



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Συμβολή των αναστολέων της φωσφοινοσιτιδικής -3 κινάσης στην  
καταστολή της αντίστασης των κυττάρων του καρκίνου του μαστού στα  
αντιοιστρογόνα**

**Suppression of estrogen receptor (ER) – positive breast cancer cells’  
resistance to antiestrogens by using combinations of 4-Hydrotamoxifen  
(OHT), a typical antiestrogen, with phosphatidylinositol 3-kinase  
(PI3K) inhibitors**

Επιμέλεια εργασίας: Τσιργιώτη Χρυσούλα

Επιβλέποντες καθηγητές: Αλέξης Μιχαήλ, Ψαρρά Άννα-Μαρία

ΑΘΗΝΑ 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ).

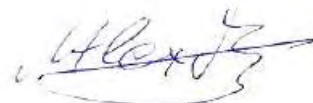
Υπεύθυνοι Καθηγητές:

Αλέξης Μιχαήλ, Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, ΕΙΕ

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

Τριμελής επιτροπή:

Αλέξης Μιχαήλ, Ερευνητής Α' στο ΕΙΕ



Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

*Στον Δημήτρη. . .*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT .....	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
Τύποι καρκίνου του μαστού .....	11
Οιστρογόνα και καρκίνος του μαστού .....	11
Θεραπεία του καρκίνου του μαστού με αντιοιστρογόνα .....	13
Αντοχή στη θεραπεία με αντιοιστρογόνα .....	16
Σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφοινοσιτιδικής 3-κινάσης (PI3K) και ER θετικός (+) καρκίνος του μαστού.....	17
Ανάπτυξη αναστολέων της PI3K σε κλινικό στάδιο .....	21
Μετάλλαξη του μονοποτιού της PI3K και αντοχή στη θεραπεία με αντιοιστρογόνα .....	25
Συμβολή των αναστολέων της PI3K, στην καταστολή της αντίστασης των κυττάρων του καρκίνου του μαστού στα αντιοιστρογόνα .....	27
ΣΚΟΠΟΣ.....	28
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
Υλικά .....	30
Κυτταρικές σειρές .....	31
Αποστείρωση .....	31
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
Διαδικασίες για την καλλιέργεια των κυττάρων.....	32
Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με τρυψίνη (τρυψινοποίηση).....	33
Προετοιμασία των ενώσεων.....	33
Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού .....	34
Προσδιορισμός του αριθμού ζώντων και νεκρών κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου .....	34
Λύση κυττάρων με RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay buffer), συλλογή και απομόνωση πρωτεϊνών.....	35
Δοκιμασία Bradford.....	35

Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western .....	36
Δημιουργία κλώνων MCF-7_PTEN_KD και MCF-7_mock_KD.....	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	38
Επιλογή κατάλληλου πρωτόκολλου καλλιέργειας κυττάρων .....	38
Μέτρηση της συνέργειας του αναστολέα GDC-0941 με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT) στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1.....	41
Έλεγχος δραστικότητας υποψήφιων αναστολέων της PIK3CA E545K.....	44
Μελέτη της δραστικότητας του αναστολέα της PIK3CA GDC-0941 καθώς και της BRF-004 σε κυτταρικές σειρές που έχουν υποστεί απάλειψη του PTEN. ....	56
Μελέτη της δράσης GDC-0941 και BRF-004 με ανοσοαποτύπωση κατά Western .....	65
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η ερευνητική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας (ΕΜΕ) του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), διευθυντής ερευνών του οποίου είναι ο Δρ. Μιχάλης Ν. Αλέξης προς τον οποίο εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη μου για την αμέριστη συμπαράσταση, σχεδιασμό της ερευνητικής αυτής εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις του, στο πειραματικό και συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας.

Στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για την προτροπή, καθοδήγηση και στήριξη καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Θερμά επίσης ευχαριστώ, τον επίκουρο καθηγητή κ. Λεωνίδα Δημητρη, για την συμβολή του στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ τη συνεργάτιδα του ΕΜΕ-ΙΒΦΧΒ, Δρ. Αγγελική Μελίγκοβα για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά της στην εκπόνηση των πειραμάτων μου. Ήταν πάντα δίπλα μου και η καθοδήγηση και βοήθειά της ήταν πολύτιμες. Επίσης ευχαριστώ την υποψήφια διδακτορική φοιτήτρια Δήμητρα Σιάκουλη, καθώς με βοήθησε να εξοικειωθώ με τον χώρο και τις τεχνικές του εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου της Μοριακής Ενδοκρινολογίας για την βοήθειά τους με οποιονδήποτε τρόπο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο PIK3CA (το οποίο κωδικοποιεί την καταλυτική p110a υπομονάδα της κινάσης PI3K), εμπλέκεται συχνά στην ανάπτυξη συμπαγών όγκων, κυρίως καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου και του ενδομητρίου, ως επακόλουθο μετάλλαξης, γονιδιακής πολλαπλότητας ή υπερέκφρασης. Επειδή η καταστολή της φυσιολογικής PIK3CA θα έχει παρενέργειες που θα προκύψουν από αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης αλλοστερικών αναστολέων που θα καταστέλλουν με τελείως εξειδικευμένο τρόπο, μόνο τις μεταλλαγμένες PIK3CA χωρίς να προκαλούν, όπως οι ανταγωνιστικοί αναστολείς, παρενέργειες στα φυσιολογικά κύτταρα που διαθέτουν μόνο κανονική (μη μεταλλαγμένη) PIK3CA. Η παρούσα εργασία, αποσκοπεί στο να ελέγξει την αποτελεσματικότητα μιας σειράς υποψήφιων αλλοστερικών αναστολέων της PIK3CA E545K όταν καλούνται να δράσουν μόνοι ή σε συνδυασμό με υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT), κατά κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού, θετικών ως προς την έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor, ER). Στα πλαίσια αυτά, ελέγχθηκαν είκοσι ενώσεις (BRF-001 – BRF-020) με *in silico* υπολογισμένη δυνατότητα αλλοστερικής ρύθμισης της ενεργότητας της PIK3CA E545K, κατά κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (ΚΣΚΜ) που φέρουν την μεταλλαγμένη E545K (MCF-7 κύτταρα) ή την αγρίου τύπου (ZR75.1 κύτταρα) PIK3CA. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όταν οι ενώσεις BRF καλούνται να δράσουν μόνες ή σε συνδυασμό με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT) και συγκρίθηκε με αυτή του GDC-0941 (γνωστού ανταγωνιστικού αναστολέα όλων των ισοτύπων της PI3K) και του συνδυασμού του με OHT. Εκτός από την κατασταλτική αποτελεσματικότητα μελετήθηκε η εμφάνιση ή η απουσία συνέργειας των BRF και του GDC-0941 με την OHT. Επειδή η αντοχή στην OHT είναι πιθανό να αυξάνει όταν οι μεταλλάξεις της PIK3CA συνοδεύονται από απάλειψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, ελέγχθηκε η κατασταλτική αποτελεσματικότητα των BRF και του GDC-0941 απουσία και παρουσία OHT κατά ΚΣΚΜ που φέρουν (ZR75.1, MCF-7\_PTEN\_KD) ή όχι απάλειψη του PTEN (MCF-7, MCF-7\_mock\_KD). Διαπιστώθηκε ότι, 1) το GDC-0941 παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα καταστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 αγρίου

τύπου καθώς και ισχυρή συνέργεια με την OHT σε αυτά, 2) μόνο οι ενώσεις BRF-004 και BRF-020 εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα καταστολής του πολλαπλασιασμού κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου σε φαρμακολογικά ανεκτή συγκέντρωση (10  $\mu$ M), 3) μόνο η ένωση BRF-004 παρουσιάζει ασθενή συνέργεια με την OHT στα κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, 4) ο αναστολέας GDC-0941 και η ένωση BRF-004 παρουσιάζουν μειωμένη αποτελεσματικότητα καταστολής του πολλαπλασιασμού κυττάρων με απάλειψη PTEN (MCF-7\_PTEN\_KD, ZR-75.1) σε αντίθεση με αυτά που φέρουν PTEN αγρίου τύπου (MCF-7, MCF-7\_mock\_KD), 5) ο αναστολέας GDC-0941 εμφανίζει μέτρια έως ισχυρή συνέργεια με την OHT τόσο σε κύτταρα αγρίου τύπου, όσο και σε κύτταρα με απάλειψη PTEN, σε αντίθεση με την ένωση BRF-004 η οποία εμφανίζει αρνητική έως ασθενή συνέργεια με την OHT είτε σε κύτταρα αγρίου τύπου, είτε σε κύτταρα με απάλειψη PTEN, 6) ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε ότι ο συνδυασμός του αναστολέα GDC-0941 με την OHT αυξάνει την αρνητική ρύθμιση των Akt/pAkt συγκρινόμενη με αυτή που προκαλεί το GDC-0941 ή η OHT ξεχωριστά, ενώ ο συνδυασμός της ένωσης BRF-004 με OHT δεν προκαλεί αντίστοιχη αρνητική ρύθμιση των Akt/pAkt, ειδικά στα κύτταρα με απάλειψη PTEN. Η αναντιστοιχία ανάμεσα στην ένωση BRF-004 και το GDC-0941 όσον αφορά στο συνδυασμό τους με την OHT, υποδεικνύει ότι η πρώτη δεν στοχεύει την PIK3CA E545K ή ότι η PIK3CA E545K που έχει υποστεί αλλοστερική και ανταγωνιστική αναστολή, αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με τον συνδεδεμένο με OHT υποδοχέα ER



