

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*“Μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων σε κύτταρα μελανώματος
μέσω μικρογαλακτωμάτων”*

*“Delivery of bioactive compounds in melanoma cells through
microemulsions”*

ΒΡΕΤΤΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ

2016

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Εργαστήριο Χημικής Καρκινογένεσης και Γενετικής Τοξικολογίας και στο Εργαστήριο Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας.

Η χρηματοδότηση καλύφθηκε από το ερευνητικό πρόγραμμα ΕΠΑΝΙΙ, Δράση <<Αναπτυξιακές προτάσεις ερευνητικών φορέων - ΚΡΗΠΙΣ >>: Στοχευμένες Θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά εκφυλιστικών ΝΟσημάτων, με έμφαση τον καρκίνο και τη γήρανση - ΣΘΕΝΟΣ.

Χρονική διάρκεια εκπόνησης διπλωματικής εργασίας:
Σεπτέμβριος 2015 - Μάρτιος 2016

Τριμελής επιτροπή

Πλέτσα Βασιλική, Εντεταλμένη Ερευνήτρια ΙΒΦΧΒ_ΕΙΕ - **Επιβλέπουσα**

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος καθηγήτρια

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά για τις γνώσεις που μου προσέφερε αλλά κυρίως για την ενθάρρυνση και την στήριξή της καθ' όλη την διάρκεια της φοίτησής μου στη σχολή. Πραγματικά πιστεύω ότι το μόνο που χρειάζεσαι για να βαδίζεις σταθερά προς τους στόχους σου είναι μέντορες να σε εμπνέουν, τίμια ψυχή και εργατικότητα.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Βασιλική Πλέτσα για την επίβλεψη και την πολύτιμη καθοδήγησή της. Ευχαριστώ την Δρ. Βασιλική Παπαδημητρίου για την καθοδήγησή της σε ό,τι αφορά το σχεδιασμό και τη συγκρότηση της δομής των μικρογαλακτωμάτων. Επίσης, πολλές ευχαριστίες οφείλω στις Δρ. Μαρία Χατζιδάκη και Ιωάννα Θεοχάρη για την ουσιώδη συνεργασία και φιλία.

Δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω τις κυρίες Μαργαρίτα Μπεκύρου και Ειρήνη Κολοντή που ήταν κοντά μου προσφέροντάς μου καθημερινά την βοήθειά τους, την στήριξή τους και τις συμβουλές τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη και την υπομονή τους όλα αυτά τα δύσκολα αλλά εποικοδομητικά χρόνια της φοίτησής μου στη σχολή.

Καθετί που ολοκληρώνεται, αφήνει σημάδια, δίνει εμπειρίες, αφήνει χώρο και δίνει ευκαιρίες σε καθετί επόμενο που έρχεται.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
SUMMARY	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
A. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	13
I. Ο καρκίνος ως μια “ασθένεια του κυτταρικού κύκλου”	13
II. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	14
III. Ο ρόλος της p53 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	15
B. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ Raf-MEK-ERK	17
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ BRAFV600E ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ p53 ΣΤΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	17
I. Τι είναι το μελάνωμα	17
II. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/Mek/Erk	19
III. Απορρύθμιση της p53 στο μελάνωμα	21
Γ. Ο ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ	22
➤ Νέκρωση	26
➤ Αυτοφαγία	26
➤ Κυτταρική γήρανση	27
➤ Μιτωτική καταστροφή	28
➤ Πυρόπτωση	28
Δ. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	29
E. ΕΝΕΡΓΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	30
I. Μικρογαλακτώματα ως οχήματα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων	31
II. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά μικρογαλακτωμάτων	32
ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
➤ Κατάλογος χημικών	35
➤ Κυτταρικές σειρές	35
➤ Σύσταση μικρογαλακτωμάτων (m/e) εισαγωγής σε κυτταροκαλλιέργειες WM164 .	35
➤ Καλλιέργεια κυττάρων	36
➤ Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων	36
➤ Προσδιορισμός του ποσοστού νεκρών κυττάρων με Trypan Blue	37

➤ Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με MTT ανάλυση	37
➤ Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών	38
➤ Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών	38
➤ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS/PAGE)	38
➤ Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοποτύπωση	40
➤ Εμφάνιση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.....	40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
❖ Δοκιμές προσδιορισμού κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT Assay)	43
❖ Δοκιμές προσδιορισμού κυτταρικού θανάτου (Trypan Blue Assay).....	47
❖ Βιοχημικός Έλεγχος - Στύπωμα Western	48
❖ Βαθμονόμηση Bradford.....	48
❖ Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot).....	49
I. Προσδιορισμός αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω PARP-cleavage	49
II. Διερεύνηση της επίδρασης του συστήματος μ/ε + PLX 4720 στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK	50
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μελάνωμα αποτελεί το πιο θανατηφόρο, κακό σε πρόγνωση και ταχέως εξελισσόμενο δερματικό καρκίνο . Τα μοριακά γεγονότα που διέπουν την δημιουργία και την εξέλιξη του μελανώματος είναι καθοριστικής σημασίας για τη βελτίωση της στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας . Σε γενετικό επίπεδο, στην εξέλιξη του μελανώματος εμπλέκονται τόσο η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού επιβίωσης Ras/Raf/MEK/ERK όσο και η υπολειτουργικότητα του γενετικού τόπου INK4a/ARF . Η κινάση σερίνης/θρεονίνης B-RAF βρίσκεται μεταλλαγμένη στο 66% των κακοηθών μελανωμάτων . Η μεταλλαγμένη μορφή B-RAF^{V600E} που καθιστά την κινάση ιδιосуστατικά ενεργή, συναντάται στο 80% των μεταλλαγμένων μορφών B-RAF . Επιπρόσθετα, στους ανθρώπους έχει ταυτοποιηθεί έλλειμμα στο γενετικό τόπο INK4a/ARF στο 50% των πρωτογενών όγκων και σχεδόν σε όλες τις κυτταρικές σειρές μελανώματος . Αυτός ο γενετικός τόπος κωδικοποιεί για δυο διακριτές πρωτεΐνες p16INK4a και p14ARF, που ρυθμίζουν τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες Rb και p53, αντίστοιχα .

Με βάση τα παραπάνω, πρωταρχικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αποτίμηση της αντιμυτωτικής – κυτταροτοξικής δράσης των βιοδραστικών ενώσεων, εν δυνάμει αναστολέων της BRAFV600E, PLX4720 (λιπόφιλο) και DPBRAF2 (αμφίφιλο) στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος WM164. Η μεταστατική κυτταρική σειρά WM164 διαθέτει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη V600E (Val 600 Glu) στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου της κινάσης BRAF και μεταλλαγμένο το γονίδιο της TP53 (p53^{null}) .

Σε μια προσπάθεια να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή βιοδραστικότητα με τη χρήση των μικρότερων δυνατών συγκεντρώσεων, οι ενώσεις εγκλωβίστηκαν σε μικρογαλακτώματα, που επιλέχθηκαν μετά από σχετικές μελέτες ως κατάλληλοι φορείς βιοδραστικών ουσιών. Τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά, μείγματα ελαίου, νερού και επιφανειοδραστικών ουσιών .

Μετά την *in vitro* χορήγησή τους στα κύτταρα μελανώματος, διερευνήθηκαν αρχικά ο βαθμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (MTT Assay) και η επαγωγή κυτταρικού θανάτου (Trypan Blue). Η επίδραση του λιπόφιλου ειδικού αναστολέα της BRAF^{V600E} PLX4720 στην επαγωγή απόπτωσης (πρωτεόλυση της PARP-1) καθώς και στο σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης MAPK (προσδιορισμός των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK) διερευνήθηκε περαιτέρω.

Κατά τη διάρκεια της προκαταρκτικής αυτής μελέτης , προέκυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη δυνατότητα χρήσης της δομής μικρογαλακτώματος oil-in-water ως μη τοξικού φορέα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων στο κυτταρικό σύστημα WM164 .

Η ενθυλάκωση του PLX 4720 σε συγκέντρωση $31,5 \times 10^{-6}$ M στο μικρογαλάκτωμα o/w και τελική συγκέντρωση στο θεραπευτικό υλικό $0,63 \times 10^{-7}$ M, προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού της τάξης του 20% (MTT assay) και αξιοσημείωτο ποσοστό κυτταρικού θανάτου (25,8%), (Trypan Blue Assay) 48 και 72 ώρες μετά τη χορήγηση. Σε βιοχημικό επίπεδο, η κυτταροτοξική δράση του PLX4720, εγκλωβισμένου σε μικρογαλάκτωμα o/w στις παραπάνω συνθήκες, δεν μπορεί να αποδοθεί σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο εφόσον δεν ανιχνεύτηκε πρωτεολυτικό θραύσμα της PARP-1 (85kD). Αν και η PLX4720 θεωρείται ειδικός αναστολέας της BRAF^{V600E} κινάσης, η χορήγησή της ενίσχυσε τα επίπεδα έκφρασης της pERK1,2. Το γεγονός αυτό υπονοεί δράση της ένωσης σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια πέραν αυτού της MAPK, πιθανά του P13K/Akt, ή απορύθμιση των μηχανισμών αρνητικής ανάδρασης που διαμεσολαβούνται από τις φωσφατάσες διττής ειδικότητας (MKPs/DUSPs) στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον.

Με βάση τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα, η μελέτη συνεχίζεται με στόχο την αποσαφήνιση του μηχανισμού του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου καθώς και της αλληλεπίδρασης της PLX4720 με τα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης/θανάτου στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μελανώματος.

SUMMARY

Melanoma is the most lethal, poor in prognosis and rapidly progressive form of skin cancer. The molecular events that underly the formation and progression of melanoma are crucial for the improvement of targeted cancer therapy. At genetic level, in the formation of melanoma are involved both the hyperactivation of the Ras/Raf/MEK/ERK survival pathway as much as the downregulation of the genetic locus INK4a/ARF. The serine/threonine kinase B-RAF has been found mutated in 66% of malignant melanomas. The mutated allele B-RAF^{V600E} is responsible for the elevated kinase activity, accounting for 80% of mutated forms of B-RAF. Furthermore, in humans, deletion of INK4a/ARF is a common genetic lesion detected in 50% of primary tumors and nearly all melanoma cell lines. This locus encodes two distinct proteins, p16INK4a and p14ARF, which demonstrate tumor suppressor activity in the genetically distinct pathways of Rb and p53, respectively.

Taking into consideration the above, the primary aim of the present study was the valuation of the antimetabolic-cytotoxic activity of the bioactive compounds, potential inhibitors of BRAF^{V600E}, PLX4720 (lipophilic) and DPBRAF2 (amphiphilic) in the human melanoma cell line WM164. The metastatic cell line WM164, harbors this specific mutation V600E (Val 600 Glu) in codon 600 of the BRAF gene as well as the mutated gene of TP53 (p53^{null}).

In an effort to achieve the highest possible bioactivity while using the lowest possible concentrations, the compounds encapsulated in microemulsions, that had been chosen after relevant studies as suitable delivery systems of bioactive compounds. Microemulsions are thermodynamically stable, dispersions consisting of oil and water and stabilized by surfactant molecules.

After their *in vitro* delivery in melanoma cell culture, they have primarily been investigated the percentage of cell viability (MTT assay) and the induction of cell death (Trypan Blue assay). The effect of the lipophilic specific inhibitor of B-RAF^{V600E}, PLX4720, on the induction of apoptosis (proteolysis of PARP-1) as well as on the survival pathway of MAPK's signalling (determination of the phosphorylated ERK's levels) were further been investigated.

During the preliminary study, encouraging results have been arised considering the possibility of use of the oil-in-water microemulsion's structure as a non-toxic delivery system of bioactive compounds in the cellular system of WM164. The encapsulation of PLX4720 in concentration $31,5 \times 10^{-6}$ M in microemulsion o/w and final concentration in cell medium $0,63 \times 10^{-7}$ M, caused inhibition of cell proliferation of 20% (MTT assay)

and remarkable percentage of cell death (25,8%), (Trypan Blue assay), 48 and 72 hours after delivery.

At biochemical level, the cytotoxic activity of PLX4720, encapsulated in microemulsion o/w in above mentioned circumstances, cannot be attributed to apoptotic cell death since it was not detected proteolytic cleavage of PARP-1 (85kD). Even if PLX4720 is considered to be specific inhibitor of B-RAF^{V600E} kinase, its delivery enhanced the expression levels of pERK1,2. This fact suggests activity of this compound in other signalling pathways except that of MAPK's, possibly the one of PI3/Akt, or abrogation of negative feedback loops that are mediated mainly by dual specificity phosphatases (MKPs/DUSPs), in this specific cellular environment.

Taking into account all the above preliminary results, the study continues with a view to clarify the mechanism of the induced cell death as well as the interaction of PLX4720 with the survival/death signalling pathways of this specific melanoma cell line.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

I. Ο καρκίνος ως μια “ασθένεια του κυτταρικού κύκλου”

Η φυσιολογική ανάπτυξη και διατήρηση ενός οργανισμού βασίζεται σε ένα πολύπλοκο και εξαιρετικά ακριβές σύστημα ελέγχου της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης. Τα ανώτερα μετόζωα είναι πολυκύτταροι και μακρόβιοι οργανισμοί. Η διατήρησή τους απαιτεί την ύπαρξη κυττάρων με ισχυρό δυναμικό διαίρεσης με στόχο την ανανέωση των ιστών και την αποφυγή του εκφυλισμού τους.

Ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι μια παράμετρος υψίστης σημασίας για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Εκτροπή από την ισορροπημένη αύξηση και απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οδηγεί σε ανεξέλεγκτη παραγωγή σωματικών κυττάρων και τελικά σε καρκινική εξαλλαγή και δημιουργία όγκων; οι απόγονοι ενός απορρυθμισμένου κυττάρου, συσσωρεύουν σταδιακά, στη μακρόχρονη ζωή ενός οργανισμού, ένα κρίσιμο αριθμό γενετικών αλλοιώσεων και επιγενετικών τροποποιήσεων, που μπορεί να οδηγήσει στον καρκινικό μετασχηματισμό τους. Η συσσώρευση τέτοιων κυττάρων δημιουργεί τους όγκους.

Επομένως, ένα καρκινικό κύτταρο χαρακτηρίζεται από απώλεια των φυσιολογικών μηχανισμών ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα και μπορεί να διηθήσει παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, δημιουργώντας μεταστάσεις. Τα μεταστατικά κύτταρα διαλύουν τους φυσιολογικούς ιστούς και εμποδίζουν την λειτουργία ζωτικών οργάνων, οδηγώντας τελικά στον θάνατο.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η καρκινογένεση είναι μια μακρόχρονη, πολυσταδιακή διαδικασία, που μπορεί να διαρκέσει δυο, τρεις ή περισσότερες δεκαετίες. Αρχίζει με την εναρκτήριο μετάλλαξη στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου (αρχικό κλωνικό κύτταρο) οι απόγονοι του οποίου συσσωρεύουν και άλλες μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις στο DNA τους. Η συσσώρευση των αλλοιώσεων αυτών προωθεί τους απογόνους του αρχικού κυττάρου στην ανάπτυξη του πλήρους καρκινικού ετερογενή φαινοτύπου. Η ικανότητα του οργανισμού να απομακρύνει τις τοξίνες ή τους ιούς από τα κύτταρά του, να επιδιορθώνει αποτελεσματικά τις βλάβες του DNA μεγάλο μέρος των οποίων προκαλείται από την έκθεση ενός οργανισμού σε περιβαλλοντικούς μεταλλαξογόνους χημικούς παράγοντες και γενικότερα ο τρόπος ζωής επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τη διαδικασία της καρκινικής εξαλλαγής (*Williams G.H. et al., 2012 ; Park Moon-Taek et al., 2003*) .

II. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

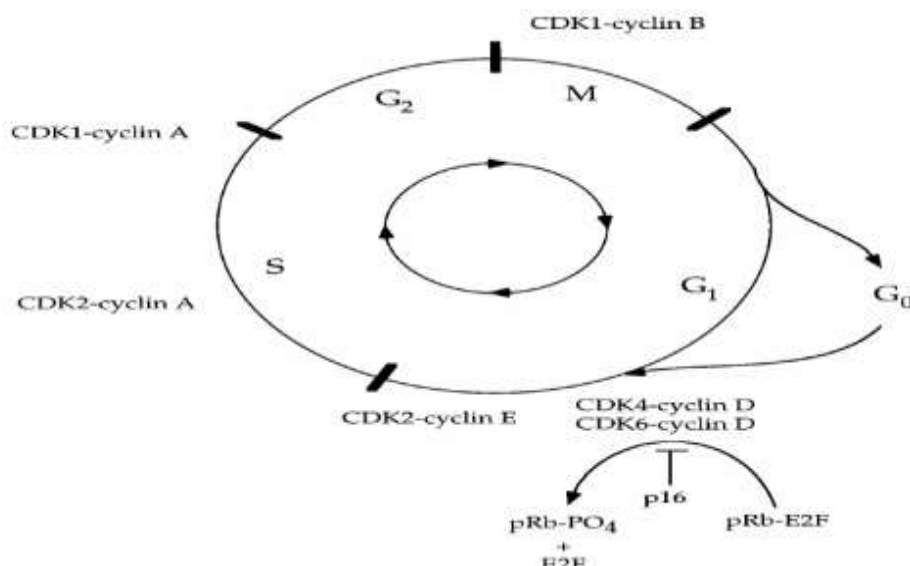
Ο κυτταρικός κύκλος διαίρεσης και αναπαραγωγής διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις :

- αμέσως μετά την Μίτωση (M), την **G1** όπου το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος και ξεκινά την σύνθεση RNA και πρωτεϊνών,
- την **S** φάση όπου το DNA αντιγράφεται ώστε να παραχθεί ένα ακριβές αντίγραφο του γονιδιώματος για τα θυγατρικά κύτταρα και
- την **G2** όπου το κύτταρο αυξάνεται περαιτέρω και παράγει επιπλέον πρωτεΐνες ώστε να διασφαλίσει τον σχηματισμό των θυγατρικών κυττάρων.

Οι φάσεις **G1**, **S** και **G2** συγκροτούν την Μεσόφαση (Interphase).

- τελικά το κύτταρο εισέρχεται στην φάση της Μίτωσης (M) όπου τα χρωμοσώματα οργανώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε να διασφαλίζεται η παραγωγή δύο άρτιων γενετικά ταυτόσημων θυγατρικών κυττάρων. Έτσι ο κύκλος μπορεί να ξαναρχίσει. Τα κύτταρα μπορούν επίσης να σταματήσουν να διαιρούνται και να παραμείνουν στην φάση G_0 για ώρες, ημέρες, εβδομάδες, χρόνια ή ακόμα και μόνιμα έως τον θάνατο του οργανισμού, (εικόνα 1).

Η μετάβαση του κυττάρου από τη μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, η οποία εξασφαλίζει τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και - τελικά - της αύξησης του οργανισμού. Υπάρχουν τουλάχιστον 2 τύποι μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου : ένας καταρράκτης πρωτεϊνικών φωσφορυλιώσεων και αποφωσφορυλιώσεων που προωθεί το κύτταρο από το ένα στάδιο στο άλλο και ένα σύνολο σημείων ελέγχου (checkpoints) που παρακολουθεί / ελέγχει την ολοκλήρωση απαραίτητων διαδικασιών και καθυστερεί την προώθηση στο επόμενο στάδιο όποτε είναι απαραίτητο.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση κυτταρικού κύκλου, (Kathleen Collins et al., PNAS 1997).

