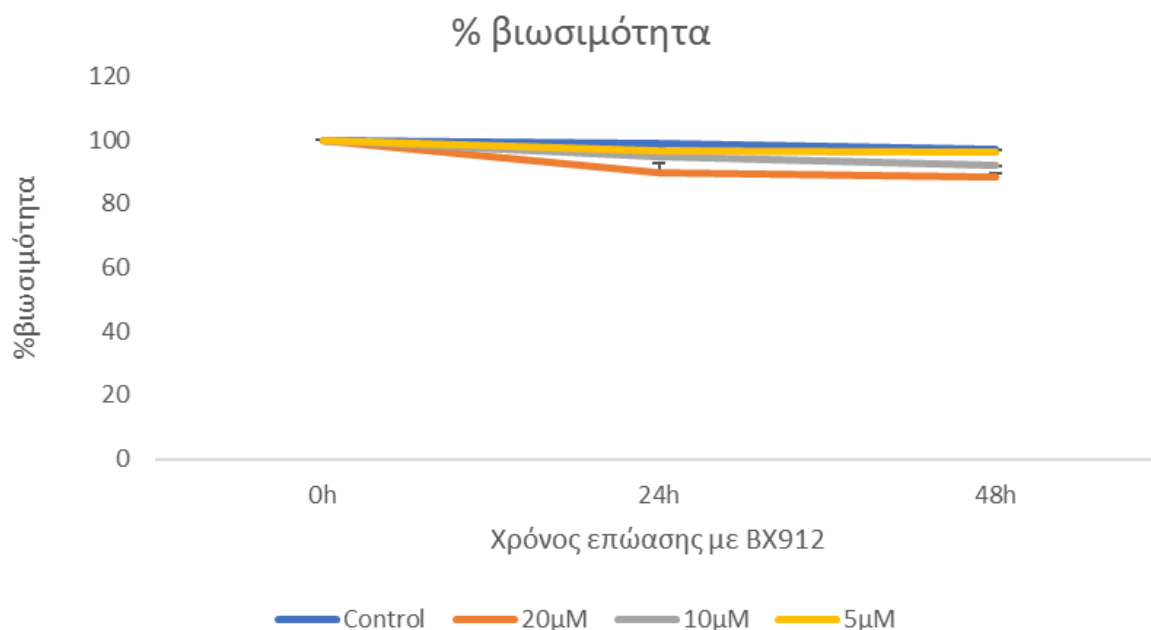
*Γράφημα 3: Ραβδόγραμμα πυκνομετρίας των επιπέδων έκφρασης της PDK1 σε σχέση με την ακτίνη. Οι ράβδοι δείχνουν τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση δυο ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $p<0,005$ vs Scrambled RNA72/96/120h.*

3.4 Αποτελέσματα μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων μετά από χορήγηση αναστολέα ή αποσιώπησης της PDK1

3.4.1 Αποτελέσματα βιωσιμότητας έπειτα από χορήγηση BX-912

Σε συνέχεια των πιο πάνω μελετών μελετήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων MDA-MB-231 μετά από επώαση με τον αναστολέα για 24 και 48 ώρες, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μάρτυρες (control) που δεν επωάστηκαν με κάποια ουσία ούτε υπέστησαν κάποια τροποποίηση, καθώς και κύτταρα control που επίσης δεν επωάστηκαν με ουσία και μονιμοποιήθηκαν την χρονική στιγμή μηδέν (T-zero), που ορίζεται ως η χρονική στιγμή που χορηγήθηκε ο αναστολέας στα επωαζόμενα κύτταρα. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν

διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα και πιο συγκεκριμένα, 5, 10 και 20 μM . Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ελέγχου βιωσιμότητας απεικονίζονται συνοπτικά στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 4: Βιωσιμότητα κυττάρων μετά από επώασή τους με BX-912.

Στο χρονικό σημείο 0 η βιωσιμότητα όλων των κυττάρων αντιστοιχεί σε ποσοστό 100%

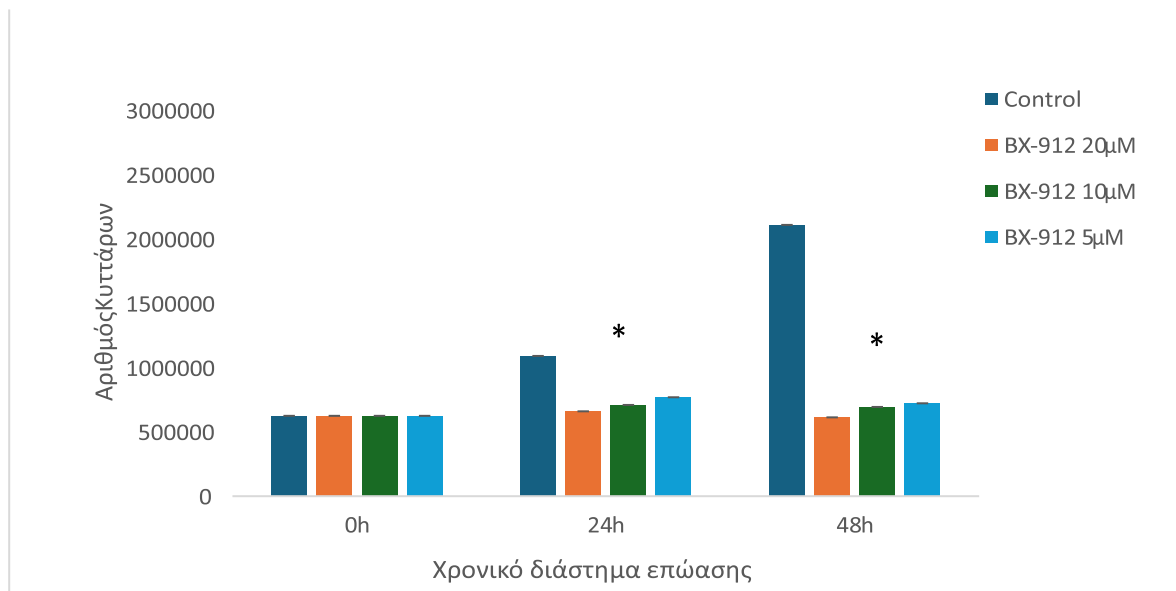
Έπειτα, παρατηρούμε πως μετά από 24ώρες επώασης:

- Το δείγμα control έχει βιωσιμότητα σχεδόν 99%
- Για συγκέντρωση 5 μM η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 97%
- Για συγκέντρωση 10 μM η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 94%
- Για συγκέντρωση 20 μM η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 89,5%

Παρομοίως, για το timepoint των 48 ωρών παρατηρείται:

- Το δείγμα control έχει βιωσιμότητα σχεδόν 97%
- Για συγκέντρωση 5 μM η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 96%
- Για συγκέντρωση 10 μM η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 92%
- Για συγκέντρωση 20 μM η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 88%

Βάσει των παραπάνω συμπεραίνεται πως ο αναστολέας αν και δεν επηρεάζει δραματικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων, εξακολουθεί να έχει δόσοεξαρτώμενο χαρακτήρα, με την βιωσιμότητα να είναι αντιστρόφως ανάλογη της αυξανόμενης δόσης.