## ABSTRACT

Mutations in PIK3CA gene (that encodes the PI3K's catalytic subunit, p110 $\alpha$ ), are often involved in solid tumor growth, especially in breast, colorectal and endometrial cancer. Inhibition of wild type PIK3CA will cause side effects because of alterations in the insulin pathway. Thus, the development of allosteric inhibitors with high specificity for the mutated forms of PIK3CA is essential. In contrast to competitive inhibitors, allosteric ones are not expected to cause any side effects in cells that carry the wild type PIK3CA. This research aims to check the efficacy of candidate allosteric inhibitors of PIK3CA E545K when acting alone or in combination with hydroxyl-tamoxifen (OHT) against breast cancer cell lines that express estrogen receptor (ER). Twenty compounds (BRF-001 – BRF-010) with in silico calculated ability to allosterically regulate PIK3CA E545K activity, were tested against breast cancer cell lines that carry the mutant E545K (MCF-7 cells) or the wild type PIK3CA (ZR-75.1 cells). The antiproliferative efficacy of BRF and their combination with OHT was compared to that of GDC-0941 (a known competitive inhibitor of all isoforms of PI3K) and its combination with OHT. In addition, we investigated whether BRF and GDC-0941 display antiproliferative synergy with OHT. Since PIK3CA mutations in combination with PTEN deletion may increase resistance to OHT we investigated the antiproliferative efficacy and synergy of BRF and GDC-0941 against breast cancer cell lines that carry PTEN deletion (ZR75.1, MCF-7\_PTEN\_KD) or not (MCF-7, MCF-7\_mock\_KD). We found that, 1) GDC-0941 displays high antiproliferative efficacy and synergy with OHT against MCF-7 cells, 2) only BRF-004 and BRF-020 display high antiproliferative efficacy against MCF-7 cells at pharmacologically acceptable concentration (10  $\mu$ M), 3) only BRF-004 displays weak synergy with OHT against MCF-7 cells 4) both GDC-0941 and BRF-004 display lower antiproliferative efficacy against PTEN-deleted (MCF-7\_PTEN\_KD, ZR-75.1) compared to PTEN wild-type (MCF-7, MCF-7\_mock\_KD) cells, 5) GDC-0941 displays moderate to strong synergy with OHT in PTEN-deleted and wild-type cells but BRF-004 displays negative to weak synergy with either PTEN deleted or wild-type cells, 5) western blot analysis revealed that the combination of OHT with GDC-0941 increases down-regulation of Akt/pAkt compared to either OHT or GDC-0941 alone while this is not the

case with OHT and BRF-004, especially in PTEN deleted cells. The discordance between BRF-004 and GDC-0941 in their interaction with OHT indicates that BRF-004 is not targeted to PIK3CA E545K or that allosterically and competitively-inhibited PIK3CA E545K interact differently with OHT-bound ER.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

### **Τύποι καρκίνου του μαστού**

Μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει ότι ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια συλλογή ασθενειών, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες και οι οποίες ανταποκρίνονται σε διαφορετικές θεραπείες. Ο καρκίνος του μαστού που εκφράζει τον οιστρογονικό υποδοχέα α (ER) και/ή τον υποδοχέα προγεστερόνης (PR) είναι ορμονοεξαρτώμενος και αποκρίνεται σε θεραπείες που αναστέλλουν την σηματοδότηση οιστρογόνων. Ο HER2 θετικός (+) καρκίνος του μαστού παρουσιάζει ενίσχυση ή υπερέκφραση του ERBB2 (HER2) πρώτο-ογκογονιδίου και αποκρίνεται κλινικά σε στοχευμένες HER2 θεραπείες. Ο τριπλά-αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC), από τον οποίο απουσιάζει ανιχνεύσιμη έκφραση ER, PR και HER2, δεν διαθέτει συγκεκριμένη στοχευμένη θεραπεία και για αυτό τον λόγο θεραπεύεται με χημειοθεραπεία (Miller et al, 2011).