Ο πρώτος τύπος ελέγχου περιλαμβάνει πρωτεϊνικά σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης. Οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και οι αντίστοιχες κυκλίνες είναι οι θετικοί ρυθμιστές που προωθούν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, ενώ οι αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKIs) δρώντας ως ‘φρένα’ που διακόπτουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου αποκρινόμενοι σε ρυθμιστικά σήματα, αποτελούν σημαντικούς αρνητικούς ρυθμιστές. Ο καρκίνος προέρχεται από την ανώμαλη έκφραση ή ενεργοποίηση των θετικών ρυθμιστών και την λειτουργική καταστολή των αρνητικών ρυθμιστών.

Αναφορικά με τον δεύτερο τύπο ελέγχου, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη εσωτερικών σημείων ελέγχου (checkpoints) στον κύκλο, ώστε να επιβεβαιώνεται ότι μια κρίσιμη διαδικασία έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς, πριν το κύτταρο συνεχίσει στην επόμενη. Παραδείγματος χάριν, υπάρχει στη G1 ένα “σημείο χωρίς επιστροφή” γνωστό ως Restriction/Start point, από το οποίο όταν το κύτταρο περάσει, θα οδηγηθεί οπωσδήποτε στη φάση S για ολοκλήρωση του κύκλου. Αν διαπιστωθεί βλάβη κατά τη διάρκεια της G1, εμποδίζεται η μετάβαση στη φάση S, με σκοπό να επιδιορθωθεί αυτή πριν το κύτταρο την αναπαράγει μέσω του διπλασιασμού του DNA του. Ένα ακόμη σημείο ελέγχου στη μετάβαση G2 → M, εξασφαλίζει την ύπαρξη ακέραιου γενετικού υλικού για την είσοδο στη φάση της διαίρεσης. Ένα τρίτο σημείο ελέγχου βρίσκεται στη μετάβαση S → G2 και σταματάει τον κύκλο όταν η διαδικασία αντιγραφής του γενετικού υλικού δεν έχει επιτυχώς ολοκληρωθεί. Τέλος, η ολοκλήρωση της διαίρεσης ελέγχεται από έναν άλλο διακόπτη, που σταματάει τη μίτωση πριν την ανάφαση, σε περίπτωση που η μιτωτική συσκευή δεν έχει σχηματισθεί πλήρως, ή τα χρωμοσώματα δεν έχουν προσαρτηθεί σωστά στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου (*Vermeulen 2003 ; Houtgraaf et al., 2006 ; Schmitt 2007*).

III. Ο ρόλος της p53 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η πρωτεΐνη p53 αποτελεί τον κεντρικό κόμβο ενός κυτταρικού δικτύου το οποίο λειτουργεί ως αισθητήριο πολλών διαφορετικών μορφών κυτταρικού στρες και συντονίζει τις ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις. Το γονίδιο p53 ανήκει στην κατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και το προϊόν του είναι μια φωσφοπρωτεΐνη 339 αμινοξέων που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η πρωτεΐνη p53 ανιχνεύεται σε πολύ μικρή ποσότητα στα φυσιολογικά κύτταρα και έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Δρα με τη μορφή τετραμερούς ως μεταγραφικός παράγοντας και κατέχει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, την επιδιόρθωση βλαβών DNA, την γήρανση και την αγγειογένεση. Η δράση της ασκείται κυρίως μέσω του κεντρικού τμήματος του μορίου της (περιοχή ειδικής σύνδεσης με το DNA), το οποίο αναγνωρίζει

τις ρυθμιστικές αλληλουχίες των 120 περίπου γονιδίων στόχων της και και προσδέεται σε αυτές. Σημειώνεται ότι, οι περισσότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 που ανιχνεύονται σε ανθρώπινους καρκίνους, αφορούν ακριβώς το τμήμα του μορίου που αλληλεπιδρά με το DNA. Οι μεταλλάξεις του p53 συσσωρεύονται στο 50% των ανθρώπινων καρκινικών τύπων, ενδεχομένως επειδή η απώλεια του p53 προσδίδει στα κύτταρα πλεονέκτημα ανάπτυξης. Στους φυσιολογικούς ιστούς, το γονίδιο p53 διατηρείται ως αλληλόμορφο φυσιολογικού τύπου (wild type) αλλά η λειτουργία του είναι μειωμένη λόγω της δράσης της mdm-2 (murine double minute-2) που είναι αρνητικός ρυθμιστής της πρωτεΐνης p53 : μόλις ενεργοποιηθεί η p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου της mdm2 και με τη σειρά της αναστέλλει τη δράση της p53.

Όπως είναι γνωστό, το κύτταρο αντιδρά στις βλάβες ενεργοποιώντας ένα πολύπλοκο δίκτυο από επιδιορθωτικά μόρια και μόρια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Το δίκτυο απόκρισης σε βλάβες του DNA καταλήγει στην πρωτεΐνη p53. Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί είτε σε επιδιόρθωση των βλαβών, είτε σε απομάκρυνση του κυττάρου από τον πληθυσμό εάν οι βλάβες δεν επιδιορθωθούν. Μόλις το κύτταρο “αντιληφθεί” τη βλάβη, αρχίζει η επεξεργασία της, ενώ οι Chk1, Chk2, και η p53 ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου και ο κύκλος σταματάει. Η p53 επιπλέον εντοπίζεται στα σημεία βλάβης και προωθεί την επιδιόρθωση (*Al Rashid et al., 2005*), ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την ενεργοποίηση της μεταγραφής μορίων- εκτελεστών της στάσης του κύκλου (π.χ p21) αλλά και μορίων που απαιτούνται για την επιδιόρθωση όπως για παράδειγμα την GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage 45) η οποία αλληλεπιδρά με την PCNA στα σημεία της βλάβης και επιπλέον με την Cdc2, οδηγώντας σε G2/M στάση. Ανάλογα με τη βλάβη, ενεργοποιείται διαφορετικός μηχανισμός επιδιόρθωσης (*Pluquet and Hainaut, 2001*) και το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται τόσο από τον κυτταρικό τύπο, όσο και από τη σοβαρότητα της βλάβης. Έτσι, αν η βλάβη δεν είναι σοβαρή, η στάση του κύκλου είναι παροδική, η βλάβη επιδιορθώνεται και ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζει. Αν η προσπάθεια επιδιόρθωσης αποτύχει αλλά το κύτταρο επιβιώσει, τότε προκαλούνται μεταλλάξεις και ευνοείται η ανάπτυξη καρκίνου. Στην περίπτωση που η βλάβη είναι πολύ σοβαρή, η p53 προωθεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν προαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως puma, noxa, bax, ενώ μειώνει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως bcl-2, survivin. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες, μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια και οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, ενώ και η p53 μπορεί να μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια και να επηρεάσει την αποπτωτική διαδικασία αλληλεπιδρώντας άμεσα με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας bcl-2 (όπως η BAK) (*Murphy et al., 2004*). Τέλος το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε μόνιμη στάση του κυτταρικού κύκλου και

γήρανση μέσω του μονοπατιού p53/p21/p16 (*Drosten M. et al., 2014 ; Teodoro et al.,2007 ; Fridman and Lowe, 2003*) .

B. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ Raf-MEK-ERK Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ BRAFV600E ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ p53 ΣΤΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

I. Τι είναι το μελάνωμα

Οι περισσότεροι καρκίνοι του δέρματος (βασικοκυτταρικοί, ακανθοκυτταρικοί) δεν θεωρούνται πολύ επικίνδυνοι διότι θεραπεύονται εύκολα χειρουργικά ή με διάφορα φάρμακα που εφαρμόζονται τοπικά στο δέρμα. Εξάιρεση αποτελεί ο κακοήθης σπίλος (σπίλος = <<ελιά>>) που ονομάζεται μελάνωμα (μελανός όγκος). Αν και αντιπροσωπεύει το 5-7% των κακοηθών δερματικών παθήσεων, το μελάνωμα είναι ο πιο θανατηφόρος δερματικός καρκίνος και ευθύνεται για το 75% των θανάτων από δερματικούς όγκους.

Το μελάνωμα προέρχεται από τα μελανοκύτταρα του δέρματος. Τα μελανοκύτταρα βρίσκονται στο κατώτερο στρώμα της επιδερμίδας και παράγουν μελανίνη, τη χρωστική που προσδίδει το φυσικό χρώμα του δέρματος. Η έκθεση στον ήλιο οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης μελανίνης, με αποτέλεσμα το μαύρισμα του δέρματος. Το μελάνωμα αποτελεί όχι μόνο τον πλέον κακοήθη δερματικό όγκο αλλά και ένα από τους πλέον κακοήθεις όγκους γενικώς. Μπορεί να διασπαρεί σχεδόν σε κάθε όργανο ή ιστό του σώματος και να οδηγήσει στο θάνατο μέσα σε ένα χρόνο μετά την υποτροπή του σε απομακρυσμένα σημεία. Το μελάνωμα μεθίσταται συχνότερα στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο σωλήνα. Πρόκειται για σχετικά συχνό καρκίνο , η επίπτωση του οποίου αυξάνει συνεχώς κάθε χρόνο (*National Cancer Institute*).

Συνυπολογίζοντας την αυξημένη εμφάνιση και την αντίσταση στις συμβατικές αντινεοπλασματικές θεραπείες, το μελάνωμα καθίσταται ένα από τα πιο απαιτητικά και δύσκολα θέματα της ογκολογίας (*Melanoma Research Foundation*) .

➤ Μοριακή βιολογία του μελανώματος

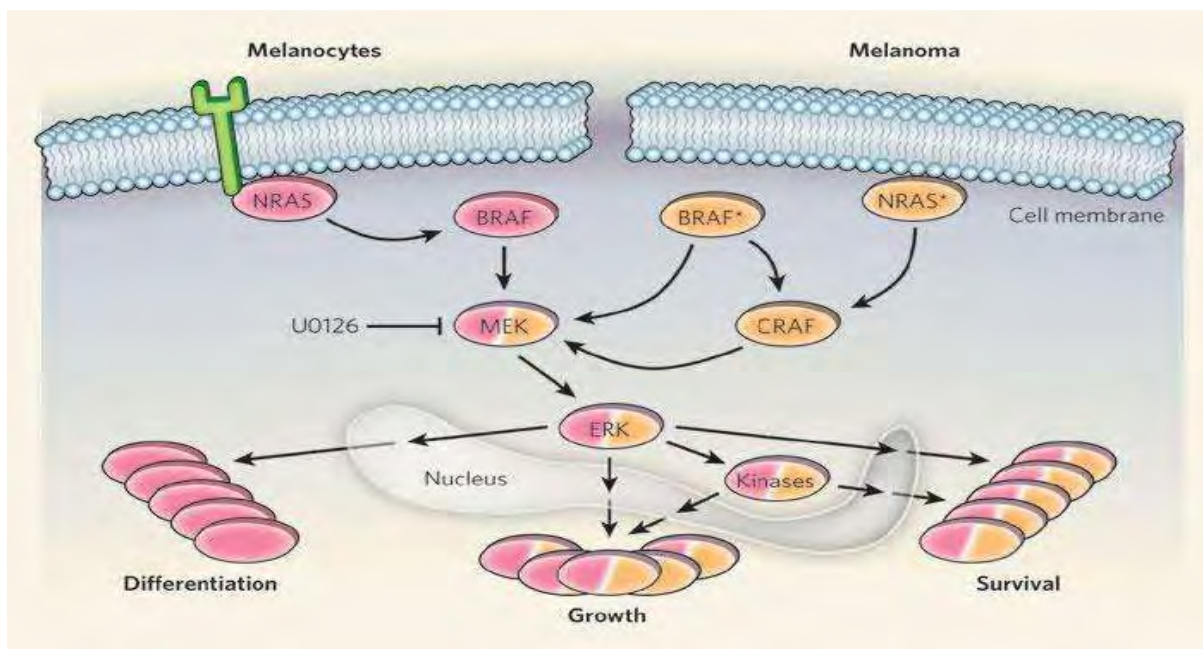
Η κυτταρική αύξηση βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο τεσσάρων κατηγοριών πρωτεϊνικών μορίων: των αυξητικών παραγόντων, των υποδοχέων τους, των ενδοκυττάρων μεσολαβητών του σήματος και των πυρηνικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την μεταγραφή. Τα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ανήκουν και στις τέσσερις παραπάνω κατηγορίες, οι οποίες με τη σειρά τους συμμετέχουν στη

ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Η διαταραχή της έκφρασης των πρωτο-ογκογονιδίων αποτελεί αιτία κακοήθους εξαλλαγής. Έτσι, οποιοσδήποτε παράγοντας που οδηγεί σε μεταλλαγή του DNA ενεργοποιώντας την υπερβολική και άκαιρη έκφραση πρωτο-ογκογονιδίων ή και την παραγωγή μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεξαρτητοποίηση των μηχανισμών κυτταροδιαίρεσης από την φυσιολογική ρύθμιση. Έχοντας υπόψη την αλυσιδωτή αντίδραση, που ξεκινά από την αλληλεπίδραση του μιτογόνου ερεθίσματος με τον υποδοχέα του και οδηγεί μέσω πολλαπλών βημάτων, σε διπλασιασμό του DNA και μίτωση, η <<μονιμοποίηση>> κάποιου κρίκου της αλυσίδας αυτής, λόγω ενεργοποίησης του αντίστοιχου ογκογονιδίου, μπορεί να διατηρεί το κύτταρο σε κατάσταση αδιάκοπης διαίρεσης που αποτελεί πρωταρχικό βήμα κακοήθους μεταμόρφωσης των κυττάρων (*Molecular Melanoma Map Project*).

Σε γενετικό επίπεδο, τα βαρυσήμαντα γεγονότα στην εξέλιξη του μελανώματος εμπλέκουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf και την υπολειτουργικότητα του γενετικού τόπου INK4a/ARF. Το μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK κινάσεων διαμεσολαβεί την κυτταρική απόκριση σε σήματα αύξησης. Το ογκογονίδιο Ras είναι μεταλλαγμένο στο 15% των ανθρώπινων καρκίνων. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης B-RAF βρίσκεται σε μεταλλαγμένη μορφή στο 66% των κακοήθων μελανωμάτων και σε μικρότερη συχνότητα σε ένα εύρος ανθρώπινων καρκίνων. Η μεταλλαγμένη μορφή B-RAF V599E ή V600E που καθιστά την κινάση ιδιοστατικά ενεργή συναντάται στο 80% των μεταλλαγμένων μορφών B-RAF. Επιπροσθέτως, στους ανθρώπους έχει ταυτοποιηθεί έλλειμμα στο γενετικό τόπο INK4a/ARF στο 50% των πρωτογενών όγκων και σχεδόν σε όλες τις κυτταρικές σειρές μελανώματος. Αυτός ο γενετικός τόπος κωδικοποιεί για δυο διακριτές πρωτεΐνες p16INK4a και p14ARF που διαδραματίζουν ογκοκατασταλτική δραστηριότητα σε γενετικώς διακριτά αντικαρκινικά μονοπάτια όπως το μονοπάτι Rb για την p16INK4a και το μονοπάτι p53 για την p14ARF, αντίστοιχα. Ωστόσο, τελευταίες μελέτες προτείνουν μια αλληλοεμπλοκή των μονοπατιών και πιθανόν και των μορίων B-RAF και p53 για την ολοκληρωτική εξαλλαγή των μελανοκυττάρων σε κακοήθες μελάνωμα. Τα δεδομένα αυτά εμφανίζουν την ενεργοποιητική μετάλλαξη B-RAF V600E ως ιδρυτικό γεγονός της πρόκλησης μελανοκυτταρικής βλάβης, και την απορρύθμιση του μονοπατιού της p53 ως καθοριστικό βήμα αθανатоποίησης και πλήρους κακοήθους εξαλλαγής αυτών των μελανοκυττάρων (*Krayem M. et al., 2015 ; Law M.H. et al., 2012*).

II. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/Mek/Erk

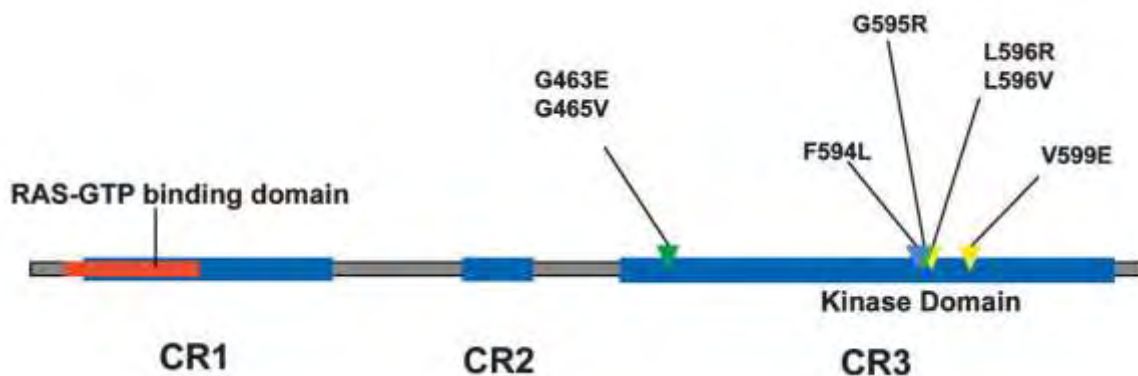
Εξωκυτταρικά σήματα (μιτογόνα, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές) οδηγούν διαμέσου της αλληλεπίδρασης προσδετών με εξειδικευμένους υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης (RTKs), στη μεταβίβαση του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου διαμέσου μέσω αυτοφωσφορυλίωσης του υποδοχέα και στρατολόγησης πρωτεϊνών ικριώματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την εναλλαγή των μονομερών G πρωτεϊνών Ras από την ανενεργή κατάσταση (Ras-GDP) στην ενεργή κατάσταση (Ras-GTP). Η Ras-GTP ενεργοποιεί καθοδικά (downstream) μια αλληλουχία (καταρράκτης, cascade) ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων που συνιστούν μια οδό, συχνά με αρκετές διακλαδώσεις που εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης/ ανάπτυξης και συμπεριφοράς. Ένα από τα Ras-επαγόμενα μονοπάτια αφορά μία οικογένεια πρωτεϊνών με δράση κινάσης σερίνης/ θρεονίνης γνωστή ως μιτογόνο-επαγόμενες πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs). Αρχικά, η Ras-GTP αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr Raf, που υφίσταται σε τρεις ισομορφές (A-RAF, B-RAF, C-RAF). Η ενεργή RAF, φωσφορυλιώνει σε κατάλοιπα σερίνης δυο επιπλέον κινάσες MEK 1 και MEK 2, που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν σε κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης τις κινάσες ERK 1 και ERK2. Οι ενεργές ERKs είτε φωσφορυλιώνουν έναν αριθμό κυτταροπλασματικών στόχων, είτε μετατοπίζονται στο εσωτερικό του πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων όπως c-fos, Elk-1. Η ανώμαλη και άκαιρη ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPκινασών εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την παθολογική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων, (*Paul H. Huang, Richard Marais, 2009*), (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Φυσιολογικό vs μεταλλαγμένο μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK σε μελανοκύτταρα και στο μελάνωμα, αντίστοιχ, (Paul H. Huang, Richard Marais, 2009).