*Γράφημα 5: Αύξηση του αριθμού κυττάρων μετά από επώαση με BX-912 (*p value < 0,05 vs Control)*

Επιπλέον με βάση το ραβδόγραμμα του απόλυτου αριθμού κυττάρων για κάθε συνθήκη που μελετήθηκε προκύπτει συνολικά ότι:

Η αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση χρώσης Trypan Blue ανέδειξε ότι το ποσοστό ζωντανών κυττάρων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των κυττάρων που εκτέθηκαν στον αναστολέα και των αντίστοιχων controls, υποδηλώνοντας την απουσία σημαντικής κυτταροτοξικότητας. Ωστόσο, η ποσοτική ανάλυση του απόλυτου αριθμού κυττάρων ανά χρονικό σημείο αποκάλυψε ότι στα control δείγματα ο αριθμός των κυττάρων αυξανόταν σημαντικά στις 24 και 48 ώρες (υποδεικνύοντας ενεργό κυτταρικό πολλαπλασιασμό), ενώ στα κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε φαρμακολογική αναστολή, ο αριθμός των κυττάρων παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος, μια διαφορά η οποία είναι στατιστικά σημαντική για όλες τις συγκεντρώσεις και ώρες επώασης με τον BX-912. Η διαφοροποίηση αυτή υποδηλώνει ότι ο αναστολέας δεν επάγει εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο, **αλλά δρα κυρίως μέσω της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού οδηγώντας ουσιαστικά σε κυτταρόσταση.**

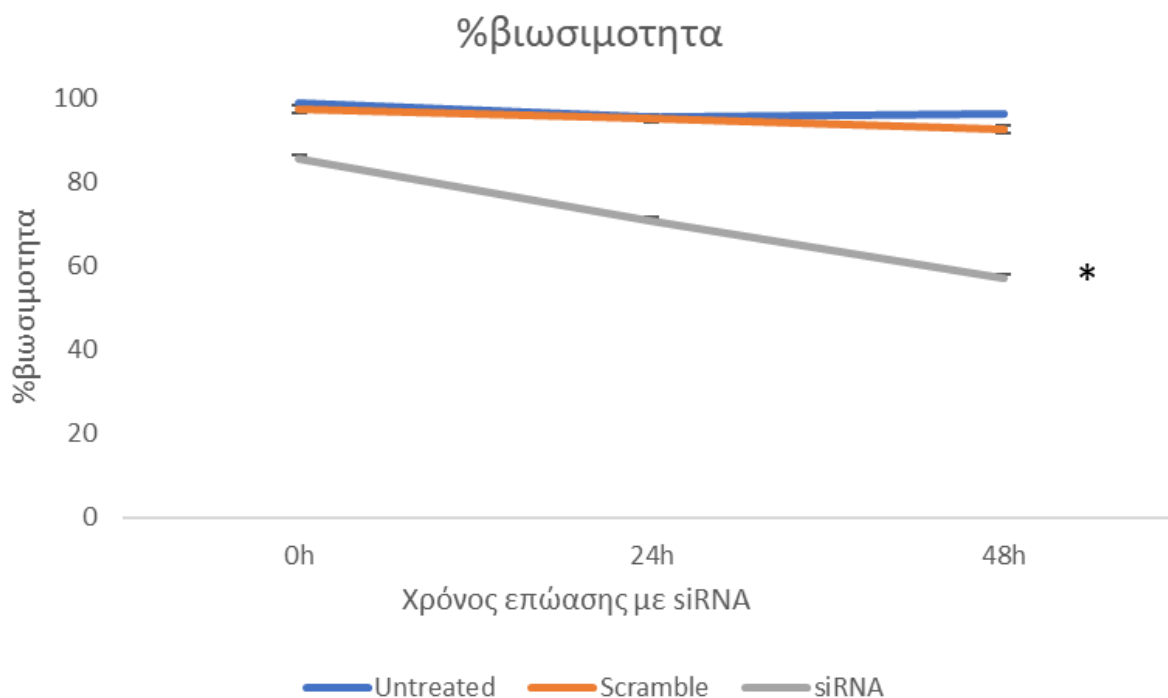
Σε δεύτερη φάση θέλαμε να συγκρίνουμε την αποτελεσματικότητα της δράσης του αναστολέα BX-912 σε σχέση με την πλήρη αποσιώπηση της PDK1 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, γεγονός που περιμέναμε να δώσει μία πιο αποσαφηνισμένη εικόνα σχετικά με την εκλεκτικότητά του ως προς την PDK1. Προς ολοκλήρωση του σκοπού αυτού, πραγματοποιήθηκε σίγηση της PDK1 σε κύτταρα MDA-MB-231 με χρήση ειδικού siRNA και λιποαφεκταμίνης.

3.4.2 Αποτελέσματα βιωσιμότητας έπειτα από αποσιώπηση της PDK1 με siRNA

Σε αυτή την φάση επιχειρήθηκε να γίνει σίγηση της PDK1 στα MDA-MB-231 προκειμένου να γίνει σύγκριση της δράσης του αναστολέα σε σχέση με την μετα-μεταγραφική αποσιώπηση, και να δοθεί μία πιο ξεκάθαρη εικόνα σχετικά με την εκλεκτικότητα του BX-912. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων:

1. **Κατηγορία 1^η:** Κύτταρα που υπέστησαν αποσιώπηση με ειδικό για την PDK1 siRNA (siRNA).
2. **Κατηγορία 2^η:** Κύτταρα που υπέστησαν την ίδια επεξεργασία με τα κύτταρα της κατηγορίας 1, με την διαφορά ότι το siRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν μη ειδικό και μη στοχευόμενο (scrambled).
3. **Κατηγορία 3^η:** Κύτταρα που δεν υπέστησαν καμία επεξεργασία (untreated).

Και στην περίπτωση αυτή, υπήρχαν τρία timepoints των 0, 24 και 48 ωρών.



Γράφημα 6: Βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231 μετά από αποσιώπηση της PDK1 με siRNA. $p\text{-value} < 0,05$ siRNA 0h/24h/48h VS UNT και NC 0h/24h/48h. Τα σημεία δείχνουν τον μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ήδη για το timepoint των 0 ωρών είναι εμφανές πως η βιωσιμότητα είναι μειωμένη ειδικά στα siRNA κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα η βιωσιμότητα:

- Για τα untreated κύτταρα προσεγγίζει το ποσοστό 99%
- Για τα κύτταρα scrambled προσεγγίζει το ποσοστό 97%
- Για τα κύτταρα siRNA προσεγγίζει το ποσοστό 85%

Έπειτα, παρατηρούμε για το χρονικό σημείο των 24 ωρών:

- Τα untreated κύτταρα έχουν βιωσιμότητα ποσοστού 95%
- Για τα κύτταρα scrambled η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 95%
- Για τα κύτταρα siRNA η βιωσιμότητα προσεγγίζει το ποσοστό 70%

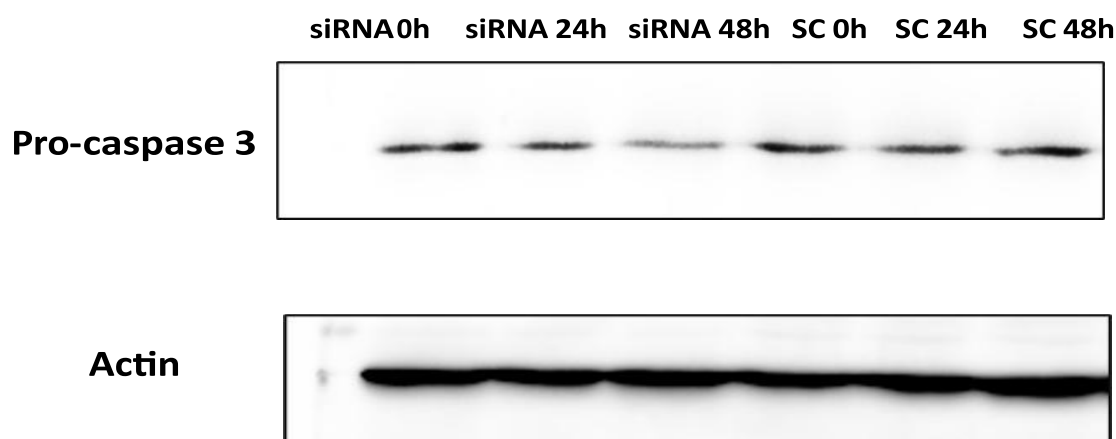
Παρομοίως, για το χρονικό σημείο των 48 ωρών παρατηρείται:

- Τα untreated κύτταρα έχουν βιωσιμότητα ποσοστού 96%
- Για τα κύτταρα scrambled προσεγγίζει το ποσοστό 92,5%
- Για τα κύτταρα siRNA προσεγγίζει το ποσοστό 57%

Καταληκτικά, ήδη από την ώρα 0 τα κύτταρα που επωάστηκαν με siRNA ειδικό για την PDK1 παρουσιάζουν μειωμένη βιωσιμότητα (85%), ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται ακόμα περισσότερο ως τις 24 και 48 ώρες (70% και 57% αντίστοιχα), με τη μείωση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου ($p < 0,05$). Παράλληλα τα untreated κύτταρα, όπως και τα κύτταρα που επωάστηκαν με scrambled siRNA, διατηρούν την βιωσιμότητά τους σχεδόν αμετάβλητη σε όλες τις χρονικές στιγμές.