### **Οιστρογόνα και καρκίνος του μαστού**

Τα οιστρογόνα είναι μια ομάδα στεροειδών ενώσεων οι οποίες λειτουργούν ως πρωτογενείς ορμόνες καθορισμού του φύλου στο θήλυ. Τα οιστρογόνα είναι παρόντα σε άνδρες και γυναίκες, τα επίπεδά τους όμως είναι σημαντικά υψηλότερα στις γυναίκες όταν βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία. Παράγονται κυρίως στις ωοθήκες και επίσης μετά από τον μεταβολισμό στεροειδών που παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων. Η 17β-οιστραδιόλη (οιστραδιόλη, E2) είναι το κύριο οιστρογόνο και παράγεται από τεστοστερόνη με τη βοήθεια του ενζυμικού συστήματος του κυτοχρώματος P450. Η οιστραδιόλη συντίθεται κυρίως στις ωοθήκες των γυναικών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αλλά και στο λιπώδη ιστό, εγκέφαλο, οστικά

κύτταρα, μαστικό ιστό και κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου στις μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Στις γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση, τα επίπεδα της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία κυμαίνονται από 40 έως 200-400 pg/ml (από 0,1 έως 0,7-1,5 nM) κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Μετά την εμμηνόπαυση, τα επίπεδα της οιστραδιόλης πέφτουν σε επίπεδα χαμηλότερα από 20 pg/ml.

Ρόλος των οιστρογόνων είναι η ρύθμιση της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της φυσιολογίας της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Εξασκούν ισχυρή μιτογόνο δράση στα κύτταρα του μαστού. Το φυσιολογικό επιθήλιο του μαστικού αδένου υπόκειται σε κυκλικές μεταβολές ανταποκρινόμενο στις μεταβολές των συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Η δράση της οιστραδιόλης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή και έκκριση αυξητικών παραγόντων που διεγείρουν τα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων και οδηγούν σε αύξηση του επιθηλίου μέσω ενός παρακρινικού μηχανισμού. Η υποχώρηση της συγκέντρωσης των ορμονών με την έναρξη του νέου έμμηνου κύκλου, προκαλεί απόπτωση και απομάκρυνση ενός μέρους των επιθηλιακών κυττάρων, διατηρώντας έτσι σταθερό τον αριθμό τους.

Η αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων του μαστικού αδένου που προκαλείται από τα οιστρογόνα θεωρείται ότι αυξάνει την πιθανότητα για εκδήλωση της νόσου. Στις γυναίκες τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων κατά τη γόνιμη περίοδο της ζωής τους και οι θεραπείες υποκατάστασης με οιστρογόνα σε συνδυασμό με προγεστερόνη για την αντιμετώπιση διαφόρων εμμηνοπαυσιακών συνδρόμων αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στο μαστό και στο ενδομήτριο (Marsden, 2002 – Muti, 2004 – Fournier, 2004). Τα οιστρογόνα είναι ισχυρά μιτογόνα των κυττάρων του μαστού. Προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα οιστρογόνα αυξάνουν τον αριθμό των τυχαίων λαθών που παρατηρούνται κατά την αντιγραφή του DNA, επιτρέποντας έτσι την εγκατάσταση του καρκίνου του μαστού και την προαγωγή του (Yager, 2006). Η σχέση των ωοθηκικών ορμονών με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, όταν ο γνωστός Βρετανός G. Beatson ανέφερε σε μια σχετική δημοσίευση στο περιοδικό *Lancet* (1898) ότι η αφαίρεση των ωοθηκών μπορούσε να προκαλέσει συρρίκνωση όγκων του καρκίνου του μαστού. Λίγο αργότερα, ο S. Boyd (1900) ανέφερε σε μια μελέτη ότι στο 1/3 όλων των ασθενών με καρκίνο του

μαστού στις οποίες πραγματοποιήθηκε ωθηκεκτομή παρατηρήθηκε υποχώρηση του καρκίνου. Για τις επόμενες δεκαετίες η ωθηκεκτομή και η επινεφριδιεκτομή υπήρξαν οι κυριότερες μέθοδοι θεραπείας για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