➤ Η μεταλλαγμένη ογκοπρωτεϊνική-κινάση BRAFV600E

Ένας αυξανόμενος όγκος ενδείξεων προτείνει ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf/Mek/Erk εμπλέκεται στην ογκογονική συμπεριφορά του μελανώματος. In vitro μελέτες δείχνουν ότι κυτταρικές σειρές μελανώματος παρουσιάζουν υψηλή ιδιοσυστατική δραστηριότητα κινάσης ERK. Η συνεχής δραστηριότητα της ERK είναι πιθανόν συνέπεια μεταλλάξεων από ανοδικά μόρια του μονοπατιού MAPκινασών. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις της Ras ταυτοποιούνται στο 25% όλων των καρκίνων. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι σωματικές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο γονίδιο B-RAF ταυτοποιούνται στο 60-66% των κακοηθών μελανωμάτων. Όλες οι μεταλλάξεις εντοπίζονται μέσα στη περιοχή CR3 (εικόνα 3) με δράση κινάσης της B-RAF, με την απλή αντικατάσταση (T→A) της βαλίνης στη θέση 600 από γλουταμινικό (V600E) να αντιπροσωπεύει το 80% των παρατηρηθέντων μεταλλάξεων. Στις κυτταρικές σειρές με την μετάλλαξη V600E ή V599E δεν απαιτείται η ταυτόχρονη ύπαρξη μεταλλαγμένης Ras για την εκδήλωση ογκογόνου συμπεριφοράς. Η μετάλλαξη V600E έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη ενός αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος (γλουταμινικό), που μιμείται την φωσφορύλιωση στη ρυθμιστική περιοχή της B-RAF στη ρυθμιστική θέση S598 που προκαλείται φυσιολογικά από τη δράση της ενεργής Ras. Συνακόλουθα, η ιδιοσυστατικά ενεργή μορφή B-RAF V600E έχει 10-12πλάσια αύξηση της δραστηριότητας κινάσης, το οποίο οδηγεί σε ενισχυμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK/ERK (Paluncic J. et al., 2016; Perna D. et al., 2015; McCubrey J.A. et al., 2007; Tuveson D. et al., 2003).



Εικόνα 3. Δομή γονιδίου B-RAF, οι τρεις συντηρημένες περιοχές του και οι συνήθεις θέσεις αντικατάστασης αμινοξέων , (*Tuveson D.A. et al., 2003*).

III. Απορρύθμιση της p53 στο μελάνωμα

Οι μελανοκυτταρικοί σπίλοι συχνά διαθέτουν ογκογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο B-RAF αλλά μια μειονότητα εξ αυτών εξελίσσεται σε μελάνωμα. Στα ανθρώπινα μελανοκύτταρα, η συνεχής BRAF V600E έκφραση, πυροδοτεί ογκογονο-επαγόμενη γήρανση, υποδηλώνοντας ότι η παράκαμψη της γήρανσης είναι απαραίτητη για τον κακοήγη μετασχηματισμό των μελανοκυττάρων. Έχει προταθεί μέσα από έρευνες, ότι η απόκτηση ενός επιπλέον δυσλειτουργικού χαρακτηριστικού, της απορρύθμισης της p53, αθανατοποιεί τα μελανοκύτταρα τα οποία έχουν την B-RAF V600E . Η έλλειψη της λειτουργικότητας της p53 στα κύτταρα αυτά μπορεί να οδηγήσει επίσης και στην γενετική αστάθεια ή/και έλλειψη του γενετικού τόπου του ρετινοβλαστώματος (RB) 1. Οι πληροφορίες αυτές υποστηρίζουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της p53 στο μελάνωμα.

Καθόσον τα στατιστικά αναφέρουν λιγότερο συχνή μετάλλαξη της ίδιας της p53 στο μελάνωμα, αλλά περισσότερο συχνές τις μεταλλάξεις στα μόρια που αλληλεπιδρούν με την p53 , ενισχύεται η πρόταση περί απορρύθμισης του μονοπατιού της p53 στο μελάνωμα. Πιο συγκεκριμένα, στους ανθρώπους ελλείμματα στο γενετικό τόπο INK4A/ARF συναντώνται στο 50% των πρωτογενών όγκων και σχεδόν σε όλες τις κυτταρικές σειρές μελανώματος,

(*Flores et al., 1996 ; Walker et al., 1999*). Αυτός ο γενετικός τόπος INK4A/ARF μέσω εναλλακτικού ματίσματος κωδικοποιεί για δυο διακριτές πρωτεΐνες, p16INK4a και p14ARF (p19ARF στον ποντικό) , οι οποίες παρουσιάζουν ογκοκατασταλτική δραστηριότητα σε διακριτά αντικαρκινικά μονοπάτια . Η p16INK4a καταστέλλει την κινάση Cdk4/6 και την εμποδίζει να φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη του

ρετινοβλαστώματος (Rb) 1. Η μη φωσφορυλιωμένη Rb προσδένεται στο μεταγραφικό παράγοντα E2F και δημιουργεί σύμπλοκα με τις cdk4,2-κυκλίνες D,E ,με αποτέλεσμα την καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Η p14ARF προσδένεται στην mdm2 και εμποδίζει άμεσα την ουβικιτινίωση της p53 με αποτέλεσμα της σταθεροποίηση και συσσώρευση της p53. Επομένως, τα ελλείμματα του γενετικού τύπου, INK4a/ARF οδηγούν στην απώλεια και των δυο μονοπατιών ογκοκαταστολής του κυττάρου(το μονοπάτι p53 και το μονοπάτι Rb).

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η συνεχής παρουσία- έκφραση της BRAF600E και η απουσία ογκοκατασταλτικής δράσης της p53 αποτελούν ακρογωνιαίους λίθους στην εγκαθίδρυση μελανώματος. Επίσης, πειραματικά *in vitro* δεδομένα, δείχνουν ότι ο καρκινικός μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία δυο σταδίων που περιλαμβάνει τη δράση ενός κυτταροπλασματικού και ενός πυρηνικού ογκογονιδίου. Οι πυρηνικές ογκοπρωτείνες (π.χ p53) συνήθως δεν αλλάζουν τη μορφολογία του κυττάρου ή την εξάρτησή του από αυξητικούς παράγοντες αλλά μπορούν να τα κάνουν αθάνατα. Από την άλλη πλευρά , οι κυτταροπλασματικές ογκοπρωτείνες (π.χ. B-RAF) δεν αθανатоποιούν τα κύτταρα, αλλά ελαττώνουν την εξάρτησή τους από μιτογόνους παράγοντες, από το υπόστρωμα καλλιέργειας και τους αλλάζουν και τη μορφολογία. Συλλογικά, όλα τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν ότι η ιδιοστατική μετάλλαξη της BRAF V600E αποτελεί μεν πρωταρχικό και εγκαθιδρυτικό γεγονός για τον σχηματισμό μελανοματικών σπίλων αλλά η απορρύθμιση του μονοπατιού της p53 ίσως να είναι η κρίσιμη αλλαγή για την ολοκληρωτική μελανοκυτταρική κακοήθης μεταμόρφωση (*Paluncic J. et al., 2016*) .

Γ. Ο ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

Εάν το κύτταρο δεν κατορθώσει να επιδιορθώσει αποτελεσματικά ή δεν μπορεί να «ανεχθεί» τις βλάβες στο DNA, εισέρχεται σε μια διαδικασία κυτταρικού θανάτου ώστε να απομακρυνθεί από τον παρακείμενο φυσιολογικό κυτταρικό πληθυσμό. Αυτό γιατί, όπως ήδη αναφέρθηκε, η επισυσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό πολύ συχνά έχει σοβαρές βιολογικές επιπτώσεις που εκδηλώνονται στο κύτταρο ως χρωμοσωμικές μεταβολές, γονιδιακές μεταλλάξεις και κακοήθης μετασχηματισμός. Η απόπτωση είναι η κύρια μορφή θανάτου που επάγεται από γονοτοξικούς παράγοντες. Εξαιρετικά συντηρημένος μηχανισμός διατήρησης της σταθερότητας του αριθμού και της θέσης των κυττάρων μέσα στους ιστούς. Διακατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη διατήρηση της ομοιόστασης των πολυκύτταρων οργανισμών. Αναφέρεται ως <<

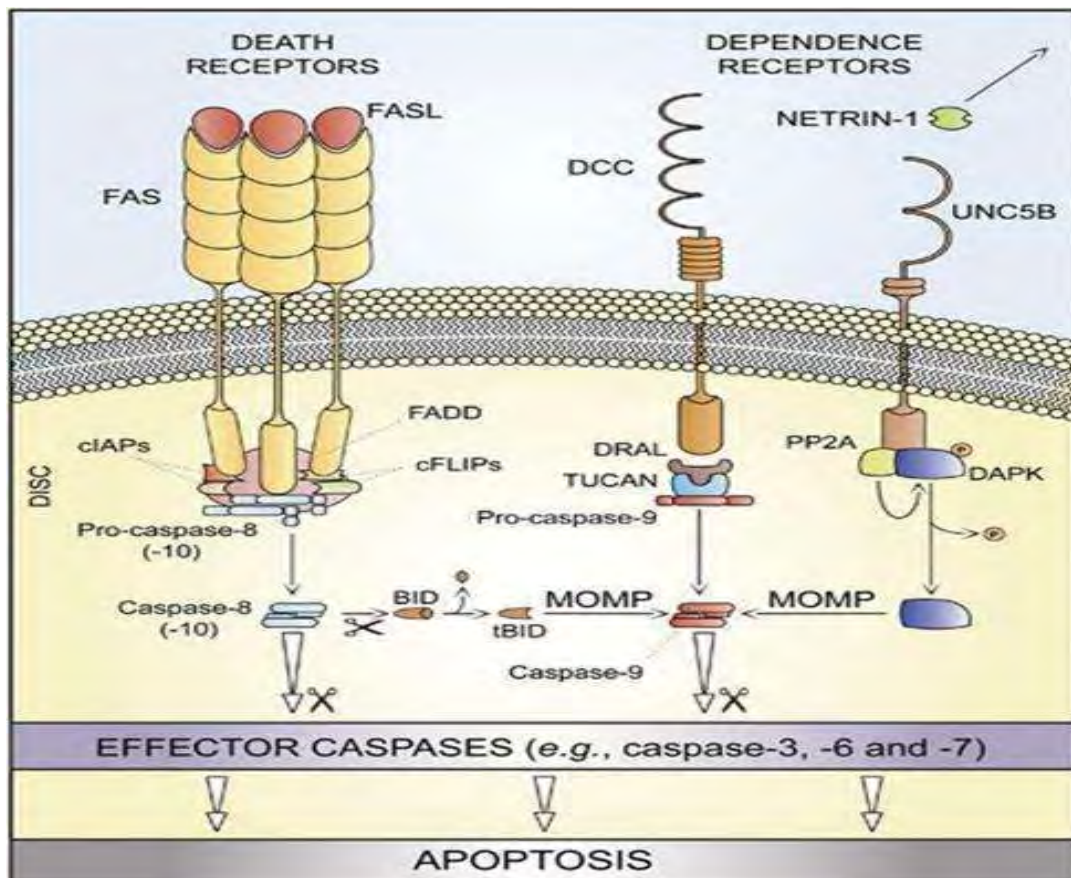
Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος >> και η απορρύθμισή της ευθύνεται για την παθογένεια πολλών ανθρώπινων νοσημάτων , όπως αυτοάνοσα, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκίνος.

Κατά την απόπτωση το κύτταρο εμφανίζει συγκεκριμένα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά . Στα μορφολογικά περιλαμβάνονται: κυστιδιοποίηση κυτταρικής μεμβράνης, συρρίκνωση κυττάρου, συμπίκνωση χρωματίνης και κατακερματισμός DNA, και τελικά την εγκόλπωση από μακροφάγα ή γειτονικά κύτταρα ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα φλεγμονής. Σε βιοχημικό επίπεδο, είτε μέσω υποδοχέων θανάτου , είτε μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών, με τελικό αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα μικρού μεγέθους, τα οποία απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση . Η απόπτωση είναι μια ενεργειο-εξαρτώμενη διαδικασία.

Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που τέμνουν τα υποστρώματα τους μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος. Όλες συντίθενται ως ανενεργά ζυμογόνα που περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή, μια μεγάλη και μια μικρή υπομονάδα. Η ωρίμανση τους γίνεται μέσω πρωτεόλυσης σε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, ενώ κάθε ενεργή κασπάση είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δυο όμοιες μεγάλες υπομονάδες και από δυο όμοιες μικρές υπομονάδες (*Salvesen and Abrams, 2004*). Οι ανθρώπινες κασπάσες διακρίνονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους (*Vallette and Oliver, 2005*) : στην ωρίμανση των κυτταροκινών ανήκουν οι κασπάσες 1,4,5 και 14 και στην απόπτωση οι κασπάσες 2,3,6,7,8,9 και 10. Οι αποπτωτικές κασπάσες διακρίνονται σε εναρκτήριες κασπάσες (initiators) 2, 9 , 8 και 10 που ενεργοποιούνται πρώτες και στην συνέχεια ενεργοποιούν μέσω πρωτεόλυσης τις κασπάσες τελεστές (effectors) 3,6 και 7 . Κύριες εναρκτήριες κασπάσες θεωρούνται οι κασπάση-8 για το εξωτερικό μονοπάτι και η κασπάση-9 για το μιτοχονδριακό (*Fischer et al., 2003*). Οι κασπάσες μπορούν να απενεργοποιηθούν από μια ομάδα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών τις IAP (inhibitors of apoptosis proteins) οι οποίες προσδέουν και αναστέλλουν τις κασπάσες-3, -7 και -9, αλλά όχι και την κασπάση-8 (*Schimmer,2008*). Έχουν περιγραφεί δυο κύρια μονοπάτια σηματοδότησης για την ενεργοποίηση των κασπασών : το μιτοχονδριακό μονοπάτι και το μονοπάτι του υποδοχέα νέκρωσης.

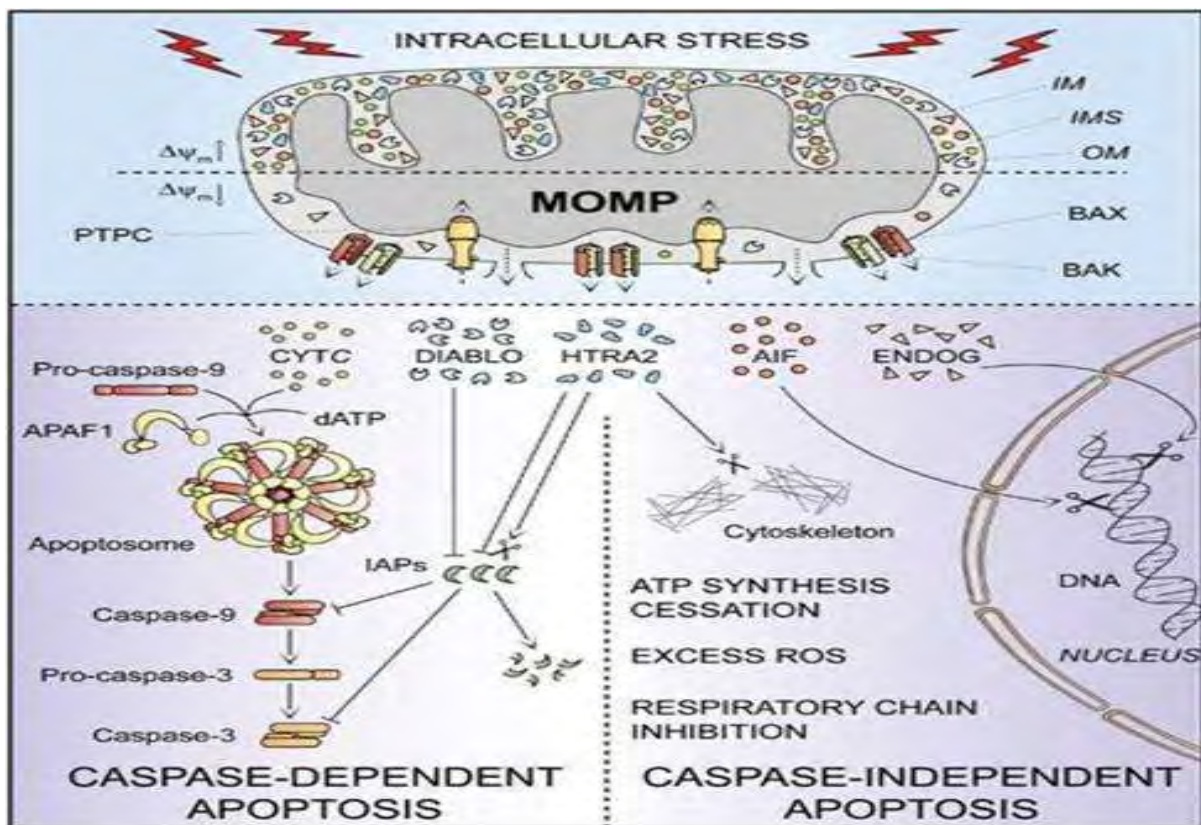
Το μονοπάτι υποδοχέων θανάτου (εξωτερικό) (Εικόνα Α) της Απόπτωσης, διαμεσολαβείται από υποδοχείς θανάτου που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη και ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων TNF (tumor necrosis factor receptors) όπως είναι οι Fas, TNFR, DR4, DR5. Μόλις συνδεθεί στον υποδοχέα ο κατάλληλος προσδέτης Fas L, TNF και TRAIL αντιστοίχως, επάγονται αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με πρωτεΐνες προσαρμοστές ειδικές για κάθε υποδοχέα (π.χ. FADD για τον Fas, TRADD για

τον TNF) οι οποίες διευκολύνουν την στρατολόγηση της προ-κασπάσης-8 και το σχηματισμό του συμπλόκου DISC (death-inducing signaling complex). Η προ-κασπάση-8 αυτοπρωτεολύεται μέσα στο DISC σε ενεργή κασπάση-8. Η ενεργοποιημένη κασπάση-8, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και πρωτεολύει άλλες προ-κασπάσες , όπως είναι η προκασπάση-3. Επίσης, πρωτεολύει και πρωτεΐνες- μέλη της οικογένειας bcl-2 όπως η Bid πυροδοτώντας την διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) . Η πρωτεόλυση τους από την κασπάση-8, αντιπροσωπεύει ένα σημείο διασύνδεσης μεταξύ των δύο μονοπατιών της απόπτωσης . Η εξωτερική απόπτωση μπορεί επίσης να επαχθεί από υποδοχείς εξάρτησης όπως DCC και UNC5B, που μεταδίδουν σήματα θανάτου απουσία των προσδετών τους (netrin-1). Στην περίπτωση των DCC και UNC5B , τα προαποπτωτικά σήματα μεταδίδονται μέσω μιας DRAIL- και TUCAN- πλατφόρμας με συνδεδεμένη την κασπάση-9 ή μέσω αποφωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της DAPK1 (death-associated protein kinase-1) από την UNC5B-συνδεόμενη φωσφατάση PP2A, αντίστοιχα. Η DAPK1 μπορεί να μεσολαβήσει την άμεση ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών ή να διευκολύνει την διαπερατοποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (*Galluzzi et al., 2012*).



Εικόνα Α. Εξωτερικό μονοπάτι Απόπτωσης, (*Galluzzi et al., 2012*).