3.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο κυτταρικού θανάτου στα αποσιωπημένα κύτταρα για την PDK1 MDA-MB-231.

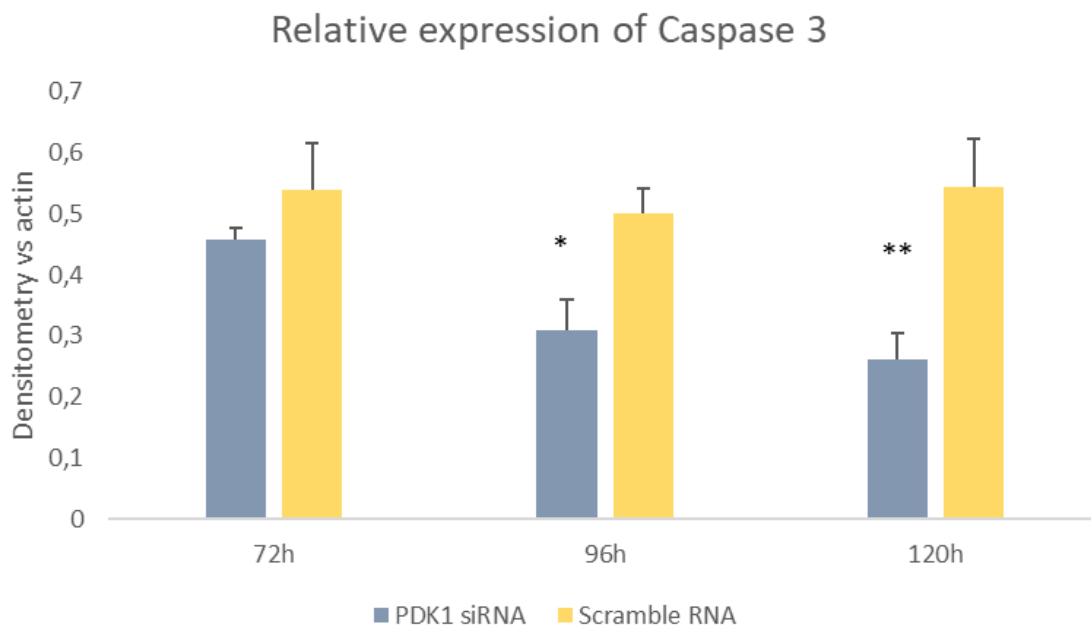
Με βάση τα αποτελέσματα βιωσιμότητας των κυττάρων στα οποία έγινε σίγηση της PDK1 και με βάση τον αυξημένο θάνατο που παρατηρήθηκε κατά τη διαδικασία, θέλαμε να εξετάσουμε την έκφραση της κασπάσης 3, μιας προκασπάσης που συνδέεται με την εκκίνηση της απόπτωσης, η οποία όταν συμβεί έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της, αφού αυτή πρωτεολύεται. Τέλος εξετάζεται η έκφραση και της ακτίνης β , μίας πρωτεΐνης προερχόμενης από ιδιοσυστάτα ενεργό γονίδιο που βοηθά στην ποσοτικοποίηση των υπόλοιπων πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα της Western Blot φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 21: Επίπεδα έκφρασης των Caspase 3 και ακτίνης σε κύτταρα που επωάστηκαν για 24 και 48 ώρες μετά την αναστολή της PDK1 με siRNA.

Στην πιο πάνω εικόνα φαίνεται ότι τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3 μειώνονται αισθητά στα κύτταρα ήδη από τις 24 ώρες σίγησης της PDK1 ($p\text{-value} < 0,05$) με μέγιστη μείωση στις 48 ώρες ($p\text{-value} < 0,005$) σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (Scrambled siRNA/SC). Η ελάττωση αυτή είναι κάτι το οποίο υποδηλώνει εν μέρει ότι η αποσιώπηση της PDK1 οδηγεί τα κύτταρα τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού σε αποπτωτικό θάνατο.

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα διαγράμματα στα οποία απεικονίζεται η πυκνότητα των επιπέδων έκφρασης της Κασπάσης 3 σε σχέση με την έκφραση της ακτίνης. Η μέτρηση της πυκνότητας έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Image J και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο λόγος της πυκνότητας της πρωτεΐνης ως προς την πυκνότητα της ακτίνης.



*Γράφημα 7: : Ραβδόγραμμα πυκνομετρίας των επιπέδων έκφρασης της pro-caspase 3 μετά από διόρθωση έναντι της ακτίνης. Μέσοι όροι δυο ανεξάρτητων πειραμάτων. * p -value<0,05 ** p -value<0,005 vs Scrambled RNA.*

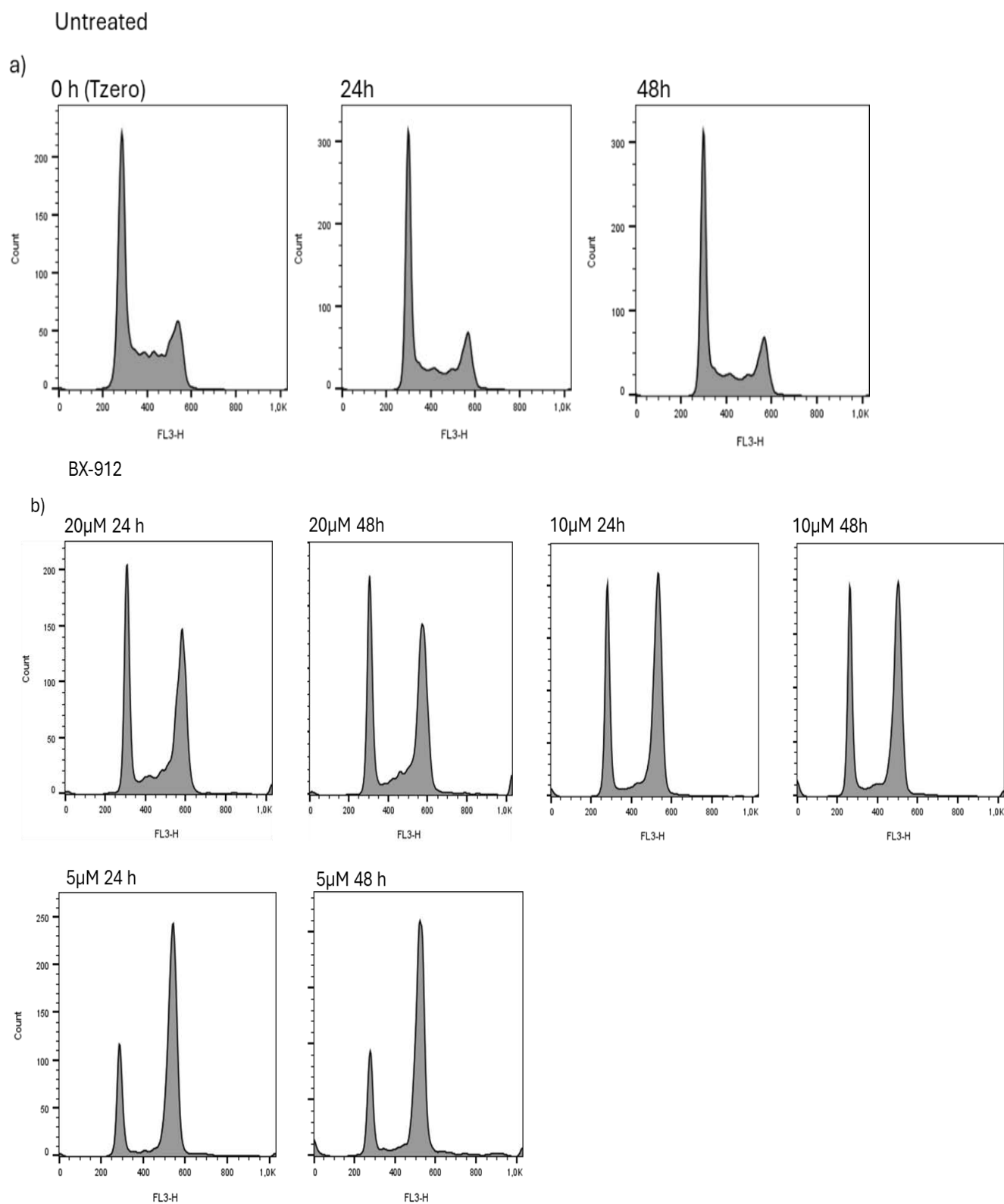
3.6 Αποτελέσματα Κυτταρομετρίας Ροής

Η ανάλυση ασύγχρονων κυττάρων τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 μέσω της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της αναστολής της PDK1, τόσο φαρμακολογικά όσο και μετα-μεταγραφικά, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων αυτών.