### **Θεραπεία του καρκίνου του μαστού με αντιοιστρογόνα**

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, όπως εφαρμόζεται σήμερα με την προληπτική μαστογραφία, μπορεί να μειώσει τα ποσοστά θνησιμότητας της νόσου. Μια μέθοδος πρόληψης είναι και ο ορμονικός έλεγχος σε γυναίκες υψηλού κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου αποτελεί την πρώτη γραμμή θεραπείας, ενώ η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία είναι δύο σημαντικά μέσα καταπολέμησης της νόσου. Από τότε που ο George Beatson παρατήρησε την υποστροφή μεταστατικού καρκίνου του μαστού μετά από ωθηκεκτομή, αναπτύχθηκαν διάφορες θεραπείες είτε χειρουργικές είτε φαρμακευτικές, βασισμένες σε αυτό το εύρημα. Η αποκάλυψη ότι η δράση των οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού επιτελείται μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα (ER) οδήγησε στην ανάπτυξη αντιοιστρογόνων ως μιας ασφαλούς και απλής εναλλακτικής θεραπείας αντί της χειρουργικής ωθηκεκτομής (Lerner, 1990). Η σύνθεση του πρώτου αντιοιστρογόνου προηγήθηκε της ανακάλυψης του υποδοχέα των οιστρογόνων. Το 1958, οι Lerner και συνεργάτες δημοσίευσαν τη σύνθεση και τις φαρμακολογικές ιδιότητες του μη-στεροειδούς αντιοιστρογόνου εθαμοξυφετόλη (MER-25). Το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της νέας ένωσης ήταν η πλήρης αναστολή της δράσης της οιστραδιόλης στη μήτρα και η έλλειψη μιτογόνου ερεθισμού του ενδομητρίου. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αντιοιστρογονική δράση εξαρτιόταν από τη δοσολογία, υποδεικνύοντας μια σχέση ανταγωνισμού με την οιστραδιόλη για πρόσδεση σε έναν άγνωστο «υποδοχέα». Η ανακάλυψη του ER από τους Jensen και Jacobsen το 1960 άνοιξε το δρόμο για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο δρουν τα αντιοιστρογόνα καθώς και την ανακάλυψη νέων ενώσεων με ανάλογες ιδιότητες.

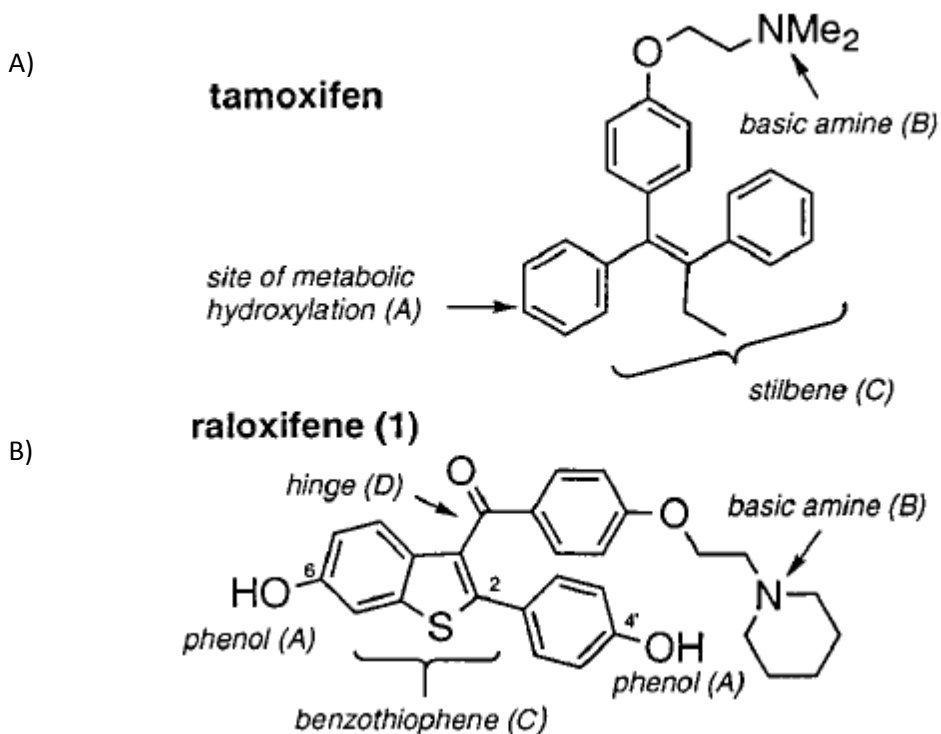
Ακολούθησε η σύνθεση δύο νέων αντιοιστρογονικών ενώσεων, της κλομιφαίνης (Boostanfar, 2001) και της ταμοξιφαίνης (Klopper, 1971 – Williamson, 1973), (Εικόνα 1Α). Η ταμοξιφαίνη αποτελεί σήμερα την πρώτη επιλογή για την ενδοκρινική θεραπεία του καρκίνου του μαστού σε ER-θετικούς όγκους. Το σκεύασμα αυτό (*Novaldex®*) έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για χορήγηση σε όλα τα στάδια του καρκίνου του μαστού καθώς και προληπτικά για τη μείωση των συμβάντων καρκίνου του μαστού σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Η υποστηρικτική θεραπεία με ταμοξιφαίνη για πέντε χρόνια μετά την χειρουργική επέμβαση θεωρείται ότι αποδίδει τα βέλτιστα αποτελέσματα αυξάνοντας σημαντικά την ελευθέρως νόσου επιβίωση (δηλαδή το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την επανεμφάνιση της νόσου) καθώς και τη συνολική επιβίωση των ασθενών (EBCTCG, 1998). Ενώσεις που δρουν ως ανταγωνιστές του ER στο μαστό αλλά ως αγωνιστές του στα οστά ονομάζονται επιλεκτικοί ρυθμιστές του ER (Selective ER modulators, SERMs). Όμως η ταμοξιφαίνη βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση της συχνότητας του καρκίνου της μήτρας καθώς αυξάνει το πάχος του επιθηλίου της, γεγονός που έδωσε αφορμή για την αναζήτηση και ανακάλυψη νέων SERMs.