Το μιτοχονδριακό (εσωτερικό) μονοπάτι (Εικόνα Β) Απόπτωσης, διακρίνεται σε κασπασο-εξαρτώμενο και κασπασο-ανεξάρτητο μονοπάτι. Όταν σήματα θανάτου υπερσχύουν λαμβάνει χώρα διαπερατοποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP) και οδηγεί σε διάχυση του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\psi_m$), αναστολή σύνθεσης ATP και $\Delta\psi_m$ - εξαρτώμενες μεταφορικές δραστηριότητες. Επιπλέον, υπερπαράγονται δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και πρωτεΐνες που φυσιολογικά διαμένουν στον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο (IMS) δραπέτεύουν στο κυττασόλιο. Ανάμεσα σε αυτές, το κυτόχρωμα c- μαζί με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη προσαρμογέα APAF1 και dATP - συνιστούν το αποπτόσωμα, ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που πυροδοτεί τον πρωτεολυτικό καταρράκτη κασπάση-9 → κασπάση-3. Η άμεση δράση των πρωτεϊνών DIABLO/SMAC και HTRA2 διευκολύνουν την ενεργοποίηση κασπασών αποικοδομώντας πολλά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών αναστολέων (IAPs) της απόπτωσης. Αντιθέτως, ο παράγοντας επαγωγής απόπτωσης (AIF) και η ενδονουκλεάση G (ENDOG) λειτουργούν με έναν κασπασο-ανεξάρτητο τρόπο καθώς μετατοπίζονται στον πυρήνα και διαμεσολαβούν την μεγάλης κλίμακας κλασματοποίηση του DNA. Σημειώνεται ότι η πρωτεάση σερίνης HTRA2, συνεισφέρει και στον κασπασο-ανεξάρτητο μηχανισμό απόπτωσης διασπώντας ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών υποστρωμάτων(όπως πρωτεΐνες κυτταροσκελετού).



Εικόνα Β. Το εσωτερικό (μιτοχονδριακό) μονοπάτι της Απόπτωσης, (Galluzzi et al., 2012).

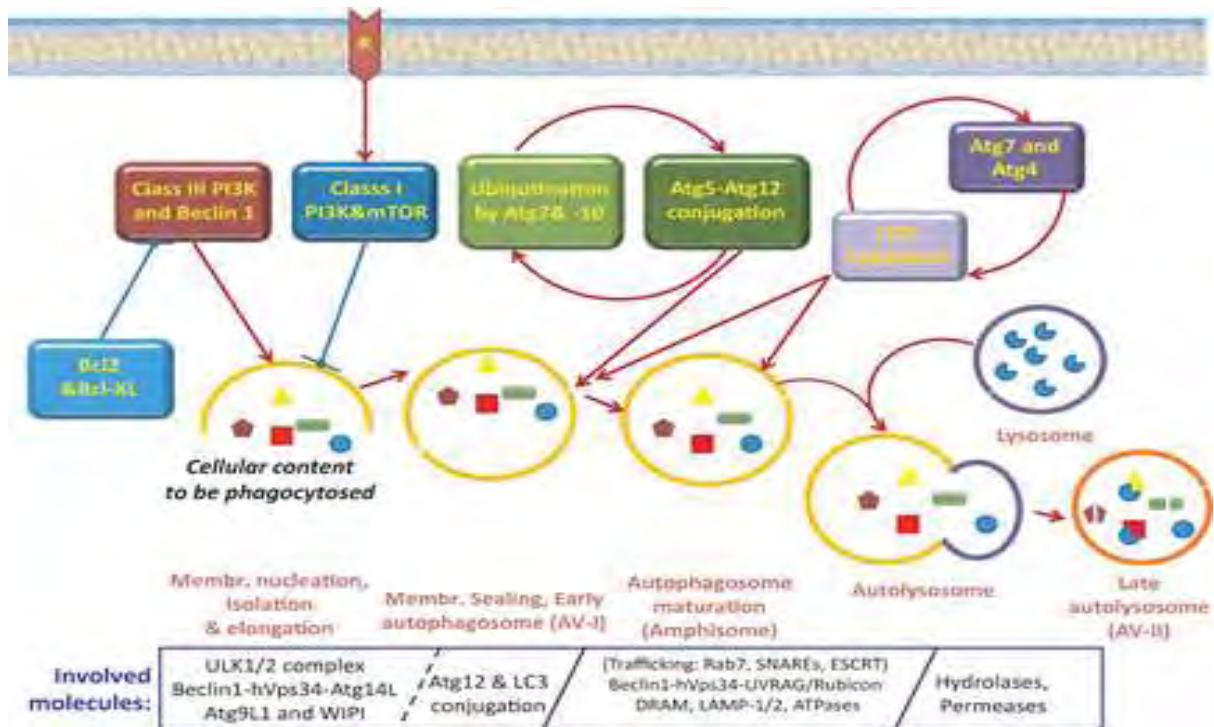
➤ Νέκρωση

Μέχρι πρότινος η Νέκρωση, χαρακτηριζόταν ως μια οξεία, μη ελεγχόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου που συναντάται κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις (*Proskuryakov et al., 2003*). Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι, η νέκρωση συμβαίνει με ένα ρυθμιζόμενο τρόπο. Η Poly(ADP) ριβοσυλίωση φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο . Ανάμεσα στους στόχους της PARP(Poly(ADP-ribose) polymerase) είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στα σημεία ελέγχου για βλάβες του DNA, συμπεριλαμβανομένων των p53, p21(waf1), XPA (xeroderma pigmentosum group A), DNA ligase III, DNA polymerase-ε, DNA-PK, Ku70, NF-kB. Εξαιτίας του υψηλού αρνητικού φορτίου των ADP-ribose πολυμερών, οι πολυ-ADP-ριβοζυλιωμένες πρωτεΐνες χάνουν την συγγένειά τους με το επίσης αρνητικά φορτισμένο DNA, και συνεπώς χάνουν τον βιολογικό τους ρόλο. Αναφορικά με τις PARP πρωτεΐνες, είναι γνωστό ότι η διάσπασή τους από τις κασπάσες προωθεί την απόπτωση καθώς αποδυναμώνεται η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA και διευκολύνεται η πρόσβαση ενδονουκλεασών στην απροστάτευτη χρωματίνη. Η αναστολή των κασπασών αποτελεί <<διακόπτη>> που αποτρέπει την απόπτωση και προάγει την νέκρωση, (*Surova and Zhivotovsky, 2013*) .

➤ Αυτοφαγία

Είναι μια συντηρημένη εξελικτικά διαδικασία λυσοσωματικής αποικοδόμησης του κυτταροπλασματικού περιεχομένου των ευκαρυωτών, η οποία ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες “πείνας” (starvation) για το κύτταρο, αλλά και κατά την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση. Ωστόσο, εκτεταμένη αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο του κυττάρου . Κατά τη διαδικασία της αυτοφαγίας, τμήματα του κυτταροπλάσματος εγκλείονται από μια δομή διπλής μεμβράνης, αυτοφαγόσωμα, το οποίο στη συνέχεια συντήκεται με λυοσώματα, στα οποία μεταφέρονται τα περιεχόμενα του αυτοφαγοσώματος, και ακολουθεί η υδρόλυσή τους από τις υδρολάσες των λυοσωμάτων, (*Levine and Klionsky, 2004*).

Η πρόσφατη ανακάλυψη μιας ομάδας γονιδίων σχετιζόμενων με την αυτοφαγία, Autophagy(ATG)-related genes, στο μηχανισμό αυτοφαγίας της ζύμης, επιτάχυνε την αποσαφήνιση των μοριακών γεγονότων που διέπουν την αυτοφαγία (*Mayur V.Jain et al., 2013*).



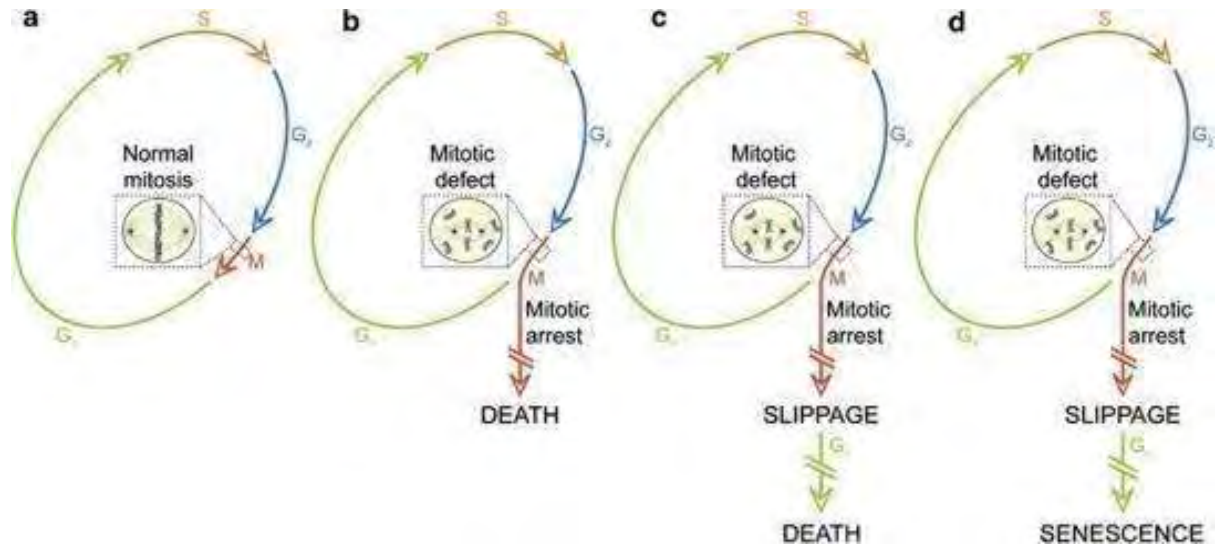
Εικόνα Γ. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων και μοριακών γεγονότων της Αυτοφαγίας, (Mayur V.Jain et al.,2013).

➤ Κυτταρική γήρανση

Αποτελεί φυσικό επακόλουθο των μη επιδιορθώσιμων DNA βλαβών, και χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη κυτταρική αναστολή στην εναρκτήρια (G1) φάση του κυτταρικού κύκλου. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, η πρωτεΐνη p53 παίζει καίριο ρόλο στην έναρξη της απόκρισης των κυττάρων έναντι DNA βλαβών οδηγώντας σε γήρανση. Για την καθιέρωση της γήρανσης, ένας από τους βασικούς στόχους της p53 η πρωτεΐνη p21(waf1/cip1) αναστέλλει ένα ευρύ φάσμα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η υποφωσφορυλιωμένη μορφή της pRb προσδένεται στο μεταγραφικό παράγοντα E2F εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που προωθούν τη μετάβαση G1/S. Ένας δεύτερος μηχανισμός (μονοπάτι p16-pRb) που οδηγεί σε γήρανση αλλά είναι μη αναστρέψιμος αφορά την υπερέκφραση (έως και 40πλάσια) του mRNA της p16. Η p16 φαίνεται να δημιουργεί σύμπλοκα με τις CDK4 και CDK6 κινάσες. Κύτταρα που δεσμεύονται στο μονοπάτι p16- pRb δεν μπορούν να μουν ξανά στον κύκλο της ανάπτυξης ακόμα και μετά την απενεργοποίηση των p53, pRb, p16, (O Surova and B Zhivotovsky, 2013).

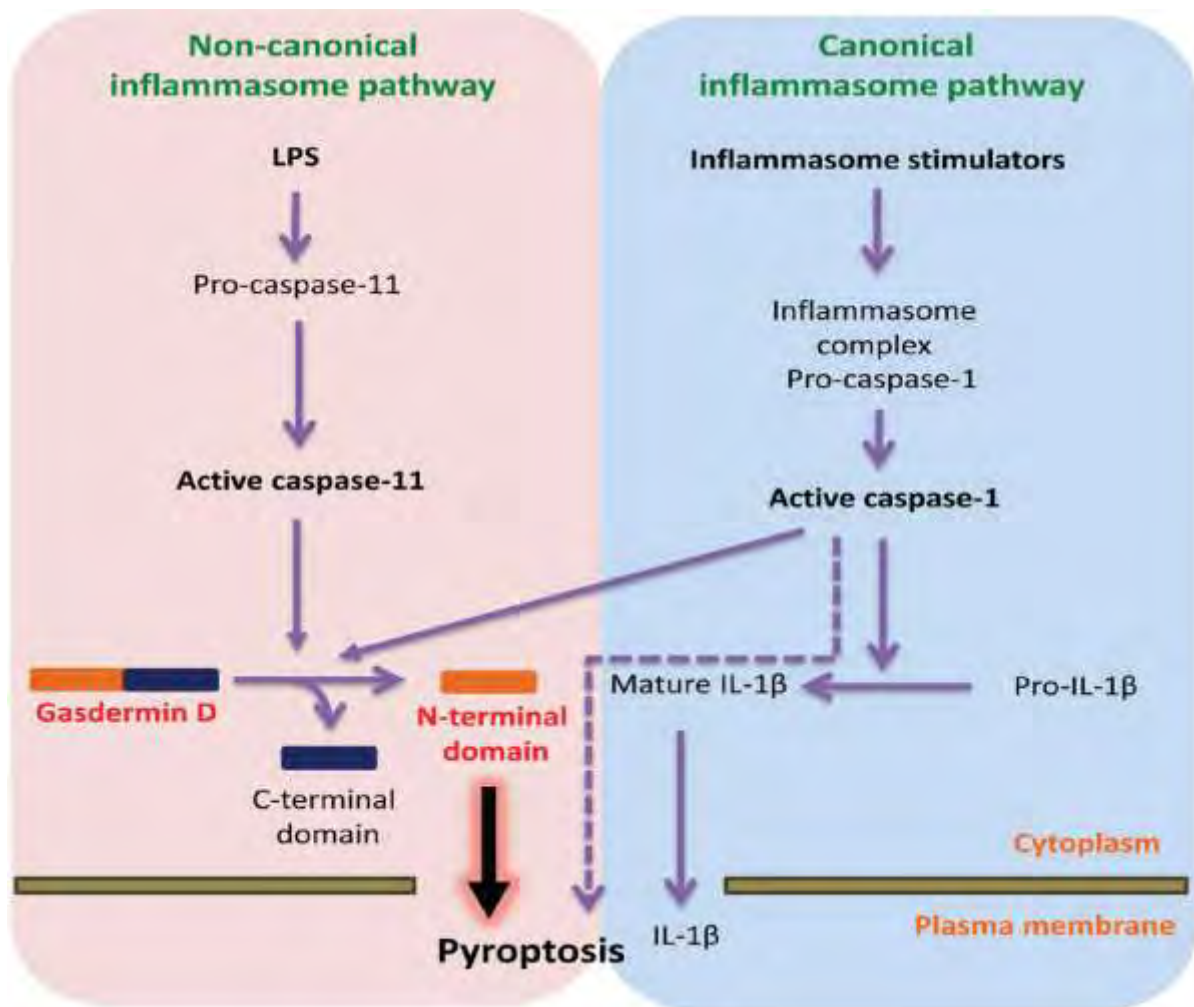
➤ Μιτωτική καταστροφή

Είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από ανώμαλη μίτωση μετά την πρόκληση βλάβης στο DNA και συνδέεται με αναποτελεσματικότητα των μηχανισμών ελέγχου του κυττάρου. Χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη στάση στη G₂/M με αποτέλεσμα τη δημιουργία γιγαντιαίων, πολυπύρηνων κυττάρων. Πρόσφατα προτάθηκε ότι η μιτωτική καταστροφή συνιστά ένα ογκοκατασταλτικό μονοπάτι που λειτουργεί διαμέσου κυτταρικού θανάτου ή κυτταρικής γήρανσης, (*Galluzzi et al., 2012*), (Εικόνα Δ):



➤ Πυρόπτωση

Ο όρος “πυρόπτωση” προτάθηκε το 2000 από τους Brennan και Cookson για να περιγράψουν λειτουργικά τον ιδιόμορφο θάνατο των μακροφάγων μολυσμένων από *Salmonella typhimurium*. Ωστόσο, η πυρόπτωση δεν πυροδοτείται μόνο από βακτηριακή μόλυνση (*Galluzzi et al., 2012*). Εξ ορισμού, η πυρόπτωση αποτελεί μορφή φλεγμονώδους κυτταρικού θανάτου (ή προγραμματισμένης νέκρωσης), μεσολαβούμενου από φλεγμονώδεις κασπάσες. Έχουν προταθεί δυο μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στην πυρόπτωση: το μονοπάτι κανονικού φλεγμονωδοσώματος (canonical inflammasome pathway), (*Shalini S. et al., 2015*), και το μονοπάτι μη κανονικής ενεργοποίησης του φλεγμονωδοσώματος (non-canonical inflammasome pathway), τα οποία συγκλίνουν στην διάσπαση της πρωτεΐνης gasdermin D (GSDMD), το N- τελικό προϊόν της οποίας οδηγεί τελικά στην πυρόπτωση (*Shi J. et al., 2015 ; Kayagaki N. et al., 2015*).



Εικόνα Ε. Τα δυο μοριακά μονοπάτια της πυρόπτωσης, (*Lim and Kumar* , 2015).

Δ. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ασθένειες των τελευταίων χρόνων, γεγονός που επιβάλλει την ανεύρεση τρόπων έγκαιρης πρόγνωσης αλλά και αντιμετώπισής του. Νέα φάρμακα δοκιμάζονται συνεχώς, τα οποία ανήκουν κυρίως σε τρεις κατηγορίες : χημειοθεραπευτικά, ορμονικής θεραπείας και ανοσοθεραπείας. Τα φάρμακα αυτά μπορεί να κατευθύνουν τη δράση τους τόσο στα κύτταρα του όγκου, όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα ή την εξωκυττάρια ύλη, με στόχους τους το DNA, RNA ή ακόμα και πρωτεΐνες. Στόχος της όποιας αντικαρκινικής θεραπείας, είναι η πρόκληση θανάτου και μάλιστα αποπτωτικού, αφού η απόπτωση είναι μια ήπια μορφή κυτταρικού θανάτου όπου όλα τα νεκρά κύτταρα τελικά απομακρύνονται ταχύτατα με τη μορφή φαγοσωμάτων από γειτονικά μακροφάγα, προστατεύοντας έτσι τους

παρακείμενους ιστούς από πιθανές φλεγμονές και άλλες καταστροφικές αλλοιώσεις. Έτσι η απόπτωση αποτελεί κατά κύριο λόγο επιθυμητό στόχο αλλά και δείκτη αποτελεσματικής δράσης των χημειοθεραπευτικών σχημάτων.

Η παραδοσιακή χημειοθεραπεία προσπαθεί να θανατώσει τα καρκινικά κύτταρα βασιζόμενη στην ιδιότητά τους να πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό. Η προσέγγιση αυτή έχει πολλές παρενέργειες, επειδή βλάπτει εξίσου τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα φυσιολογικά κύτταρα. Παράλληλα, υπάρχει επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης νέων στρατηγικών προσεγγίσεων και φαρμακευτικών παραγόντων για την αντιμετώπιση της αντίστασης στην χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία που παρατηρείται σε ορισμένους καρκίνους. Ο ιδεατός στόχος είναι η ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν και ανθίστανται στις συμβατικές θεραπείες, (*Pandey M.K. et al., 2016*).

Τα τελευταία χρόνια έγιναν τεράστια άλματα στο χώρο της ογκολογίας αφού προστέθηκαν στη φαρέτρα των ογκολόγων ειδικά και έξυπνα φάρμακα - βιολογικά μόρια που εντάσσονται στον όρο στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Η στοχευμένη θεραπεία είναι ένα από τα σημαντικότερα πεδία της σύγχρονης «μεταφραστικής έρευνας». Συγκεκριμένα, αποσκοπεί στη χορήγηση βιοδραστικών παραγόντων (κυρίως μικρών μορίων ή μονοκλωνικών αντισωμάτων) που παρεμποδίζουν τη δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη όγκων. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της στοχευμένης θεραπείας είναι ότι για να είναι δραστικά τα φάρμακα θα πρέπει να υπάρχει ο βιολογικός στόχος (ένα γονίδιο ή μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη) αλλιώς στερούνται δραστικότητας. Η εκλεκτικότητα που δείχνουν αυτά τα φάρμακα για ένα συγκεκριμένο στόχο που εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα τα κάνει να στερούνται παρενεργειών, (*Baig S. et al., 2015 ; Pandey M.K. et al., 2016*).

E. ΕΝΕΡΓΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

Στον τομέα της έρευνας για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι πολύ σημαντική η βελτίωση της δράσης ήδη γνωστών βιοδραστικών μορίων μέσω της χρήσης νέων φαρμακοτεχνικών μορφών. Φαρμακοτεχνικές μορφές στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων που βασίζονται σε νέες τεχνολογίες, όπως η νανοτεχνολογία, αποτελούν για τη φαρμακευτική βιομηχανία στρατηγικό εργαλείο ανάπτυξης. Η ιδέα της επιλεκτικής απελευθέρωσης φαρμάκων στο σημείο δράσεως τους εισήχθη για πρώτη φορά από τον Paul Ehrlich στις αρχές του 20ου αιώνα (*Lavasanifar et al., 2002, Ehrlich et al., 1909*).

Πρότεινε, ένα είδος «Μαγικής Σφαίρας», δηλ. φορείς με ιδιαίτερη συγγένεια προς ορισμένα όργανα, ιστούς ή κύτταρα. Από τότε έχουν αναπτυχθεί πολλά μακρομοριακά συστήματα εγκλωβισμού και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων όπως λιποσώματα, νανοσωματίδια, υπερδιακλαδισμένα πολυμερή (δενδριμερή) (*Fuchs et al., 2004; Michas-Screttas et al., 2008*). Ιδιαίτερο ερευνητικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη συστημάτων εγκλωβισμού χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και ελεγχόμενης-στοχευμένης αποδέσμευσης αυτών στους καρκινικούς ιστούς σε μία προσπάθεια αποφυγής παρενεργειών από την προσβολή των υγιών ιστών, (*Malam et al., 2009 ; Yallapu M.M. et al., 2010*).

Τα μικρογαλακτώματα (microemulsions) είναι κινητικά σταθερά, μείγματα ελαίου, νερού σταθεροποιημένα από επιφανειοενεργές ουσίες. Η επίτευξη της μικροδιασποράς μπορεί να γίνει αυθόρμητα λόγω της θερμοδυναμικής σταθερότητας του τελικού συστήματος, (*Fanun et al., 2008*). Τα μικρογαλακτώματα είναι γενικά χαμηλού ιξώδους και έχουν μεγάλη ικανότητα διαλυτοποίησης διαφόρων ενώσεων. Συνήθως το μέγεθος των διεσπαρμένων σωματιδίων κυμαίνεται από 20 έως 200 nm. Ανάλογα με τη φύση και τη χημική αναλογία των συστατικών, τα μικρο-γαλακτώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους, δηλαδή σε νερό-σε-έλαιο (w/o), έλαιο-σε-νερό (o/w) και δι-συνεχείς διασπορές. Το πολύ μικρό μέγεθος των σταγονιδίων (droplets) των μικρο-γαλακτωμάτων τα καθιστά ανθεκτικά στη φυσική αποσταθεροποίηση, κροκίδωση και αποκορύφωση (*Particle Sciences, 2011*). Η συνύπαρξη υδατοδιαλυτών, λιποδιαλυτών και αμφίφιλων συστατικών σε ένα μακροσκοπικά ομοιογενές διάλυμα επιτρέπει τη διαλυτοποίηση - εγκλωβισμό σε αυτό ενός ευρέως φάσματος ουσιών. Ως εκ τούτου θα μπορούσαν τα μικρογαλακτώματα να αποτελέσουν φορείς βιοδραστικών μορίων με διαφορετική υδροφιλικότητα (*Solans et al., 2005; Mason et al., 2006; Gutierrez et al., 2008*).

I. Μικρογαλακτώματα ως οχήματα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων

Τα μικρογαλακτώματα εμφανίζουν μεγάλη αποτελεσματικότητα στην υποβοηθούμενη μεταφορά των εγκλωβισμένων δραστικών ουσιών μέσω των βιολογικών μεμβρανών (*Zoupanioti et al., 2004; Shima et al., 1981*).

Για να αναπτυχθούν σταθερά μικρογαλακτώματα κατάλληλα για να θεωρηθούν ως φορείς των βιοδραστικών ουσιών, όλα τα συστατικά του μικρογαλακτώματος πρέπει να είναι βιοσυμβατά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν έλαια διαφορετικής προέλευσης: φυτικά έλαια όπως το ελαιόλαδο, αιθέρια έλαια, όπως λιμονένιο και έλαιο μέντας, μεσαίου μήκους αλυσίδας τριγλυκερίδια όπως αυτά με καπρυλικό/καπροϊκό/ελαϊκό ή και λινελαϊκό οξέα, αλλά και μείγματα από αυτά τα έλαια σε διαφορετικές αναλογίες. Επιφανειοενεργές ουσίες αποδεκτές φαρμακευτικά, μπορεί να είναι είτε τα φυσικά

φωσφολιπίδια, όπως η λεκιθίνη κύριο συστατικό των βιολογικών μεμβρανών, τα μονοακκυλο γλυκερίδια, όπως στεατικό μονογλυκερίδιο, οι εστέρες ζαχάρων, όπως εστέρες σορβιτόλης, αλλά και μείγματα αυτών των επιφανειοενεργών σε διαφορετικές αναλογίες ανάμιξης. Για να μειωθεί η πολικότητα της υδατικής φάσης και να διευκολυνθεί η διαμόρφωση των νανογαλακτωμάτων, μπορεί να προστεθεί γλυκερόλη ή προπυλενογλυκόλη. Τα συστήματα χαρακτηρίζονται δομικά με χρήση των ακόλουθων τεχνικών: α) Φθορισμού, β) Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) και γ) Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός (DLS).

II. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά μικρογαλακτωμάτων

Τα μικρογαλακτώματα διαθέτουν ποικίλα ενδιαφέροντα πλεονεκτήματα όπως, ενισχυμένη διαλυτοποίηση φαρμάκων, βιοδιαθεσιμότητα, είναι θερμοδυναμικά σταθερά, είναι διάφανα και εύκολα στην παρασκευή.

Για τη διαλυτοποίηση και κατόπιν διασπορά υδρόφιλων ουσιών σε ένα σύστημα που χαρακτηρίζεται από μικρή περιεκτικότητα νερού και υψηλή ελαίου (w/o), ακολουθείται η πιο κάτω διαδικασία. Αρχικά, η υδρόφιλη ουσία αναμειγνύεται με την υδατική φάση και στη συνέχεια θα αναμιχθεί με μίγμα ελαίου/επιφανειοενεργού προς επίτευξη μικρογαλακτώματος (w/o) επιθυμητής σύστασης. Για τη διαλυτοποίηση και διασπορά υδρόφοβων ουσιών σε ένα σύστημα που χαρακτηρίζεται από μικρή περιεκτικότητα ελαίου και υψηλή νερού (o/w), επιχειρείται η ακόλουθη διαδικασία. Αρχικά, η υδρόφοβη ουσία αναμειγνύεται με τον κατάλληλο λιπόφιλο διαλύτη ή μίγματα αυτών ή μίγματα διαλύτη με επιφανειοενεργά προς δημιουργία διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια θα προστεθεί βαθμιδών υδατική φάση ώστε να σχηματιστεί μικρο-γαλάκτωμα (o/w), (*Fanun et al., 2008*).

Η βελτιστοποίηση της διαλυτοποίησης των ελάχιστα υδατοδιαλυτών φαρμάκων σε φαρμακολογικές δόσεις δυσχεραίνεται εξαιτίας του σημαντικού περιορισμού στην επιλογή των κατάλληλων διαλυτών για per os (oral), παρεντερική ή τοπική χρήση. Η τέλεια διασπαρμένη διαμόρφωση των ελαιωδών σταγόνων (oil droplets) των o/w μικρογαλακτωμάτων προσφέρει ένα υποψήφιο σύστημα διαλυτοποίησης των φαρμάκων. Το γεγονός ότι τα μικρογαλακτώματα είναι διάφανα καθιστά εφικτή τη παρατήρηση μη διαλυμένου φαρμάκου καθώς επίσης και την εξωτερική τοπική χρήση τους. Τα μικρογαλακτώματα αποτελούν λόγω των προαναφερθέντων ιδιοτήτων τους πολλά υποσχόμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και άλλων βιοδραστικών ουσιών. Πρόσφατα, προτάθηκαν ως φορείς για στοματική χορήγηση πεπτιδικής/ πρωτεϊνικής σύστασης φαρμάκων (*Karasulu et al., 2008*).

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στο πλαίσιο του έργου του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών ΣΘΕΝΟΣ : Στοχευμένες Θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά εκφυλιστικών ΝΟΣημάτων, με έμφαση τον καρκίνο και τη γήρανση (ΕΠΑΝΠ, Δράση « ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ- ΚΡΗΠΙΣ»). Επειδή ένας εκ των βασικών στόχων του έργου ήταν η ανάπτυξη αναστολέων της ογκοπρωτεΐνης BRAFV600E, σχεδιάστηκε από την ομάδα Φαρμακευτικής Χημείας του ΙΒΦΧΒ-ΕΙΕ (Δρ. Δ. Παπαχατζής) η ένωση DPBRAF2 (αμφίφιλο, μη εκειδικευμένος αναστολέας της BRAFV600E), η δράση της οποίας μελετάται παράλληλα με τη δράση της ένωσης PLX4720 (ανάλογο του ειδικού αναστολέα της BRAFV600E Vemurafenib, αναστολέας τύπου I, λιπόφιλο). Το Vemurafenib (PLX4032), ένα αζα-ινδόλιο το οποίο φέρει την φαρμακοφόρο ομάδα διφθορο-φαινυλοσουλφοναμιδο, αναστέλλει την δράση της κινάσης ERK σε μία ομάδα κυτταρικών σειρών μελανώματος μόνο στα κύτταρα τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη V600E.

Με βάση τα παραπάνω, πρωταρχικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αποτίμηση της αντιμιτωτικής – κυτταροτοξικής δράσης των προαναφερθέντων ενώσεων, εν δυνάμει αναστολέων της BRAFV600E, PLX4720 και DPBRAF2 στην κυτταρική σειρά μελανώματος WM164. Σε μια προσπάθεια να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή βιοδραστικότητα με τη χρήση των μικρότερων δυνατών συγκεντρώσεων, οι νέες ενώσεις εγκλωβίστηκαν σε μικρογαλακτώματα, που επιλέχθηκαν μετά από σχετικές μελέτες ως κατάλληλοι φορείς βιοδραστικών ουσιών. Μετά την *in vitro* χορήγησή τους στα κύτταρα μελανώματος διερευνήθηκαν ο βαθμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (MTT Assay) και η επαγωγή κυτταρικού θανάτου (Trypan Blue). Η επίδραση του λιπόφιλου αναλόγου του ειδικού αναστολέα της BRAFV600E Vemurafenib PLX4720 στην επαγωγή απόπτωσης (πρωτεόλυση της PARP-1) καθώς και στο σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης MAPK (προσδιορισμός των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK) διερευνήθηκε περαιτέρω.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

➤ **Κατάλογος γημικών**

- Υλικά κυτταροκαλλιέργειας: θρυσίνη 2.5%, 10X (GIBCO,15090-046), θρεπτικά μέσα DMEM (GIBCO,41966), MEM NEAA 100X (GIBCO,11140-035), PBS pH 7.2, 10X (GIBCO,70013-016), FBS (GIBCO,10270), πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (GIBCO, 15140-122).
- Trypan Blue (Sigma - Aldrich , T8154)
- MTT (Sigma - Aldrich , M5655)
- DMSO (Sigma - Aldrich , D8418)
- RIPA Lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, sc- 24948)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD,161-0406)
- TEMED (MP Biomedicals,LLC, CAT.NO.805615)
- APS (SIGMA, A9164-100G)

➤ **Κυτταρικές σειρές**

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθρώπινης προέλευσης καρκινική σειρά μελανώματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μεταστατική κυτταρική σειρά WM164 (Wistar Institute: www.wistar.org) που ανήκει παθολογικά σε οζώδες κακοήθες μελάνωμα (nodular melanoma).

Η μεταστατική σειρά WM164 διαθέτει την συγκεκριμένη μετάλλαξη V600E (Val 600 Glu) στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου της κινάσης BRAF. Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε μόνιμα ενεργή δραστικότητα κινάσης BRAF και συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης MEK/ERK. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μελανώματος έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε το γονίδιο TP53 να είναι μεταλλαγμένο (p53^{null}).

➤ **Σύσταση μικρογαλακτώματος (m/e) εισαγωγής σε κυτταροκαλλιέργειες WM164**

- Σύστημα o/w (oil in water) μικρογαλακτώματος (m/e):
 - 81,54 % (w/w) PBS buffer 1X (aqueous phase / υδατική φάση / συνεχής φάση)
 - 10,59 % (w/w) Tween 80 (surfactant / επιφανειοδραστικός παράγοντας)
 - 7,87 % (w/w) Triacetin (oil phase / λιπαρή φάση / διεσπαρμένη φάση)

Το παραπάνω σύστημα μικρογαλακτώματος o/w είναι ανεκτό/ όχι τοξικό σε συγκέντρωση 0,2 % στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων WM164. Χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο εισαγωγής σε κύτταρα WM164 είτε αυτούσιο (m/e 0,2% empty) είτε με

εγκλεισμό στην διεσπαρμένη φάση μιας εκ των ακόλουθων βιοδραστικών ουσιών : PLX4720 (λιπόφιλο φάρμακο) ή σκουαλένιο (λιπόφιλο αντιοξειδωτικό).

Η συγκέντρωση του PLX4720 (MW: 413,83 gr/mol) στο μικρογαλάκτωμα ήταν $31,5 \times 10^{-6}$ M και στο θεραπευτικό υλικό $0,63 \times 10^{-7}$ M. Αντίστοιχα για το σκουαλένιο η συγκέντρωση στο μικρογαλάκτωμα ήταν $0,94 \times 10^{-3}$ M και στο θεραπευτικό υλικό $1,88 \times 10^{-6}$ M.

- Σύστημα w/o (water in oil) μικρογαλακτώματος (m/e), (Chatzidaki et al.,2015):
 - 93,1 % (w/w) MCT (medium chain triglyceride), (oil phase/ συνεχής φάση)
 - 4,9 % (w/w) λεκιθίνη + DMG (μονογλυκερίδια), (3:2 ratio of surfactants)
 - 2% (w/w) aqueous phase (30% προπυλενογλυκόλη σε απεσταγμένο νερό)

Το παραπάνω σύστημα μικρογαλακτώματος χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 2% και 5% στο θεραπευτικό μέσο των κυττάρων WM164. Χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο εισαγωγής σε κύτταρα WM164 είτε αυτούσιο (m/e 2% ή 5% empty) είτε με εγκλεισμό της αμφίφιλης ουσίας DPBRA2. Για το DPBRA2 (MW:503,65gr/mol) η συγκέντρωση στο μικρογαλάκτωμα ήταν $0,1 \times 10^{-3}$ M και στο θεραπευτικό υλικό 5×10^{-6} M.

➤ **Καλλιέργεια κυττάρων**

Τα κύτταρα WM164 καλλιεργήθηκαν σε θεραπευτικό υλικό DMEM. Το διάλυμα DMEM που περιέχει L-γλουταμίνη, γλυκόζη, πυροσταφιλικό οξύ και πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10% ορού νεογνού βοός (FBS) και 1% αντιβιοτικών (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη), ενώ η επώαση έγινε σε επωαστικό θάλαμο με 5% CO₂, στους 37°C.

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του φιαλιδίου καλλιέργειας (T₂₅/T₇₅ flasks, 6-well plates) γίνεται με θρυψινοποίηση. Αρχικά τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS (1-5 ml ανάλογα με την επιφάνεια που καλλιεργούνται) και στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης (0.25% σε PBS) (0,5-2ml ανάλογα με την επιφάνεια) η οποία υδρολύει τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του φιαλιδίου, σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης.

➤ **Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων**

Το υπερκείμενο των φιαλιδίων καλλιέργειας, συλλέγεται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου κατάλληλης χωρητικότητας. Τα κύτταρα που παραμένουν προσκολλημένα στην επιφάνεια, ξεπλένονται με PBS το οποίο προστίθεται επίσης στο σωλήνα φυγοκέντρου. Στην συνέχεια πραγματοποιείται θρυψινοποίηση

προσθήκη 0.5-2ml θρυψίνης (ανάλογα με το μέγεθος του φιαλιδίου στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα). Η δράση της θρυψίνης διακόπτεται με προσθήκη θρεπτικού υλικού και το συνολικό διάλυμα κυττάρων-θρυψίνης μεταφέρεται στο σωλήνα φυγοκέντρου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800-2000 στροφές/λεπτό για 10'. Το υπερκείμενο αναρροφάται και ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Από το παραπάνω διάλυμα λαμβάνεται μικρή ποσότητα ~ 50μl προκειμένου να γίνει η μέτρηση σε ειδική πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο).

➤ **Προσδιορισμός του ποσοστού νεκρών κυττάρων με Trypan Blue**

Για την συλλογή των κυττάρων ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως (βλ.μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων). Χωρίς να γίνει φυγοκέντρηση, λαμβάνονται 200 μl από το φιαλίδιο που περιέχει τα θρυψινοποιημένα κύτταρα και αναμιγνύονται με 200 μl διαλύματος Trypan Blue (0.4%), προκειμένου να γίνει η χρώση των νεκρών κυττάρων στα οποία και έχει ήδη πραγματοποιηθεί η διάρρηξη της μεμβράνης τους. Μετά από ~10 λεπτά, λαμβάνεται μικρή ποσότητα ~50μl και γίνεται η καταμέτρηση τόσο του συνόλου των κυττάρων, όσο και των νεκρών στα οποία έχει πραγματοποιηθεί η χρώση.

Το % ποσοστό των νεκρών κυττάρων, ορίζεται ως ο αριθμός των νεκρών κυττάρων ως προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων (αριθμός νεκρών κυττάρων/αριθμός νεκρών+ζωντανών κυττάρων x 100).

➤ **Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με MTT ανάλυση**

Το MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl Blue) είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας το οποίο παράγει ένα κιτρινώχρουν διάλυμα όταν παρασκευαστεί σε θρεπτικό μέσο ή διάλυμα από όπου απουσιάζει η χρωστική ερυθρό της φαινόλης (phenol red).

Το διαλυμένο MTT μετατρέπεται σε αδιάλυτο ιώδες φορμαζάνιο λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από συγκεκριμένα ένζυμα, τις διυδρογενάσες. Αυτό το αδιάλυτο στο νερό φορμαζάνιο, μπορεί να διαλυτοποιηθεί χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή άλλους οργανικούς διαλύτες και να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής.

Οι ενεργές μιτοχονδριακές διυδρογενάσες των ζωντανών κυττάρων προκαλούν την μετατροπή του κιτρινώχρουν MTT σε ιώδες φορμαζάνιο, ενώ τα νεκρά κύτταρα δεν προκαλούν αυτή την αλλαγή.

Έτσι, μπορούμε να προσδιορίσουμε την επίδραση κάποιου παράγοντα (π.χ. μεθυλιωτικού) στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και άρα να αποτιμήσουμε την κυτταροτοξικότητά του.