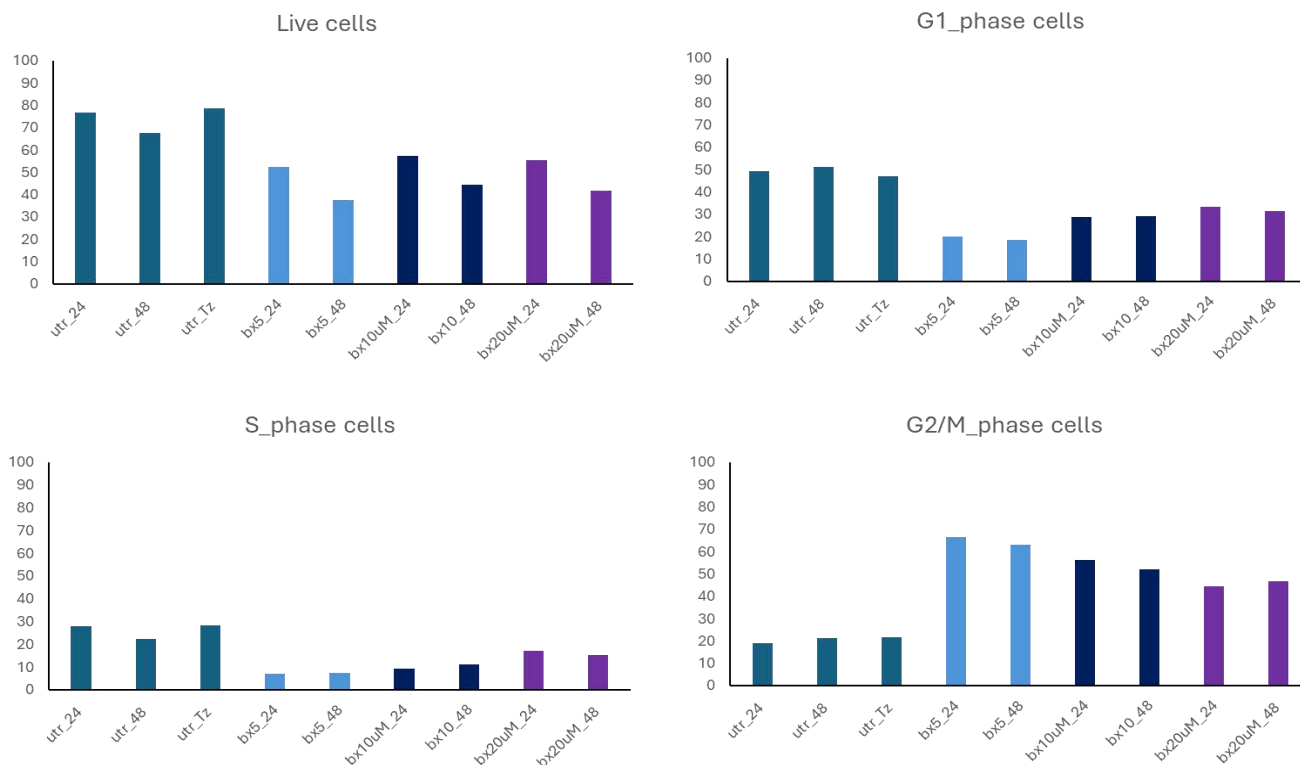
Στα ακόλουθα πειράματα εφαρμόστηκαν δύο συνθήκες: 1) κύτταρα MDA-MB-231 που επώαστηκαν με αναστολέα ως τις χρονικές στιγμές 0, 24 και 48 ωρών και 2) κύτταρα MDAMB-231 που υπέστησαν μετα-μεταγραφική αποσιώπηση της PDK1 με siRNA ως και τις χρονικές στιγμές 0, 24 και 48 ώρες επίσης.

Όλα τα παρακάτω αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά και αποτελούν επαναλήψεις δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων πειραμάτων.

3.6.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής μετά από χορήγηση αναστολέα



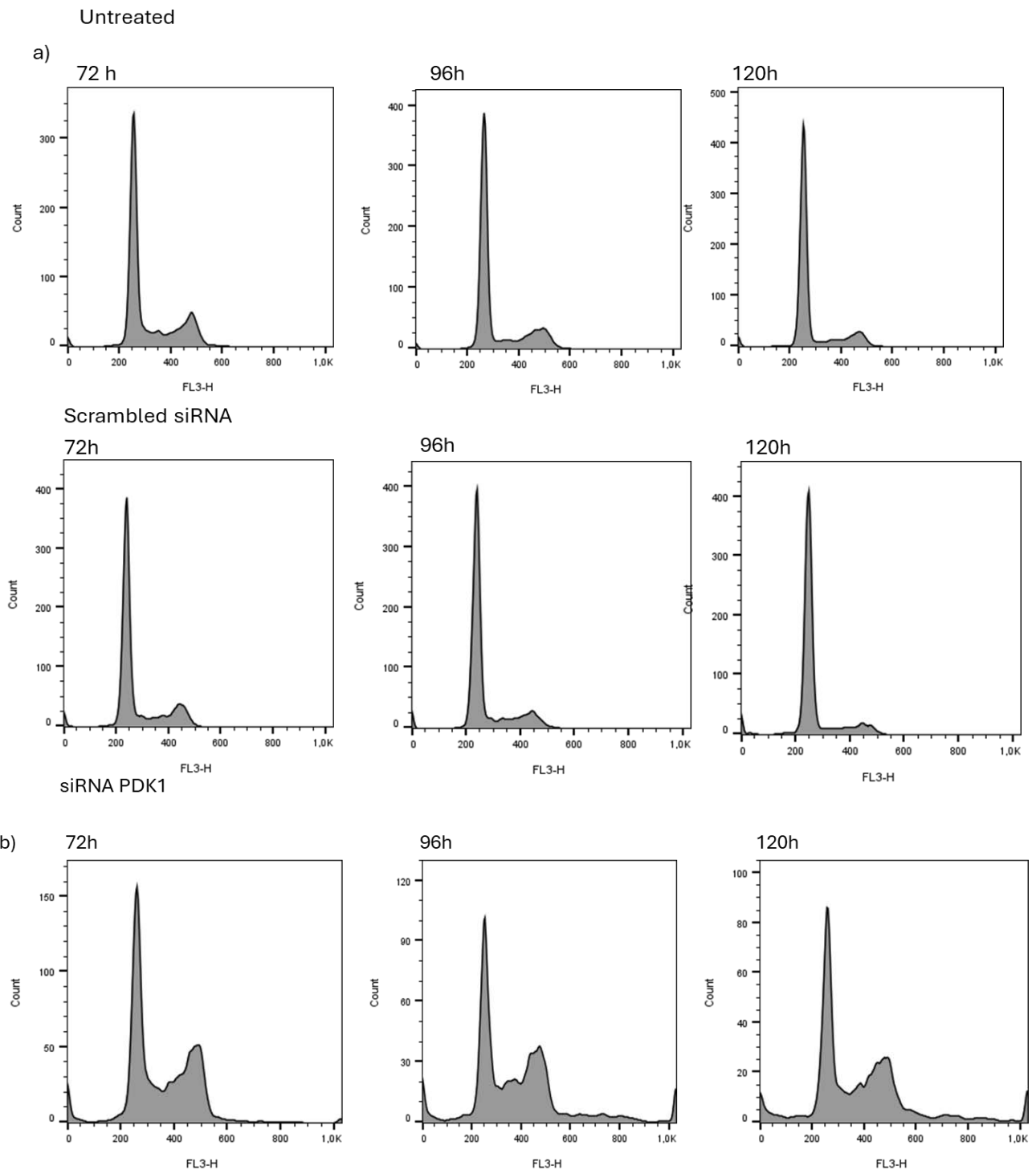
Γράφημα 8: : Απεικόνιση ιστογραμμάτων που προέκυψαν από ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής με το πρόγραμμα FlowJo vs 10 σε κύτταρα MDA-MB-231 απουσία και παρουσία του BX-912 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (20/10/5μM) και χρονικά διαστήματα (24 & 48 ώρες).