Ακολουθείται η διαδικασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας (Sigma-Aldrich; M5655). Η % βιωσιμότητα για κάθε σημείο προκύπτει από τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις.

➤ **Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών**

Για την παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε το RIPA Lysis Buffer της εταιρείας Santa Cruz. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής : το ίζημα των κυττάρων πλένεται με PBS και φυγοκεντρείται στους 4⁰ C στις 1800 στροφές/λεπτό. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται : 100μl RIPA buffer, 1 μl ορθοβαναδικό νάτριο (1mM) ,1 μl PMSF (2mM) και 1 μl μείγματος αναστολέων των πρωτεασών (protease inhibitor cocktail) / 2x10⁶ κύτταρα . Γίνεται ήπια επαναιώρηση και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά, με ήπια ανάμειξη κάθε 10'. Στη συνέχεια γίνεται ισχυρή ανάδευση με vortex για 1-2 λεπτά και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά , με ανάμειξη κάθε 10'. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4⁰C , στις 10.000 στροφές/λεπτό για 10'. Το υπερκείμενο που περιέχει το ολικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα τύπου erpendorf.

➤ **Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών**

Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford (*Bradford, 1976*) η οποία είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικροποσοτήτων πρωτεΐνης. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι η Coomassie Brilliant Blue G-250 μπορεί να βρεθεί σε δύο χρωματικές καταστάσεις την κόκκινη και την μπλε. Η κόκκινη μορφή μετατρέπεται στην μπλε όταν η χρωστική ενωθεί με την πρωτεΐνη. Η μέθοδος είναι γρήγορη, αναπαραγώγιμη και δεν επηρεάζεται από ιόντα π.χ. Na⁺ ή K⁺, υδατάνθρακες όπως η σουκρόζη. Η ένωση χρωστικής και πρωτεΐνης έχει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm.

➤ **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS/PAGE)**

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο Mini-PROTEAN 3 Cell Instruction Manual της BIO-RAD. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος , εφόσον γίνεται χρήση SDS (sodium dodecyl sulfate), το οποίο είναι ένα

αρνητικά φορτισμένο ιονικό απορρυπαντικό. Το SDS δεσμεύεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνικών μορίων με σταθερή αναλογία βάρους (1,4 gr SDS ανά gr πρωτεΐνης), ανεξάρτητα από την πρωτεϊνική αλληλουχία και προκαλεί το ξεδίπλωμα τους. Έτσι τα πρωτεϊνικά μόρια αποσυνδέονται από άλλες πρωτεΐνες ή λιπίδια και γίνονται υδατοδιαλυτά. Οι πρωτεΐνες με την διαδικασία αυτή φορτίζονται αρνητικά και έτσι η κινητικότητα τους είναι ανάλογη μόνο του μοριακού τους βάρους.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα, αναδιαλύονται σε αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer) το οποίο περιέχει 50μM Tris-HCl pH 6,8, 5M β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 10% γλυκερόλη και επωάζονται για 10' στους 95°C. Ακολουθεί ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε κάθετο ασυνεχές πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου, το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα διαφορετικού pH και συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου: το πήκτωμα συμπύκνωσης (επάνω τμήμα) και το πήκτωμα διαχωρισμού.

Στο πήκτωμα συμπύκνωσης επιτυγχάνεται η συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μια λεπτή στιβάδα. Η σύστασή του είναι η εξής : 0,125mM Tris-HCl pH 6,8, 4% ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο, 0,1% SDS, 0,07% υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 0,07% τετρα-μεθυλεθυλενεδιαμίνη (TEMED).

Στο πήκτωμα διαχωρισμού γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η σύστασή του είναι η εξής : 0,375mM Tris-HCl pH 8,8, X % ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο, 0,1% SDS, 0,07% υπερθειικό αμμώνιο (APS) και 0,07% τετραμεθυλεθυλενεδιαμίνη (TEMED). Η περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο, καθορίζει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος και επομένως ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε, επιλέγουμε την κατάλληλη περιεκτικότητα. Πηκτώματα που έχουν περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 10% έχουν μικρούς πόρους και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού 10%.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer : 400mM γλυκίνη, 50mM Tris-HCl pH 8,9 και 0,1% SDS), υπό σταθερή τάση 150 Volts. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο, λόγω του αρνητικού φορτίου που τους έχει προσδώσει η δέσμευση του SDS. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 45', μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να φτάσει στο κάτω άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού.

➤ **Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοποίηση**

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωρισθεί στο πήκτωμα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (πόρων 0,2μm) μέσω ειδικής συσκευής υγρής μεταφοράς. Το πήκτωμα τοποθετείται προς την κάθοδο και η νιτροκυτταρίνη στην πλευρά της ανόδου. Οι πρωτεΐνες που είναι αρνητικά φορτισμένες (λόγω της δράσης του SDS) μεταφέρονται στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης καθώς κατευθύνονται προς τον θετικό πόλο. Το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) περιέχει 100ml 10X Running buffer, 200ml μεθανόλη και 700ml απιονισμένο νερό, ενώ η μεταφορά πραγματοποιείται στα 330 mA για 90'.

Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται με TBS (0,5M Tris-HCl pH 7,4, 2M NaCl) για 10'. Στη συνέχεια γίνεται επώαση της μεμβράνης υπό ήπια ανάδευση με διάλυμα Zeller (10mM Tris-HCl pH7,5 , 0,1M MgCl₂ , 5% γάλα χαμηλό σε λιπαρά, 0,5% Tween 20 , 0,1% Triton) για να γίνει μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων (2-3h). Ακολούθως η μεμβράνη επώαζεται με το πρώτο αντίσωμα (το επιλέγεται ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε) υπό ήπια ανάδευση, είτε για 90' σε θερμοκρασία δωματίου είτε κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4⁰C. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα Zeller (2x10', 1x15', 3x5') και ακολουθεί η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο επιλέγεται ανάλογα με το ζώο στο οποίο έχει παραχθεί το πρώτο αντίσωμα (για παράδειγμα αν το πρώτο προέρχεται από κουνέλι, το δεύτερο θα είναι αντίσωμα έναντι ανοσοσφίρινης κουνελιού) η οποία διαρκεί 90' σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα Zeller (2x10'1x15', 3x5') και TBS (2x10').

➤ **Εμφάνιση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος**

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανοσοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών, βασίζεται στην αρχή της χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescent Substrate). Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο της ραφανδικής υπεροξειδάσης (Horse Radish Peroxidase HRP) το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης. Κατά την οξείδωση παράγονται φωτόνια τα οποία φανερώνουν τη θέση συμπλόκου-αντιγόνου.

Γίνεται προετοιμασία δύο διαλυμάτων, εκ των οποίων το πρώτο περιέχει λουμινόλη (Luminol), κουμαρικό οξύ (Coumaric acid) και ρυθμιστικό Tris pH 8,5, ενώ το δεύτερο 30% H₂O₂ και Tris pH 8,5. Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται σε αυτά για 1'. Μετά από έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (X-ray film), ακολουθεί εμφάνιση σε σκοτεινό θάλαμο, με την

βοήθεια των κατάλληλων διαλυμάτων εμφάνισης και μονιμοποίησης (Developer και Fixer).

Στην συνέχεια είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ζωνών που εμφανίζονται στο φιλμ με τον προσδιορισμό του μεγέθους τους μετά από αντιστοίχιση τους με τις ζώνες του μάρτυρα.

Παρακάτω παρατίθενται τα αντισώματα καθώς και οι αραιώσεις με τις οποίες αυτά χρησιμοποιήθηκαν : αντι-PARP (BD Pharmingen [™] , 551025) 1: 500, αντι-cleaved PARP (Cell Signaling Technology, Asp214) 1:700, αντι-β-ακτίνη (abcam, ab8226) 1:5000, 1:10.000, αντι-pERK (Santa Cruz Biotechnology, sc-7383) 1:1000, αντι-tubulin (Santa Cruz Biotechnology) 1:5000, 1:1000, αντι-mouse Igs/HRP (Dako, P0161) 1:1000, αντι-rabbit Igs/HRP (Santa Cruz Biotechnology) 1:2500.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

❖ **Δοκιμές προσδιορισμού κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT Assay)**

→ **Σύστημα μικρογαλακτώματος ο/w** (PBS 1X **81,54%** w/w , Tween80 **10,59%** w/w, triacetin/PLX4720 **7,87%** w/w) :

Τα μικρογαλακτώματα **ελαίου-σε-νερό (ο/w)** δοκιμάστηκαν σε διάφορες αναλογίες στο θρεπτικό υλικό καρκινικών κυττάρων της σειράς **WM164** . Η βέλτιστη αναλογία του μικρογαλακτώματος στο θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα μελανώματος , προσδιορίστηκε στο **0,2%** , (η συγκεκριμένη αναλογία μικρογαλακτώματος ο/w στο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις συνθήκες των ακόλουθων πειραμάτων) .

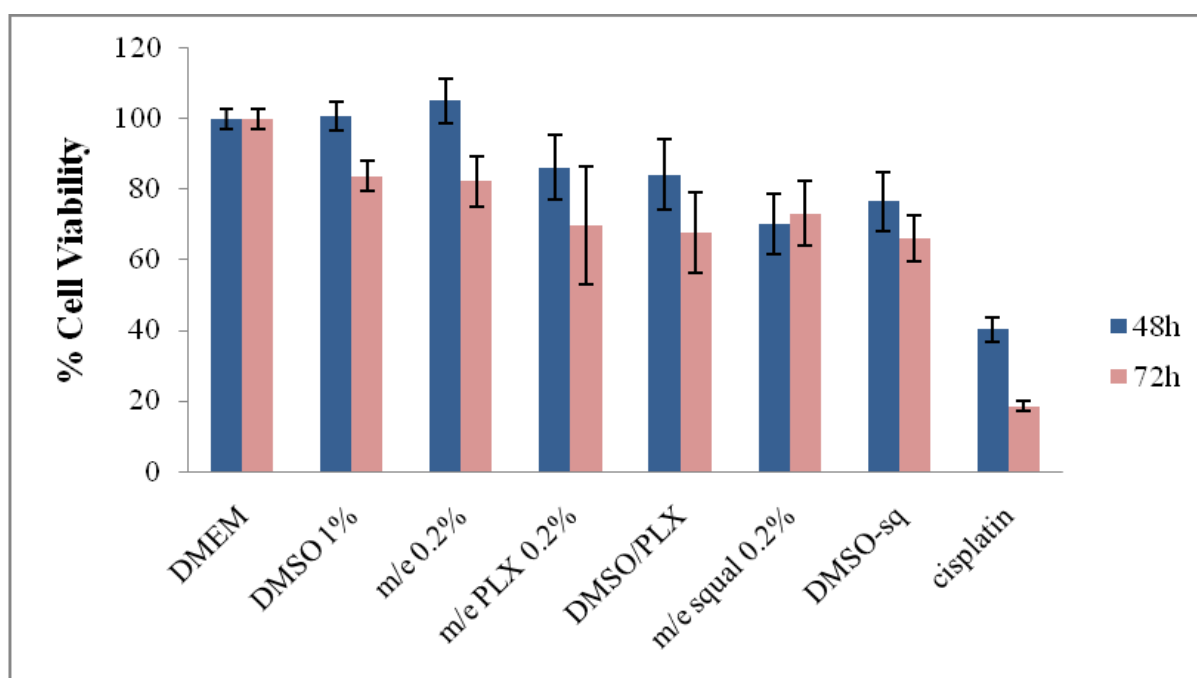
Ακολούθησαν δοκιμές προσδιορισμού κυτταρικής βιωσιμότητας με την τεχνική MTT, σε **96 well plates**, ώστε να προσδιοριστεί η ανοχή των κυττάρων WM164 κάτω από διαφορετικές συνθήκες/ αντιδραστήρια . Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων /ή αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στις **48 και 72ώρες** μετά την χορήγηση μικρογαλακτωμάτων ο/w με ενθυλακωμένες ή όχι τις βιοδραστικές ουσίες **PLX4720 και σκουαλένιο** . Η ανοχή των κυττάρων στα συστήματα αυτά συγκρίθηκε με αρνητικούς (DMEM, DMSO) και θετικούς (cisplatin) μάρτυρες. Παράλληλα, οι βιοδραστικές ενώσεις διαλύθηκαν σε DMSO και χορηγήθηκαν στα κύτταρα της καλλιέργειας (DMSO/PLX → C_{PLX} στο θρεπτικό μέσο $0,63 \times 10^{-7}$ M, DMSO/Sq → C_{Sq} στο θρεπτικό μέσο $1,88 \times 10^{-6}$ M) .

- ❑ Ο οργανικός διαλύτης DMSO αποτελεί τον πιο κοινό διαλύτη κατά την χορήγηση φαρμάκων σε κυτταροκαλλιέργειες . Με την συγκεκριμένη συνθήκη, συγκρίνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος ο/w ως φορέας φαρμάκων σε σχέση με τον πλέον αποτελεσματικό διαλύτη DMSO .
- ❑ Η λιπόφιλη ένωση **PLX4720** (MW: 413,83gr/mol) , ανάλογο του ειδικού αναστολέα της BRAFV600E Vemurafenib, και ειδικός αναστολέας τύπου I της BRAFV600E , εγκλωβίζεται στην ελαιώδη φάση (triacetin) του μικρογαλακτώματος ο/w . Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση **$31,5 \times 10^{-6}$ M** στο μικρογαλάκτωμα και σε τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό **$0,63 \times 10^{-7}$ M** . Το αντιοξειδωτικό μόριο του **σκουαλενίου** αποτελεί πρότυπο λιπόφιλο μόριο που ενθυλακώνεται επίσης στην ελαιώδη φάση του μικρογαλακτώματος . Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση **$0,94 \times 10^{-3}$ M** στο μικρογαλάκτωμα και σε τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό **$1,88 \times 10^{-6}$ M** . Σημειώνεται ότι, η φαρμακοενθυλάκωση του PLX4720 δεν άλλαξε την αναλογία των συστατικών

του μικρογαλακτώματος . Δηλαδή, η αναλογία μετά τον εγκλωβισμό του φαρμάκου ήταν PBS 1X **81,54%** w/w , Tween80 **10,59%** w/w, triacetin/PLX4720 **7,87%** w/w . Αντίθετα, ο εγκλωβισμός του σκουαλενίου αναδιαμόρφωσε τις αναλογίες του μικρογαλακτώματος ως εξής : PBS 1X **87,70%** w/w, Tween80 **9,75%**, triacetin / Sq **2,56%** w/w .

- Η **cis πλατίνα** είναι αλκυλιωτικός παράγοντας και γνωστό αντικαρκινικό χημειοθεραπευτικό φάρμακο. Η αντινεοπλαστική της δράση έγκειται στα υψηλής δραστηριότητας , φορισμένα σύμπλοκα λευκόχρυσου που σχηματίζει τα οποία δεσμεύονται σε πυρηνόφιλες ομάδες, όπως οι πλούσιες σε G-C περιοχές του DNA , δημιουργώντας ενδο- και διαμοριακές DNA διασυνδέσεις που οδηγούν τελικά σε απόπτωση και αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης. Χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία **10%** στο θρεπτικό μέσο (300μl σε 3000μl DMEM) .

Στο κάτωθι διάγραμμα απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων WM164 συναρτήσει των διαφορετικών αντιδραστηρίων που χορηγήθηκαν σε συνθήκες επώασης 37°C, 5% CO₂ , (MTT assay στις **48 και 72 ώρες** μετά την χορήγηση αντιδραστηρίων) :



Τα ποσοστά αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρούνται στις στήλες των

υπό δοκιμή μικρογαλακτωμάτων m/e 0,2% και m/e PLX 0,2% συγκρίνονται αφενός μεταξύ τους (στις 48 και 72 ώρες) και αφετέρου 1) με τους αρνητικούς μάρτυρες (DMEM,DMSO 1%), 2) με το θετικό μάρτυρα (cisplatin), 3) με το DMSO/PLX και

τελικώς συγκρίνεται η συμπεριφορά του σκουαλενίου σε διαλύτη DMSO και στο μικρογαλάκτωμα.

Συμπεράσματα

- Η συγκεκριμένη δομή μικρογαλακτώματος δεν επηρεάζει τα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας όπως προκύπτει από τη σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των αρνητικών μαρτύρων. **Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα.**
- Όταν η βιοδραστική ένωση PLX εγκλωβίζεται στο μικρογαλάκτωμα στις προαναφερθείσες συνθήκες **προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σημαντικό βαθμό** . Παρ' όλα αυτά όταν η ίδια βιοδραστική ένωση χορηγείται μέσω οργανικού διαλύτη (DMSO/PLX) η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι σημαντικά μεγαλύτερη . **Επομένως, ο παραδοσιακός τρόπος χορήγησης φαρμάκων με διαλύτη DMSO υπερτερεί σε αποτελεσματικότητα του μικρογαλακτώματος o/w - φορέα .**

→ **Σύστημα μικρογαλακτώματος w/o** (Medium Chain Triglyceride-MCT **93,1%** w/w, λεκιθίνη & μονογλυκερίδια-DMG **4,9%** w/w , προπυλενογλυκόλη-PG σε dH₂O **2%** w/w) :

Έγιναν δοκιμές με την τεχνική MTT , σε **96-well plates** , ώστε να προσδιοριστεί η ανοχή των κυττάρων στο σύστημα-φορέα (w/o, με medium chain triglyceride/MCT) παρουσία και απουσία της βιοδραστικής ουσίας **DPBRA2** σε σύγκριση με τους αρνητικούς (DMEM,DMSO) και θετικούς (cis-platin) μάρτυρες. Επίσης, μελετήθηκαν ξεχωριστά το **παραφινέλαιο** (ως εναλλακτική ελαιώδης φάση) και το παραφινέλαιο μαζί με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα **DMG** (μονογλυκερίδια) για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας .

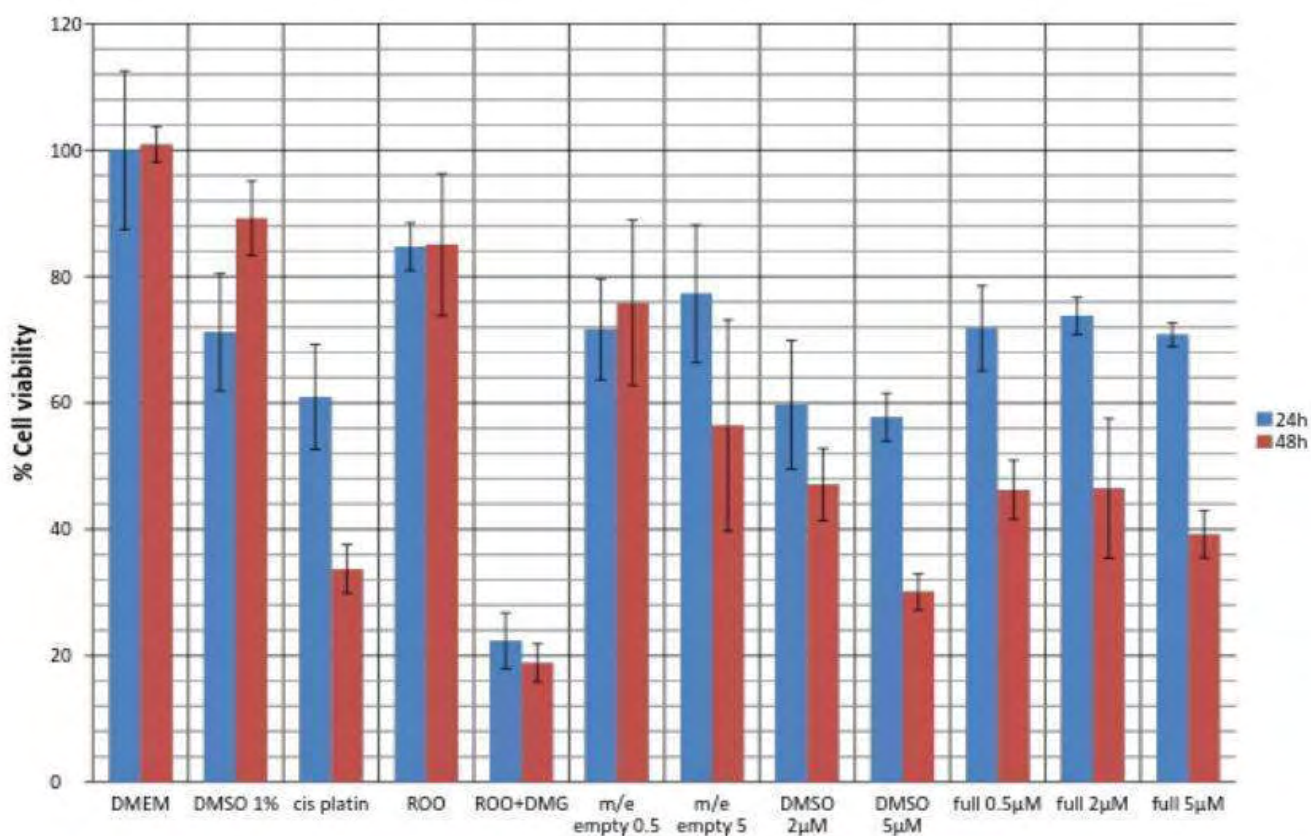
Ουσιαστικά, το εν λόγω μικρογαλάκτωμα **νερού-σε-έλαιο (w/o)** βρίσκεται υπό δοκιμή για την αποτελεσματικότητά του (βέλτιστη αναλογία και είδη συστατικών) ως φορέας φαρμάκων .

- Η βιοδραστική ένωση DPBRA2 (MW: 503,65gr/mol) παρασκευάστηκε στο πλαίσιο του προγράμματος ΣΘΕΝΟΣ , είναι ένα υπό δοκιμή αμφίφιλο μόριο, μη ειδικός αναστολέας της BRAFV600E . Για την ενθυλάκωσή του στο μικρογαλάκτωμα w/o πρωτίστως διαλύεται σε αιθανόλη, μετά την εξάτμιση της οποίας προστίθενται τα συστατικά του μικρογαλακτώματος για την τελική δημιουργία μικρογαλακτώματος με εγκλωβισμένο το DPBRA2 .

Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση $0,1 \times 10^{-3} \text{ M}$ στο μικρογαλάκτωμα και σε τελικές συγκεντρώσεις στο θεραπευτικό υλικό $0,5 / 2 / 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (3 υπό δοκιμή συγκεντρώσεις) .

- Το μικρογαλάκτωμα w/o με medium chain triglyceride ως ελαιώδη φάση δοκιμάστηκε σε δυο διαφορετικές αναλογίες στο θεραπευτικό υλικό, **0,5% και 5%** .
- Τέλος, η βιοδραστική ένωση DPBRAF2 διαλύθηκε σε DMSO και χορηγήθηκε στην κυτταροκαλλιέργεια με δυο διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις στο θεραπευτικό υλικό, **2 μM και 5 μM** . Με την συγκεκριμένη συνθήκη, συγκρίνεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος w/o ως φορέας φαρμάκων σε σχέση με τον πλέον αποτελεσματικό διαλύτη DMSO .

Στο κάτωθι διάγραμμα απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων WM164 συναρτήσει των διαφορετικών αντιδραστηρίων που χορηγήθηκαν σε συνθήκες επώασης 37° C, 5% CO₂, (MTT assay στις 24 και 48 ώρες μετά την χορήγηση αντιδραστηρίων) :



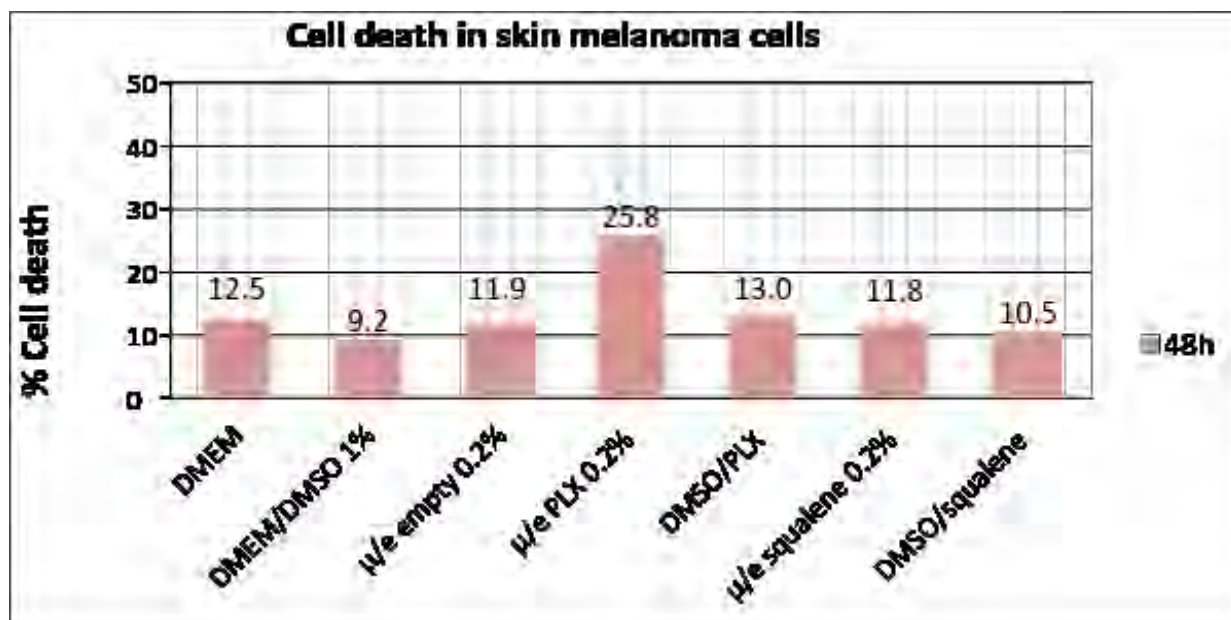
Συμπεράσματα

- Παρατηρείται εμφανής μείωση βιωσιμότητας κυττάρων στην περίπτωση των συστατικών παραφινελαίου + DMG . Αν και βιοσυμβατά συστατικά, τα μονογλυκερίδια σε αναλογία 150μl σε ~1ml ROO- εμφανίζουν τοξικότητα στα κύτταρα της καλλιέργειας . **Δεν αποτελεί ασφαλή επιλογή ως επιφανειοδραστικός παράγοντας-συστατικό ελαιώδους φάσης, τουλάχιστον σε αυτή την αναλογία και συνδυασμένο με παραφινέλαιο .**
- Η συγκεκριμένη δομή μικρογαλακτώματος με MCT (απουσία βιοδραστικής ένωσης) **επηρεάζει αρνητικά τα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας** (και στις 2 αναλογίες στο θρεπτικό υλικό) όπως προκύπτει από τη σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά αρνητικών μαρτύρων . (Η ανάκαμψη των κυττάρων στις 48h για την αναλογία 0,5% και η πτώση του ποσοστού βιωσιμότητας στις 48h για την αναλογία 5% ίσως οφείλονται σε λάθος χειρισμούς των 96well plates με τα δείγματα που θα επωάζονταν για 48h) .
- Τα μικρογαλακτώματα με MCT_παρουσία βιοδραστικής ένωσης DPBRA2 σε 3 συγκεντρώσεις **στις 48h προκαλούν σημαντική μείωση κυτταρικής βιωσιμότητας.**
- Συνολικά, **δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την καταλληλότητα του μικρογαλακτώματος w/o ως μη τοξικού φορέα φαρμάκων** . Επομένως, η χορήγηση φαρμάκου DPBRA2 διαλυμένο σε DMSO παραμένει η πιο αποτελεσματική επιλογή.

❖ Δοκιμές προσδιορισμού κυτταρικού θανάτου (Trypan Blue Assay)

→ Αναφορικά με τα συστήματα o/w και το φάρμακο PLX 4720 :

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων (**6-well plates**) και προσδιορίστηκε ο **κυτταρικός θάνατος 48h μετά τη χορήγηση** του μικρογαλακτώματος παρουσία ή απουσία της βιοδραστικής ουσίας PLX 4720 ή των κατάλληλων μαρτύρων (σκουαλένιο). Οι ίδιες ουσίες χορηγήθηκαν επίσης με διαλύτη το DMSO . Τα κύτταρα που οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο χρωματίζονται με τη χρωστική Trypan Blue λόγω διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης και μετρούνται στο μικροσκόπιο ως ποσοστό του συνολικού αριθμού κυττάρων.



Συμπέρασμα

- Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτο ποσοστό κυτταρικού θανάτου (25,8%) όταν χορηγήθηκε μικρογαλάκτωμα με εγκλωβισμένο PLX 4720.

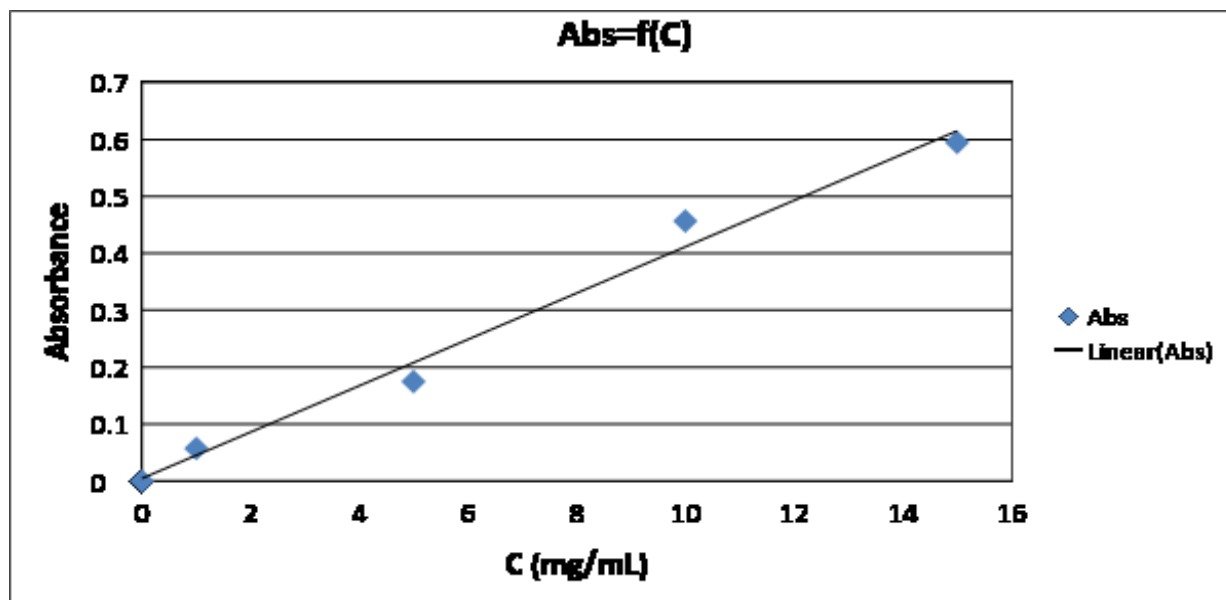
❖ Βιοχημικός Έλεγχος - Στύπωμα Western

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προχωρήσαμε σε βιοχημικό έλεγχο του κυτταρικού θανάτου σε επίπεδο πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης (western blotting), ώστε να διερευνηθεί ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου καθώς και η ενδεχόμενη επίδραση του συγκεκριμένου συστήματος στο σηματοδοτικό μονοπάτι Raf-MEK-ERK .

→ Χρησιμοποιήθηκαν μόνο δείγματα κυττάρων από τις δοκιμές με το μικρογαλάκτωμα o/w . Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας δεν έγινε βιοχημικός έλεγχος για το σύστημα w/o λόγω των μη ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων κατά τις δοκιμές MTT .

❖ Βαθμονόμηση Bradford

Από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου, απομονώθηκαν τα κύτταρα που αντιστοιχούσαν στις 48h μετά τη χορήγηση. Από το ίζημα των κυττάρων και μετά από κατάλληλη επεξεργασία παρασκευάστηκε το ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών . Μέσω της τεχνικής Bradford δημιουργήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης ώστε να προσδιοριστεί φωτομετρικά η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα σε mg/mL .



❖ Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Παρασκευάστηκε πήκτωμα **SDS/πολυακρυλαμιδίου 10%** στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα για να γίνει ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Μετά από κατάλληλη κατεργασία έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα (gel) σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης (6cm x 9cm) ώστε να γίνει η επώαση με αντισώματα και να εντοπιστούν οι πρωτεΐνες που μελετώνται. Τέλος, γίνεται η αποτύπωση σε φίλμ ώστε να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα. Οι ζώνες που εμφανίζονται στα φίλμ αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες που ανιχνεύουμε επιλέγοντας το κατάλληλο αντίσωμα και ο βαθμός έκφρασής τους στα κύτταρα αντιστοιχεί στην ένταση της ζώνης.

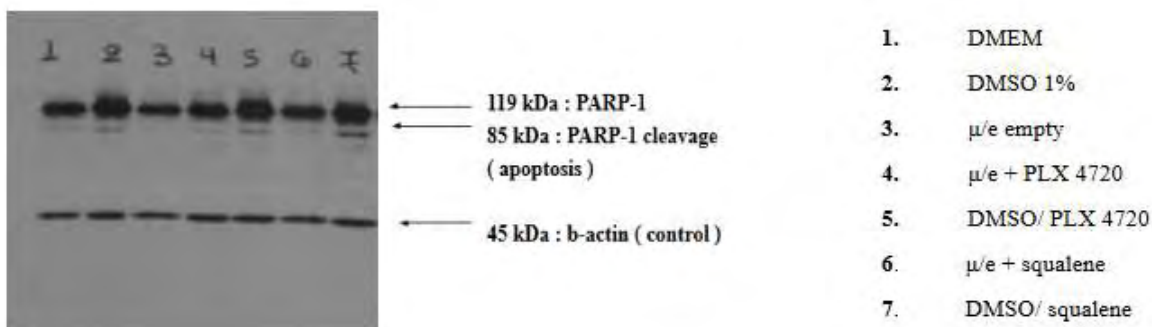
I. Προσδιορισμός αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω PARP-cleavage

Στην συγκεκριμένη ανοσοαποτύπωση εντοπίζουμε την poly ADP ribose polymerase 1 (**PARP-1, MW 119kDa**) η οποία εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες, κυρίως στην επιδιόρθωση του DNA και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα. Η πρωτεόλυση της PARP από κασπάσες (**85kDa**) είναι δείκτης ενεργοποίησης της απόπτωσης (**marker of undergoing apoptosis**). Η ακτίνη (**45kD**) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας για ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης.

-Μάρτυρας μοριακού βάρους: **Prestained Protein Marker, Broad range: 6-175kDa**

-**αντι-PARP/cleaved (1:500)**, αντι-β-ακτίνη (1: 5.000), αντι-mouse Igs/HRP (1:1000)

Western Blot in Melanoma Cells



Συμπεράσματα

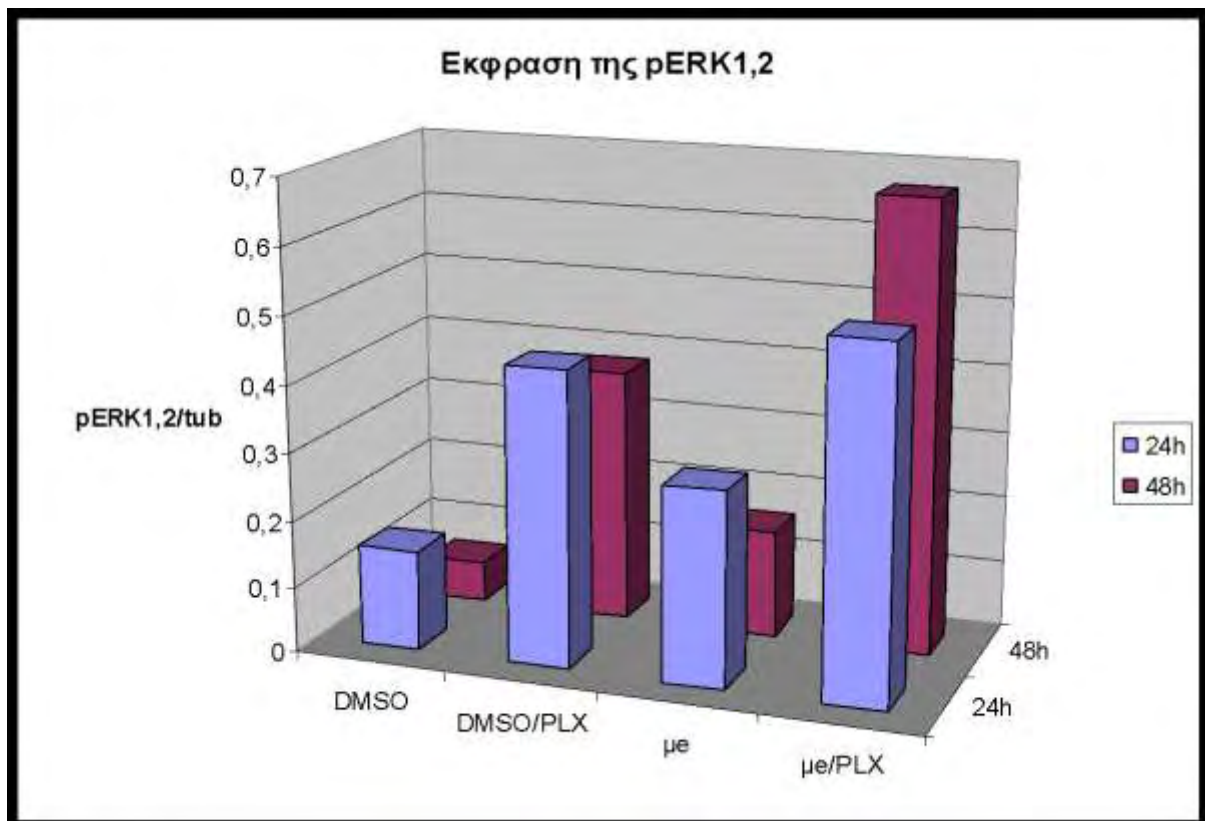
- Η αποπτωτική διαδικασία δεν επάγεται από το σύστημα μ/e + PLX 4720 .
- Η παρουσία αποπτωτικού θραύσματος (85 kDa) μόνο στην περίπτωση που η βιοδραστική ένωση αλλά και το σκουαλένιο χορηγούνται μέσω οργανικού διαλύτη (DMSO) είναι σύμφωνη με τα προηγούμενα αποτελέσματα . Η δε περίπτωση του σκουαλενίου (αντιοξειδωτικός παράγοντας) χρήζει περαιτέρω διερεύνησης .