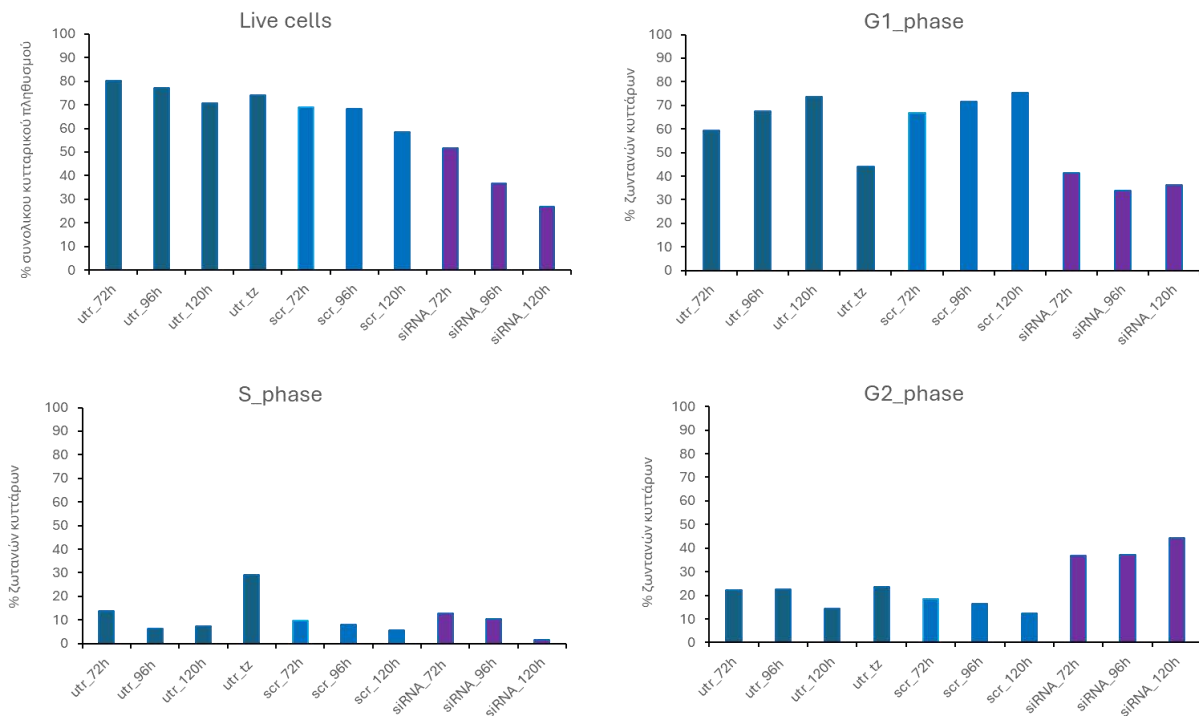
Γράφημα 9: Ραβδόγραμμα που δείχνει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων καθώς και την κατανομή τους στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, S και G2/M) υπό τις διάφορες πειραματικές συνθήκες.

Στην εικόνα αναπαρίστανται τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής στα ασύγχρονα κύτταρα ελέγχου (untreated) (α) MDA-MB-231 καθώς και σε κύτταρα που έχουν επωασθεί με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα της PDK1 BX-912 (20/10/5μM/ (β) για 24 και 48 ώρες. Η ανάλυση υποδεικνύει ότι ο BX-912 οδηγεί σε G2/M arrest σε όλες τις συγκεντρώσεις (5, 10 και 20 μM), συγκριτικά με τα δείγματα που δεν έλαβαν καμία θεραπεία (Untreated T0, 24h, 48h), τα οποία παρουσίασαν φυσιολογική κατανομή στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η συσσώρευση στη G2/M φάση που προκαλεί ο αναστολέας φαίνεται να είναι περισσότερο χρονοεξαρτώμενη καθώς το φαινόμενο παρατηρείται σε όλες τις συγκεντρώσεις αλλά είναι ακόμα πιο έντονο μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα. Επιπλέον, σε όλες τις συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκε ο BX-912 παρατηρήθηκε μείωση των ζωντανών κυττάρων η οποία είναι περισσότερο εμφανής μετά από 48 ώρες επώασης, υποδηλώνοντας και εδώ χρονοεξαρτώμενο τρόπο δράσης του μορίου.

3.6.2 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής μετά από αποσιώπηση της PDK1 με siRNA



Γράφημα 10: Ιστογράμματα κατανομής του κυτταρικού κύκλου μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με το πρόγραμμα Flowjo 10.0 σε κύτταρα MDA-MB-231 χωρίς καμία κατεργασία (Untreated), με Scrambled siRNA (Scrambled) και με siRNA για την PDK1 σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (72/96/120h).



Γράφημα 11: Ραβδόγραμμα που δείχνει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων καθώς και την κατανομή τους στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G0/G1, S και G2/M) υπό τις διάφορες πειραματικές συνθήκες.

Στο γράφημα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής (a) στα κύτταρα MDA-MB231 που δεν έχουν υποστεί καμία κατεργασία (untreated/ utr), σε κύτταρα που έχουν κατεργαστεί με τη μη ειδική scrambled RNA αλληλουχία (Scrambled/ scr) καθώς και στα κύτταρα τα οποία έχουν επιμολυνθεί με το ειδικό για την PDK1 siRNA (b) για 72, 96 και 120 ώρες επώασης από την στιγμή που προστέθηκε το siRNA.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα και στα αντίστοιχα ραβδογράμματα τόσο ο πληθυσμός μάρτυρας όσο και ο πληθυσμός που έχει υποστεί κατεργασία με το scrambled RNA παρουσιάζουν σταθερή κατανομή στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε όλα τα χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Αντίθετα, στα κύτταρα που έχουν υποστεί αποσιώπηση της PDK1 παρατηρούμε συσσώρευση των κυττάρων στην φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου η οποία παρατηρείται ήδη από τις 72 ώρες επώασης με το ειδικό siRNA, αυξάνεται ακόμα περισσότερο μετά από 24 ώρες (96 ώρες επώασης με το siRNA) και φτάνει στα μέγιστα της μετά από 48 ώρες (120 ώρες επώασης με το siRNA). Συμπερασματικά, η σίγηση της PDK1 στα κύτταρα προκαλεί G2/M στάση με χρονοεξαρτώμενο τρόπο, καθώς το φαινόμενο αυξάνεται με το πέρας του χρόνου. Επιπλέον, παρατηρούμε χρονοεξαρτώμενη μείωση του αριθμού ζωντανών κυττάρων, με τη μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται στις 120 ώρες αποσιώπησης της PDK1.

4. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Ο καρκίνος του μαστού και ειδικά ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού, αποτελεί έναν εξαιρετικά επιθετικό τύπο καρκίνου, για τον οποίο δεν υπάρχει ακόμα στενευμένη και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση [21]. Είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου στις γυναίκες με τα νέα περιστατικά να ανέρχονται τα 2.26 εκατομμύρια για το 2020, ενώ τα τελευταία 30 χρόνια η συχνότητα εμφάνισής του έχει διπλασιαστεί πιθανώς λόγω των Δυτικών προτύπων ζωής [12,13]. Αν και απαντάται πιο συχνά εκβιομηχανισμένες χώρες, η θνησιμότητά του είναι υψηλότερη σε αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η πρόληψη, η έγκαιρη διάγνωση αλλά και ειδικά η θεραπεία είναι περιορισμένες [13]. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν τόσο την σοβαρότητα της συγκεκριμένης ασθένειας, όσο και τον καθοριστικό ρόλο που μπορεί να ενέχει η άμεση διάγνωση, αλλά και η κατάλληλη θεραπεία.