II. Διερεύνηση της επίδρασης του συστήματος μ/e + PLX 4720 στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK

Στην συγκεκριμένη ανοσοαποτύπωση εντοπίζουμε την **p-ERK1,2 (42-44kDa)** στα WM164 κύτταρα τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, σε φυσιολογικά κύτταρα αναμένεται έκφραση της pERK1,2 στο πλαίσιο της σηματοδότησης μέσω RAS/RAF/MEK/ERK. Ωστόσο, σε κύτταρα μελανώματος, λόγω της ενεργού μορφής B-RAFV600E που οδηγεί σε ενισχυμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK/ERK, αναμένονται μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης pERK1,2. Συνεπώς, οι όποιες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της pERK1,2 στα κύτταρα όπου χορηγείται η βιοδραστική ένωση σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, αποτελούν ένδειξη ειδικής δράσης των ενώσεων στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK. Η **τουμπουλίνη (55kD)** χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας για ποσοτικοποίηση

της ολικής πρωτεΐνης (Μάρτυρας μοριακού βάρους: Prestained Protein Marker, Broad range: 6-175kDa, 2^ο αντίσωμα αντι-mouse Igs/HRP 1:1.000).

Λόγω μεγάλης ετερογένειας στην ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης που φορτώθηκε σε κάθε διάδρομο του πηκτώματος και προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, οι ζώνες της ανοσοαποτύπωσης που αντιστοιχούσαν στην pERK1,2 (**αντι-pERK1,2 1:1.000**) και στην τουμπουλίνη (αντι-tubulin 1:2.000) ποσοτικοποιήθηκαν με Image Quant. **Ο λόγος pERK1,2 / tubulin σε κάθε διάδρομο είναι μέτρο των μεταβολών της έκφρασης της pERK1,2 όπως παρουσιάζεται στο ακόλουθο ιστόγραμμα:**



Συμπεράσματα

Η χορήγηση της βιοδραστικής ένωσης PLX4720 στην κυτταρική σειρά μελανώματος WM164 επάγει τα επίπεδα έκφρασης της pERK1,2 ανεξαρτήτως του οχήματος μεταφοράς. Η συγκεκριμένη ένωση, αν και ανάλογο του ειδικού αναστολέα της BRAFV600E Vemurafenib, προφανώς δεν δρά ως αναστολέας της BRAFV600E κινάσης στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK και/ή σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης/θανάτου που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης της pERK1,2 είναι αυτή τη στιγμή υπό διερεύνηση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν η διερεύνηση της χρήσης βιοδραστικών ενώσεων στην στοχευμένη θεραπεία κυττάρων μελανώματος που φέρουν τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης BRAF (V600E). Ως φορείς των βιοδραστικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν μικρογαλακτώματα με στόχο την επίτευξη μεγαλύτερης δυνατής βιοδραστικότητας στις μικρότερες δυνατές συγκεντρώσεις.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος της βιοτεχνολογίας και των επιστημών υγείας έχει συμβάλει σημαντικά στην αντιμετώπιση αλλά και στη μείωση της εμφάνισης κοινών ασθενειών (καρδιοπάθειες, πνευμονοπάθειες, λοιμώξεις του αναπνευστικού κ.ά.) που συνεχίζουν να αποτελούν κορυφαίες αιτίες θανάτου σε παγκόσμια κλίμακα. Ως αποτέλεσμα, η ασθένεια του καρκίνου, σταδιακά αναρριχώμενη, λαμβάνει την πρώτη θέση σε κρούσματα και σε αιτία θανάτου παγκοσμίως. Συνυπολογίζοντας την πολυσταδιακή φύση της ανάπτυξης του καρκίνου, η αύξηση του προσδόκιμου ζωής στο λόγω των συνθηκών υγιεινής και της βελτιωμένης ιατρικής περίθαλψης, θα οδηγήσει σε εκτόξευση των κρουσμάτων καρκίνου τις επόμενες δεκαετίες.

Η επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης νέων στρατηγικών προσεγγίσεων για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου ανέδειξε την ανάγκη για **στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία**. Αντίθετα, με την παραδοσιακή χημειοθεραπεία, η στοχευμένη θεραπεία θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα (μόριο-στόχος) και απουσία παρενεργειών (στόχος τα καρκινικά κύτταρα) με απώτερο στόχο, όπως και στη περίπτωση της παραδοσιακής αντικαρκινικής θεραπείας την πρόκληση αποπτωτικού θανάτου λόγω της αντιφλεγμονώδους φύσης του (*Pandey M.K. et al., 2016*) .

Η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώνεται στον πιο θανατηφόρο δερματικό καρκίνο, το **μελάνωμα**, που ευθύνεται για το 75% των θανάτων από δερματικούς όγκους. Σε γενετικό επίπεδο, φαίνεται ότι η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού **RAS-RAF-MEK-ERK** εμπλέκεται άμεσα στην ογκογονική συμπεριφορά του μελανώματος. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης BRAF βρίσκεται σε μεταλλαγμένη μορφή στο 66% των κακοηθών μελανωμάτων. Η μεταλλαγμένη μορφή **BRAFV600E** που καθιστά την κινάση ιδιοσυστατικά ενεργή, συναντάται στο 80% των μεταλλαγμένων μορφών BRAF, (*Paluncic J. et al., 2016*) . Τελευταίες μελέτες των *Krayem et al., 2015 ; Law M.H. et al., 2012*, εμφανίζουν την ενεργοποιητική μετάλλαξη BRAFV600E ως ιδρυτικό γεγονός της μελανοκυτταρικής βλάβης, και την **απορρύθμιση του μονοπατιού της p53** ως καθοριστικό βήμα αθανатоποίησης και πλήρους κακοήθους εξαλλαγής αυτών των μελανοκυττάρων.

Λαμβάνοντας υπόψιν την μοριακή βιολογία του μελανώματος, η στρατηγική προσέγγιση που εφαρμόστηκε ήταν η εν δυνάμει στόχευση της ογκοπρωτεΐνης BRAFV600E . Ως βασικό εργαλείο της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η μεταστατική

κυτταρική σειρά μελανώματος **WM164** που ανήκει σε παθολογικά οξώδες μελάνωμα και διαθέτει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη V600E (Val 600 Glu) στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου της κινάσης BRAF . Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει τροποποιηθεί ώστε το γονίδιο της TP53 να είναι μεταλλαγμένο (p53^{null}).

Για την στόχευση της πρωτεΐνης BRAFV600E έγινε χρήση δυο βιοδραστικών ενώσεων, πιθανών αναστολέων της BRAFV600E, που μελετήθηκαν στο πλαίσιο του αναπτυξιακού ερευνητικού προγράμματος **ΣΘΕΝΟΣ** : της λιπόφιλης υβριδικής ένωσης **PLX 4720**, ανάλογο του ειδικού αναστολέα της BRAFV600E Vemurafenib, και της αμφίφιλης ένωσης **DPBRA2** ως μη εξειδικευμένου αναστολέα της BRAFV600E που σχεδιάστηκε για τις ανάγκες του **ΣΘΕΝΟΣ** από τον Δρ. Δ. Παπαχατζή και την ομάδα της Φαρμακευτικής Χημείας του ΙΒΦΧΒ-ΕΙΕ. Οι βιοδραστικές αυτές ενώσεις εγκλωβίστηκαν σε **μικρογαλακτώματα (microemulsions)** και χορηγήθηκαν σε καλλιέργεια κυττάρων WM164. Τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά μείγματα ελαίου, νερού και επιφανειοδραστικών ουσιών. Η συνύπαρξη υδρόφιλων, λιπόφιλων και αμφίφιλων συστατικών σε ένα μακροσκοπικά ομοιογενές μείγμα, επιτρέπει τον εγκλωβισμό σε αυτό ενός ευρέως φάσματος ουσιών, (*Fanun et al., 2008*) . Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, για την φαρμακοενθυλάκωση του λιπόφιλου PLX 4720 χρησιμοποιήθηκε μικρογαλακτώμα **ελαίου-σε-νερό o/w** (PBS 1X 81,54% w/w , Tween80 10,59% w/w, triacetin 7,87% w/w) ενώ για την φαρμακοενθυλάκωση του αμφίφιλου DPBRA2 έγινε χρήση μικρογαλακτώματος **νερού-σε-έλαιο w/o** (Μεσαίας αλυσίδας τριγλυκερίδια-MCT 93,1% w/w, λεκιθίνη & μονογλυκερίδια-DMG 4,9% w/w , προπυλενογλυκόλη-PG σε dH₂O 2% w/w) .

Σε πρώτη φάση, διερευνήθηκε ο βαθμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**MTT assay**). Η δομή μικρογαλακτώματος w/o επηρέασε αρνητικά τα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας, επομένως, δεν κρίθηκε κατάλληλη για μη τοξική μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων. **Η δομή μικρογαλακτώματος o/w αποδείχθηκε ικανό σύστημα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα.** Η PLX4720 σε συγκέντρωση $31,5 \times 10^{-6}$ M στο μικρογαλακτώμα και τελική συγκέντρωση $0,63 \times 10^{-7}$ M στο θρεπτικό υλικό, προκάλεσε σημαντική αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αξιοσημείωτο ποσοστό κυτταρικού θανάτου (**25,8%**, **Trypan Blue Assay**) 48 και 72 ώρες μετά τη χορήγηση.

Στη συνέχεια, σε βιοχημικό επίπεδο (**Western Blot**) διερευνήθηκε η επαγωγή απόπτωσης μέσω πρωτεόλυσης της PARP-1 και η επίδραση της συγκεκριμένης ένωσης , PLX 4720 , στο σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης MAPK μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων φωσφορυλιωμένης ERK1/2. **Δεν ανιχνεύτηκε πρωτεολυτικό θραύσμα της**

PARP-1 (85 kD) και άρα ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας, επομένως ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται θα πρέπει να αποδοθεί σε άλλο μηχανισμό.

Δεδομένου ότι έχουν πλέον χαρακτηριστεί μορφολογικά και βιοχημικά διακριτά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου πλην της απόπτωσης (*Galluzzi L. et al., 2012*), ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στον οποίο οφείλεται η κυτταροτοξική δράση της PLX4720 ενθυλακωμένης σε δομή μικρογαλακτώματος ο/w θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα μελανώματος .

Αν και η PLX4720 θεωρείται ειδικός αναστολέας της BRAFV600E κινάσης, η χορήγησή της ενίσχυσε τα επίπεδα έκφρασης της pERK1,2. Το γεγονός αυτό υπονοεί δράση της ένωσης σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια πέραν αυτού της MAPK, πιθανά του P13K/Akt, ή απορύθμιση των μηχανισμών αρνητικής ανάδρασης που διαμεσολαβούνται από τις φωσφατάσες διττής ειδικότητας (MKPs/DUSPs) στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον (*Sondergaard JN et al., 2010*).

Συμπερασματικά, κατά τη διάρκεια της προκαταρκτικής αυτής μελέτης , προέκυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη δυνατότητα χρήσης της δομής μικρογαλακτώματος oil-in-water (o/w) ως μη τοξικού φορέα αποτελεσματικής μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων στο κυτταρικό σύστημα WM164 .

Με βάση τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα, η μελέτη συνεχίζεται με στόχο την αποσαφήνιση του μηχανισμού του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου καθώς και της αλληλεπίδρασης της PLX4720 με τα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης/θανάτου στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μελανώματος. Παράλληλα, γίνεται συστηματική προσπάθεια με στόχο τη βελτίωση του συστήματος μεταφοράς ώστε να μπορεί να ενθυλακώνει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λιπόφιλων βιοδραστικών ενώσεων και να τις διανέμει στοχευμένα στο εσωτερικό του κυττάρου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al Rashid ST, Dellaire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, Coakley C, Folkard M, Xu Y, Chen BP, Chen DJ, Lilge L, Prise KM, Bazett Jones DP, Bristow RG (2005). *Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo*. *Cancer Res* 65:10810-10821.
- Baig S, I Seevasant, J Mohamad, A Mukheem, HZ Huri and T Kamarul (2015). *Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?* *Cell Death and Disease* (2015) 6, e2001; doi:10.1038/cddis.2015.275.
- Collins K, Jacks T, Pavletich NP (1997). *The cell cycle and cancer*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 2776–2778.
- Drosten M, Suma EYM, Lechugaa CG, Simón-Carrasco L, Jacoba HKC, García-Medinaa R, Huangb S, Beijersbergenb RL, Bernardsb R, Barbacida M (2014). *Loss of p53 induces cell proliferation via Ras-independent activation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway*. *PNAs* vol. 111 , no. 42 , 15155–15160.
- Ehrlich, P. (1906). *Collected studies on immunity*. (New York, John Wiley).
- Fanun Monzer (2008). *Colloids in Biotechnology*. Surfactan science series, vol.152.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. *Cell Death Differ* 10:76–100.
- Flanagan J & Singh H (2007). *Microemulsions: A Potential Delivery System for Bioactives in Food*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:3,221-237.
- Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, Pastorfide GC, Boyer LA, Kao WH, Bulyk ML, Barnhill RL, Hayward NK, Housman DE, Fountain JW. (1996). *Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma*. *Cancer Res*. Nov 1;56(21):5023-32.
- Fridman JS, Lowe SW (2003). *Control of apoptosis by p53*. *Oncogene* 22:9030-40.
- Fuchs B, James J. (2004) . *The new Medicare drug benefit and related reforms: part II*. *Bull Am Coll Surg*. 89(5):8-10.
- Galluzzi L, I Vitale, J M Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke (2012). *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. *Cell Death and Differentiation* 19, 107–120.
- Gareth H Williams, Kai Stoeber (2012). *The cell cycle and cancer*. *J Pathol* 226: 352–364.
- Gutierrez, J.M., Gonzalez, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C.M., and Nolla, J. (2008). *Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation*. *Curr Opin Colloid In* 13, 245-251.
- Houtgraaf JH, Vermissen J, Wim J van der Giessen (2006). *A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells*. *Cardiovascular Revascularization medicine* 7:165-172.
- Huang Paul H., Richard Marais (2009). *Cancer: Melanoma troops massed*. *Nature* 459, 336-337 .

- Karasulu H Yesim (2008). *Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity*. Expert Opin. Drug Deliv. 5(1):119-135.
- Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S (2015). *Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling*. Nature. 2015 Oct 29;526(7575):666-71.
- Krayem M, Journe F, Wiedig M, Morandini R, Najem A, Salès F, Leon C. van Kempen, Sibille C, Awada A, Marine JC, Ghanem M (2015). *p53 Reactivation by PRIMA-1^{Met} (APR-246) sensitises ^{V600E/K}BRAF melanoma to vemurafenib*. European Journal of Cancer Volume 55, Pages 98–110.
- Lavananifar, A., Samuel, J., and Kwon, G.S. (2002). *Poly(ethyleneoxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev 54, 169-190.
- Levine B and Klionsky DJ (2004). *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell 6:463-477.
- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. (2009). *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*. Trends Pharmacol Sci.30(11):592-9.
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., and Graves, S.M. (2006). *Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties*. J Phys-Condens Mat 18, R635-R666.
- Matthew H. Law, Stuart MacGregor, Nicholas K. Hayward (2012). *Melanoma Genetics: Recent Findings Take Us Beyond Well-Traveled Pathways*. Journal of Investigative Dermatology, Volume 132, Pages 1763–1774.
- Mayur V. Jain, Anna M. Paczulla, Thomas Klonisch, Florence N. Dimgba, Sahana B. Rao, Karin Roberg, Frank Schweizer (2013). *Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, Volume 17, Issue 1, pages 12–29.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA, (2007). *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim Biophys Acta. 2007 Aug; 1773(8): 1263–1284.
- Micha-Screttas M, Ringsdorf H. (2008). *Preface. Polymer science and polymer therapeutics: macromolecules, dendrimers and nanomedicine*. Curr Top Med Chem. 2008;8(14):1161-4.
- Moon-Taek Park, Su-Jae Lee (2003). *Cell Cycle and Cancer*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 36, No. 1, pp. 60-65.
- Murphy ME, Leu JI, George DL (2004). *p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis*. Cell cycle 3(7):836-839.
- O Surova and B Zhivotovsky (2013). *Various modes of cell death induced by DNA damage*. Oncogene 32, 3789-3797.
- Oliver L, Vallette FM (2005). *The role of caspases in cell death and differentiation*. Drug Resist Updat.(3):163-70.

- Paluncic J., Z Kovacevic, P J Jansson, D Kalinowski, A Merlot, M L.-H. Huang, H Lok, S Sahni, DJ.R. Lane, D R. Richardson (2016). *Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling* . BBA - Molecular Cell Research, S0167-4889(16)30015-5.
- Pandey M.K , Sahdeo Prasad , Amit Kumar Tyagi , Lokesh Deb , Jiamin Huang , Deepkamal N. Karelia , Shantu G. Amin and Bharat B. Aggarwal (2016). *Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death*. Pharmaceuticals 2016, 9, 11; doi:10.3390/ph9010011.
- Particle Sciences (2011) . *Emulsion Stability and Testing*. Drug development services , Technical brief 2011, Vol. 2.
- Paul H. Huang, Richard Marais (2009) . *Cancer: Melanoma troops massed* . Nature 459, 336-337.
- Perna D, Karreth FA, Rust AG, Perez-Mancera, Rashid M, Iorio F (2015). *BRAF inhibitor resistance mediated by the AKT pathway in an oncogenic BRAF mouse melanoma model* . PNAS E536-E545.
- Pluquet O and Hainaut P (2001). *Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction*. Cancer Lett 174:1-15.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003). *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* Exper Cell Res 283:1-16.
- Salvesen GS, Abrams JM. (2004). *Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies*. Oncogene.12;23(16):2774-84.
- Schimmer AD (2004). *Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice*. Cancer Res 64:7183–7190.
- Schmitt E, Beauchemin M, Bertrand R (2007). *Nuclear co-localization and interaction between bcl-xL and cdk1 (cdc2) during G2/M cell cycle checkpoint*. Oncogene 26(40):5851-65.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2015). *Old, new and emerging functions of caspases*. Cell Death Differ.22(4):526-39.
- Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F (2015). *Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS*. Nature.514(7521):187-92.
- Shima A., Y. Tomita (1981). *The behavior of a spherical bubble near a solid wall in a compressible liquid*. Ingenieur-Archiv, May 1981, Volume 51, Issue 3, pp 243-255.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., and Garcia-Celma, M.J. (2005). *Nano-emulsions*. Curr Opin Colloid In 10, 102-110.
- Søndergaard Jonas N, Ramin Nazarian, Qi Wang, Deliang Guo, Teli Hsueh, Stephen Mok1, Hooman Sazegar (2010). *Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032*. Journal of Translational Medicine 2010, 8:39.
- Teodoro JG, Evans SK, Green MR (2007). *Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome*. J Mol Med 85:1175-86.
- Tuveson D.A, Barbara L. Weber, Meenhard Herlyn (2003). *BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies*. CANCER CELL , Vol. 4.

- Vermeulen K, Dirk R Van Bockstaele and Berneman ZN (2003). *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif 36:131-149.
- Walker D Roland, Jeffrey P Bond, Robert E Tarone, Curtis C Harris, Wojciech Makalowski, Mark S Boguski, Marc S Greenblatt (1999). *Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features*. Oncogene 19, 211 ± 218.
- Williams GH, Stoeber K. (2012). *The cell cycle and cancer*. J Pathol.;226(2):352-64.
- Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. (2010). *Scope of nanotechnology in ovarian cancer therapeutics*. J Ovarian Res. 6;3:19.
- Yoon Lim and Sharad Kumar (2015) *A single cut to pyroptosis*. (www.impactjournals.com/oncotarget/).
- Zoumpantioti M, E. Karavas, C. Skopelitis, H. Stamatis, A. Xenakis (2004). *Lecithin organogels as model carriers of pharmaceuticals*. Trends in Colloid and Interface Science XVI Volume 123 of the series Progress in Colloid and Polymer Science pp 199-202.