Σκοπός, της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν η μελέτη της επίδρασης της αναστολής της PDK1 στην αύξηση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231. Η εν λόγω κινάση συμμετέχει σε βασικά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο, όπως το PI3K/Akt/mTOR και Ras/MAPK/MEK κ.α., καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία αποτελεί ένα κομβικό μόριο ελέγχου της ενδοκυττάριας σηματοδότησης [25, 29]. Η απορρύθμιση της PDK1 φαίνεται να συνδέεται ισχυρά με την ογκογένεση, την εξέλιξη των όγκων αλλά και την ανθεκτικότητα σε θεραπείες σε αρκετούς τύπους καρκίνου και ειδικά στον καρκίνο του μαστού [23]. Για τον σκοπό αυτό και με βάση μη δημοσιευμένα προκαταρκτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας που αναδυνάμουν το σημαντικό ρόλο της PDK1 στην ανάπτυξη παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων, τα πειράματα της παρούσας εργασίας εστίασαν στην αναστολή της PDK1 τόσο φαρμακολογικά όσο και μετα-μεταγραφικά.

Έτσι, αρχικό βήμα ήταν, η επιλογή του πιο δραστικού αναστολέα της PDK1, μεταξύ των BX912, BX-517, PDK1-IN-RS2 και GSK2334470 μέσω αξιολόγησης της *in vitro* κυτταροτοξικότητας των μορίων (SRB assay) έναντι στην κυτταρική σειρά τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού MDA-MB-231. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν πως ο δραστικότερος αναστολέας στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν είναι ο BX-912, ο οποίος φάνηκε να επιδρά στον ρυθμό αύξησης των κυττάρων πιο αποτελεσματικά από τους υπόλοιπους αναστολείς, μειώνοντας αισθητά την ανάπτυξη τους ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις που απείχαν αρκετά από το όριο τοξικότητας. Τα δεδομένα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με την υπάρχουσα αλλά περιορισμένη βιβλιογραφία, όπου πειραματικές μελέτες κατέδειξαν ότι ο BX-912 αναστέλλει ισχυρά την αύξηση κυττάρων τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού MDA-468. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτή τη μελέτη σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού HMEC η ανασταλτική επίδραση του BX-912 στην αύξηση ήταν πολύ περιορισμένη, δείχνοντας μια προτίμηση προς τις καρκινικές σειρές έναντι των φυσιολογικών. Επίσης ο BX-912 φάνηκε να αναστέλλει σε ποσοστό 96% την αύξηση της κυτταρικής σειράς καρκίνου του παχέος εντέρου HCT-116 όταν αυτά καλλιεργούνται σε soft agar, ήδη από την συγκέντρωση του 1 μ M [35].

Στην δοκιμασία ελέγχου επούλωσης πληγών στα MDA-MB-231 παρατηρήθηκε ισχυρή χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη αναστολή της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων με την χορήγηση του BX-912. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, όπου στην μελέτη των Simon et al. μετά από επαγωγή της μεταναστευτικής ικανότητας κυττάρων MDA-MB-231 και B15-F10 (κύτταρα μελανώματος επίμυος) μέσω υπερέκφρασης της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης καβεολίνης 1 που θεωρείται πως δρα μέσω της Src κινάσης ενεργοποιώντας την PDK1, η χορήγηση του BX-912 κατάφερε να

αναστείλει αποτελεσματικά την μετανάστευση των κυττάρων [66]. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν επίσης με άλλες μελέτες που συνδέουν την PDK1 με την πρόοδο των όγκων και την μετάσταση [23].

Έπειτα πραγματοποιήθηκε σίγηση της PDK1 μετα-μεταγραφικά. Μετά από τις 72 ώρες της σίγησης παρατηρήθηκε έντονος κυτταρικός θάνατος, κάτι το οποίο δεν είχε παρατηρηθεί σε αντίστοιχα πειράματα αποσιώπησης της κινάσης στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα PANC1, στα πλαίσια προηγούμενων πειραμάτων του εργαστηρίου Φαρμακολογίας. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι πιθανότατα η PDK1 διαδραματίζει διαφορετικό και κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση των τριπλά αρνητικών κυττάρων καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου.

Έπειτα μελετήθηκε η επίδραση στη βιωσιμότητα των MDA-MB-321, του αναστολέα BX-912. Εδώ παρατηρήθηκε πως η προσθήκη του δεν επηρέασε σημαντικά την βιωσιμότητα. Τα ευρήματά αυτά δεν συμφωνούν ωστόσο απόλυτα με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπου έχει παρατηρηθεί πως σε καρκινικά κύτταρα μαστού MD-468 με χορήγηση BX-912 τα περισσότερα κύτταρα ήταν νεκρά ως τις 72 ώρες επώασης [35]. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία δεν εξετάστηκαν χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα, πέρα των 48 ωρών..

Όσον αφορά την μετα-μεταγραφική αποσιώπηση της PDK1 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με την φαρμακολογική αναστολή της κινάσης. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με παρόμοια πειράματα αποσιώπησης της PDK1 με siRNA σε επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος των ωοθηκών SK-OV-3, όπου με την σίγηση της κινάσης μειώθηκε αισθητά ο πολλαπλασιασμός και η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων μετά από επαγωγή του πολλαπλασιασμού τους με οιστρογόνα [68]. Ωστόσο, στην συγκεκριμένη διπλωματική δεν ελέγχθηκε η επίδραση της αποσιώπησης της PDK1 στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν υπό τις πειραματικές συνθήκες σίγησης που χρησιμοποιήσαμε. Επιπρόσθετα αξίζει να αναφερθεί πως παρόμοιες μελέτες αποσιώπησης πραγματοποιήθηκαν και για κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη (PCa, DU-145) και λεμφώματος (Z-138, JeKo-1, JVM-2, Mino) με παρόμοια αποτελέσματα [69].

Αν αντιπαραθέσουμε την φαρμακολογική με την μετα-μεταγραφική αναστολή, είναι εμφανές ότι η δεύτερη έχει πιο ισχυρή επίδραση στην βιωσιμότητα, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός πως με την αποσιώπηση αναστέλλεται σχεδόν πλήρως η παραγωγή της πρωτεΐνης, ενώ με την φαρμακολογική αναστολή απλά αποτρέπει η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της και σε μεγάλο βαθμό πιθανώς και η αυτοφωσφορυλίωση της ίδιας της κινάσης, καθώς όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγική ενότητα (1.4.1.3), πρόκειται για μία ιδιόσυστα ενεργή κινάση που ενεργοποιείται μέσω trans αυτοφωσφορυλίωσής της. Ωστόσο, στην περίπτωση της φαρμακολογικής αναστολής θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η δράση άλλων κινασών στην ενεργοποίηση της PDK1, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητα του αναστολέα.

Σε επόμενο βήμα και βασιζόμενοι στα προηγούμενα ευρήματα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου επαγωγής του κυτταρικού θανάτου στα αποσιωπημένα για την PDK1 κύτταρα MDAMB-231. Η έντονη ελάττωση της προ-κασπάσης 3 ήδη από τις 24 ώρες σίγησης, με ακόμα μεγαλύτερη μείωση στις 48 ώρες, είναι μία αρχική ένδειξη ότι τα MDA-MB-231 απουσία της PDK1 οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο. Τα δεδομένα αυτά είναι σύμφωνα με την βιβλιογραφία, όπου σε μελέτη των Feldman et al. παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση του BX912 σε κύτταρα καρκίνου μαστού MDA-468, δωδεκαπλάσια μείωση των επιπέδων των

κασπασών 3/7 μετά από επώαση 48 ωρών και υψηλά ποσοστά θανάτου ως και τις 72 ώρες κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού και προστάτη [35]. Παράλληλα σε μελέτη των Maegawa et al. σε σειρές καρκίνου λεμφώματος (JeKo-1 και Z-138) μετά από χορήγηση BX-912 παρατηρήθηκε G2/M arrest καταδεικνύοντας πιθανή επαγωγή της απόπτωσης τόσο με δοσοεξαρτώμενο όσο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με χρώση αννεξίνης και PI (ιωδιούχο προπύδιο) [69]. Συνεπώς, η αναστολή της PDK-1 είτε φαρμακολογικά είτε μετα-μεταγραφικά φαίνεται να σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης κάτι που μένει να επιβεβαιωθεί περαιτέρω και για τα MDA-MB-231.

Τέλος, όσον αφορά την επίδραση της PDK1 στον κυτταρικό κύκλο η οποία μελετήθηκε με κυτταρομετρίας ροής, μελετήθηκαν επίσης οι ίδιες πειραματικές συνθήκες με αυτές που μελετήθηκαν και στην βιωσιμότητα. Και στις δυο περιπτώσεις αναστολής της PDK1 παρατηρήθηκε G2/M στάση του κυτταρικού κύκλου των MDA-MB-231, σε αντίθεση με τα κύτταρα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και σημαντική μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων με τρόπο χρονοεξαρτώμενο. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνονται στην μελέτη των Feldman et al. στην σειρά τριπλά αρνητικού καρκίνου MDA-468 όπου παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση των κυττάρων που περιείχαν ποσότητα DNA 4n, υποδεικνύοντας G2/M στάση του κυτταρικού τους κύκλου μετά από προσθήκη του BX-912 [35]. Συνεπώς, η αναστολή της PDK1 δρα πιθανώς με κάποιον τρόπο είτε κατασταλτικά σε κάποιο στοιχείο που ωθεί την πρόοδο του κυτταρικού στην φάση G2/M ή ενισχυτικά σε κάποιο στοιχείο που ωθεί την καταστολή του.

Συμπερασματικά, η αναστολή της PDK1 είχε ως αποτέλεσμα την παύση της προόδου του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M, αναστέλλοντας έτσι την αύξηση των MDA-MB-231 χρονοεξαρτώμενα καθώς ειδικά στην περίπτωση του BX912 παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο σε όλες τις δόσεις που μελετήθηκαν. Παράλληλα, η πλήρης αποσιώπηση της PDK1 μέσω siRNA φαίνεται να επάγει την απόπτωση όπως φαίνεται από την μείωση των επιπέδων της προκασπάσης 3 και την σημαντικά μειωμένη βιωσιμότητα. Η μείωση της βιωσιμότητας στην περίπτωση της φαρμακολογικής αναστολής δεν ήταν τόσο δραματική ωστόσο δεν διερευνήθηκαν τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3 σε κανένα χρονικό σημείο και συγκέντρωση, κάτι που πιθανώς να μπορούσε να εξεταστεί μελλοντικά. Τέλος, η φαρμακολογική αναστολή της PDK1 αναστέλλει δραματικά την μεταναστευτική ικανότητα των MDA-MB-231, χωρίς όμως να είναι αποσαφηνισμένος ο ακριβής μηχανισμός.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας υποδεικνύουν, υπό τις πειραματικές συνθήκες που ελέγχθηκαν εδώ, έναν σημαντικό ρόλο της PDK1 στην αύξηση και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231, αντιπροσωπευτικών του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, την διεξαγωγή του κυτταρικού κύκλου αλλά και στην μεταναστευτική τους ικανότητα. Επομένως θα μπορούσαμε να πούμε ότι η εξειδικευμένη στόχευση της PDK1 με την ανάπτυξη π.χ. εκλεκτικών αναστολέων της, όπως ο BX-912 μπορεί να αποτελέσει ένα νέο εργαλείο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού αλλά πιθανότητα και άλλων τύπων καρκίνων.

Ωστόσο, απαιτείται πιο ενδελεχής μελέτη του ρόλου της κίνησης αυτής στην καρκινογένεση και στις διάφορες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, μελέτες αποσαφήνισης των μηχανισμών με τους οποίους ασκεί τη δράση του ο BX-912, αλλά και η ανάπτυξη νέων ειδικών αναστολέων της PDK1.

5. Βιβλιογραφία

1. Seyed Hossein Hassanpour, Mohammadamin Dehghani, Review of cancer from perspective of molecular, Journal of Cancer Research and Practice, Volume 4, Issue 4, 2017, Pages 127-129, ISSN 2311-3006, <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.
2. Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (Review). Mol Clin Oncol. 2021 Dec;15(6):271. doi: 10.3892/mco.2021.2433. Epub 2021 Nov 1. PMID: 34790355; PMCID: PMC8591689.
3. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. Indian J Cancer. 2016 JulSep;53(3):441-442. doi: 10.4103/0019-509X.200658. PMID: 28244479.
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.
5. Bazira, P. J., Ellis, H., & Mahadevan, V. (2021). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 40(2), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.015>
6. McGuire, K.P. (2016). Breast Anatomy and Physiology. In: Aydiner, A., İgci, A., Soran, A. (eds) Breast Disease. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22843-3_1
7. Tse, G., Tan, PH., Schmitt, F. (2023). Anatomy and Physiology of the Breast. In: Tse, G., Tan, PH., Schmitt, F. (eds) Fine Needle Aspiration Cytology of the Breast. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-26900-4_1
8. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. Clin Anat. 2013 Jan;26(1):29-48. doi: 10.1002/ca.22165. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22997014.
9. Πεκτασίδης, Δ. Γ. (2017). Γυναικολογική ογκολογία. Broken Hill.
10. Aydiner, Adnan & Igci, Abdullah & Soran, Atilla. (2019). Breast Disease Diagnosis and Pathology, Volume 1: Diagnosis and Pathology, Volume 1. 10.1007/978-3-030-04606-4.
11. Ellis, H., & Mahadevan, V. (2013). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 31(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2012.10.018>
12. Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287E1>
13. Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10), 2569. <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
14. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Arch Gynecol Obstet. 2016 Feb;293(2):247-69. doi: 10.1007/s00404-015-3859-y. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26341644.
15. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. Adv Anat Pathol. 2020 Jan;27(1):27-35. doi: 10.1097/PAP.0000000000000232. PMID: 31045583.
16. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer pm rognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. Breast Cancer Res. 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20804570; PMCID: PMC2949637.
17. Ahmed, Tamara & Hassan, Shaimaa & Abdalhadi, Saifaldeen. (2023). Advanced Journal of Chemistry-Section B Natural Products and Medical Chemistry Breast Cancer: Symptoms, Causes, and Treatment by Metal Complexes: A Review. 306-319. 10.48309/ajcb.2023.398122.1174.
18. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. J Nucl Med. 2016 Feb;57 Suppl 1:9S-16S. doi: 10.2967/jnumed.115.157834. PMID: 26834110.
19. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. Medicine (Baltimore). 2024 Jan 19;103(3):e36905. doi: 10.1097/MD.00000000000036905. PMID: 38241592; PMCID: PMC10798762.
20. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. Lancet. 2021 May 8;397(10286):1750-1769. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32381-3. Epub 2021 Apr 1. Erratum in:

- Lancet. 2021 May 8;397(10286):1710. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00838-2. PMID: 33812473.
21. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA. 2019 Jan 22;321(3):288300. doi: 10.1001/jama.2018.19323. PMID: 30667505.
 22. Wang N, Fu J, Li Z, Jiang N, Chen Y, Peng J. The Landscape of PDK1 in Breast Cancer. Cancers (Basel). 2022 Feb 5;14(3):811. doi: 10.3390/cancers14030811. PMID: 35159078; PMCID: PMC8834120.
 23. Gagliardi PA, Puliafito A, Primo L. PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. Semin Cancer Biol. 2018 Feb; 48:27-35. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.014. Epub 2017 May 1. PMID: 28473254.
 24. Biondi RM, Komander D, Thomas CC, Lizcano JM, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM. High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. EMBO J. 2002 Aug 15;21(16):4219-28. doi: 10.1093/emboj/cdf437. PMID: 12169624; PMCID: PMC126174.
 25. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. Int J Mol Sci. 2020 Dec 26;22(1):173. doi: 10.3390/ijms22010173. PMID: 33375317; PMCID: PMC7796017.
 26. Yu L, Wei J, Liu P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer. Semin Cancer Biol. 2022 Oct; 85:69-94. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.06.019. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34175443.
 27. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, Eng H, Nair MG, Makvandi P, Geoerger B, Kulke MH, Baird RD, Prabhu JS, Carbone D, Pecoraro C, Teh DBL, Sethi G, Cavalieri V, Lin KH, Javidi-Sharifi NR, Toska E, Davids MS, Brown JR, Diana P, Stebbing J, Fruman DA, Kumar AP. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. Mol Cancer. 2023 Aug 18;22(1):138. doi: 10.1186/s12943-023-01827-6. PMID: 37596643; PMCID: PMC10436543.
 28. Bahar ME, Kim HJ, Kim DR. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. Signal Transduct Target Ther. 2023 Dec 18;8(1):455. doi: 10.1038/s41392-023-01705-z. PMID: 38105263; PMCID: PMC10725898.
 29. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin Ther Targets. 2012 Jan;16(1):103-19. doi: 10.1517/14728222.2011.645805. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22239440; PMCID: PMC3457779.
 30. Koutsogianni F, Alexopoulou D, Uvez A, Lamprianidou A, Sereti E, Tsimplouli C, Ilkay Armutak E, Dimas K. P90 ribosomal S6 kinases: A bona fide target for novel targeted anticancer therapies? Biochem Pharmacol. 2023 Apr; 210:115488. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115488. Epub 2023 Mar 7. PMID: 36889445.
 31. Raimondi C, Falasca M. Targeting PDK1 in cancer. Curr Med Chem. 2011;18(18):2763-2769. doi:10.2174/092986711796011238
 32. Medina JR. Selective 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) inhibitors: dissecting the function and pharmacology of PDK1. J Med Chem. 2013;56(7):2726-2737. doi:10.1021/jm4000227
 33. Zhang S, Suvannasankha A, Crean CD, et al. OSU-03012, a novel celecoxib derivative, is cytotoxic to myeloma cells and acts through multiple mechanisms. Clin Cancer Res. 2007;13(16):4750-4758. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0136
 34. Tan YH, Lee KH, Lin T, et al. Cytotoxicity and proteomics analyses of OSU03013 in lung cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(6):1823-1830. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1806
 35. Feldman RI, Wu JM, Polokoff MA, et al. Novel small molecule inhibitors of 3phosphoinositide-dependent kinase-1. J Biol Chem. 2005;280(20):19867-19874. doi:10.1074/jbc.M501367200
 36. Peifer C, Alessi DR. Small-molecule inhibitors of PDK1. ChemMedChem. 2008;3(12):18101838. doi:10.1002/cmdc.200800195
 37. Rettenmaier TJ, Sadowsky JD, Thomsen ND, et al. A small-molecule mimic of a peptide docking motif inhibits the protein kinase PDK1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(52):1859018595. doi:10.1073/pnas.1415365112

38. Meuillet EJ, Zuohe S, Lemos R, et al. Molecular pharmacology and antitumor activity of PHT427, a novel Akt/phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1 pleckstrin homology domain inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(3):706-717. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0985
39. ApeXBio-BX-912 <https://www.apexbt.com/bx-912.html>
40. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974 Sep;53(3):661-74. doi: 10.1093/jnci/53.3.661. PMID: 4412247; PMCID: PMC7364228.
41. MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC. (n.d.). <https://www.atcc.org/products/htb-26#detailedproduct-information>
42. DepMap: The Cancer Dependency Map Project at Broad Institute. (n.d.). https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000768?tab=overview
43. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cellculture/cell-culture-media/rpmi.html?ef_id=CjwKCAjw3oqoBhAjEiwA_UaLtbZtSYErrlNCLKSs623ldS3bJpTbabrluyw59UtOXvjt2mp3zL9RoC7aAQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!596250123588!e!!g!!rpmi%25201640%2520formulation!1759362858!66460961501&cid=bid_cl_b_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_ose_gaw_nt_pur_con&gclid=CjwKCAjw3oqoBhAjEiwA_UaLtbZtSYErrlNCLKSs62-3ldS3bJpTbabrluyw59UtOXvjt2mp3zL9RoC7aAQAvD_BwE
44. Gstraunthaler, G., Lindl, T., & Van Der Valk, J. (2013, August 22). *A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media*. Cytotechnology; Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8>
45. Ryu, A. H., Eckalbar, W. L., Kreimer, A., Yosef, N., & Ahituv, N. (2017, August 8). *Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation*. Scientific Reports; Nature Portfolio. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07757-w>
46. L-Glutamine and GlutaMAX Supplement | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cellculture/media-supplements/glutamaxmedia.html#:~:text=L%2Dglutamine%20is%20an%20important,when%20cells%20are%20rapidly%20dividing.>
47. Cell Dissociation and Trypsin for Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cellculture/reagents/celldissociation.html#:~:text=Trypsin%2C%20a%20proteolytic%20enzyme%2C%20is,easy%20r esuspension%20during%20cell%20harvesting.>
48. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 2004 Jun;33(2):95-103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023. PMID: 15121163.
49. Rashid MU, Coombs KM. Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2019 Jun;234(6):7718-7724. doi:10.1002/jcp.27890. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30515823; PMCID: PMC6519280
50. Alberts, B. (2002). *An Overview of the Cell Cycle*. Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
51. McKinnon, K. (2018, January 1). *Flow Cytometry: An Overview*. Current Protocols in Immunology; Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
52. Propidium Iodide Ready Flow™ Reagent. (n.d.). https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37169?ef_id=CjwKCAjwgZCoBhBnEiwAz35RwtXjaUm_odyqkKpaJx68nN68l6_34M3ER4bjlA6QKZWwXX081AXWsxoCmjoQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!603662664166!e!!g!!propidium%20iodide%20staining!924717350!75094258071&cid=bid_pca_frg_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_ose_gaw_nt_pur_con&gclid=CjwKCAjwgZCoBhBnEiwAz35RwtXjaUm_odyqkKpaJx68nN68l6_34M3ER4bjlA6QKZWwXX081AXWsxoCmjoQAvD_BwE#/R37169

53. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep;4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998. PMID: 23050259; PMCID: PMC3456489.
54. Kielkopf, C. L., Bauer, W. R., & Urbatsch, I. L. (2020, April 1). *Bradford Assay for Determining Protein Concentration*. CSH Protocols; Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
55. Chemiluminescent Western Blotting | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescentwesternblotting.html#:~:text=Chemiluminescent%20reaction%20of%20HRP%20substrate%2D%20lu minol.&text=The%20oxidation%20of%20luminol%20by,by%20releasing%20photons%20of%20light.>
56. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329-33. doi: 10.1038/nprot.2007.30. PMID: 17406593.
57. Exposure in utero to diethylstilbestrol and related synthetic hormones. Association with vaginal and cervical cancers and other abnormalities. *JAMA*. 1976 Sep 6;236(10):1107-9. doi: 10.1001/jama.1976.03270110011002. PMID: 988858.
58. Kerr AJ, Dodwell D, McGale P, et al. Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality. *Cancer Treat Rev*. 2022; 105:102375. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102375
59. Xu W, Jiang X, Huang L. RNA Interference Technology. *Comprehensive Biotechnology*. 2019:560–75. doi: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2. Epub 2019 Jul 31. PMCID: PMC7152241.
60. Saurabh S, Vidyarthi AS, Prasad D. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*. 2014 Mar;239(3):543-64. doi: 10.1007/s00425-013-2019-5. Epub 2014 Jan 9. PMID: 24402564.
61. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11. doi: 10.1038/35888. PMID: 9486653.
62. de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jun;6(6):443-53. doi: 10.1038/nrd2310. PMID: 17541417; PMCID: PMC7098199.
63. Sakorafas, G. H., Blanchard, K., Sarr, M. G., & Farley, D. R. (2001). Paget's disease of the breast. *TUMOUR REVIEW*, 27(1).
64. <https://www.cancer.gov/>
65. <https://www.breastcancer.org/>
66. Layla Simón, Keila Torres, Pamela Contreras, Natalia Díaz-Valdivia, Lisette Leyton, Andrew F.G. Quest, Inhibition of glycolysis and Src/Akt signaling reduces Caveolin-1-enhanced metastasis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 176, 2024, 116841, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116841>.
67. <https://www.rockland.com/resources/western-blotting-technique/>
68. Yajie Wang, Huanchao Chang, Xiuwen Li, Hairong Zhang, Qianqian Zhou, Shengjian Tang, Di Wang, Estrogen regulates PDPK1 to promote cell proliferation in epithelial ovarian cancer, *Heliyon*, Volume 10, Issue 22, 2024, e40296, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40296>.
69. Maegawa S, Chinen Y, Shimura Y, et al. Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 is a potential novel therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol*. 2018;59:72-81.e2. doi:10.1016/j.exphem.2017.12.006