Άλλο ένα σημαντικό αντιοιστρογόνο είναι η ραλοξιφαίνη, η οποία αναπτύχθηκε, αρχικά, για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης (Εικόνα 1Β). Σε αντίθεση με την ταμοξιφαίνη, η ραλοξιφαίνη έχει βρεθεί ότι μειώνει τη συχνότητα του καρκίνου της μήτρας, αλλά όπως και η ταμοξιφαίνη, προκαλεί εξάψεις καθώς και εμβολές. Εργαστηριακά ευρήματα υποστηρίζουν ότι υψηλές δόσεις ραλοξιφαίνης (300 mg ημερησίως) είναι λιγότερο αποτελεσματικές από την ταμοξιφαίνη σε ζωικά μοντέλα καρκίνου του μαστού (Clemens, 1983). Όμως, με βάση την υπόθεση ότι η ραλοξιφαίνη μπορεί να μειώσει την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού, ως μια θετική παράπλευρη δράση της θεραπείας της οστεοπόρωσης, έχουν αρχίσει και βρίσκονται σε εξέλιξη συστηματικές κλινικές δοκιμές που συγκρίνουν τα ποσοστά συμβάντων καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που παίρνουν ραλοξιφαίνη (Evista) σε σχέση με άλλες που παίρνουν ψευδοσκεύασμα (placebo). Μελέτες έδειξαν μείωση του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου του μαστού κατά 54-70% (Cauley, 2001). Όμως, τα αποτελέσματα του προγράμματος κλινικών δοκιμών STAR (Study of Tamoxifen and Raloxifen, STAR) δείχνουν ότι η ραλοξιφαίνη και η ταμοξιφαίνη έχουν παραπλήσια αποτελεσματικότητα

στην πρόληψη των διηθητικών καρκίνων μαστού, με την ταμοξιφαίνη να είναι πιο αποτελεσματική για την πρόληψη των καρκινωμάτων *in situ* (Vogel, 2006).

Υπάρχουν τέσσερα δομικά στοιχεία μεταξύ ραλοξιφαίνης και ταμοξιφαίνης που ευθύνονται για την ιστοειδικότητα. Το πρώτο είναι η παρουσία φαινολικών υδροξυλίων στη ραλοξιφαίνη τα οποία είναι σημαντικά για τη δέσμευση στον υποδοχέα. Το δεύτερο είναι η φύση της βασικής αμίνης η οποία είναι κριτικής σημασίας για τον ανταγωνισμό. Η μετατροπή από μια ακυκλική ολεφίνη στην ταμοξιφαίνη σε μια δομή που περιλαμβάνει το δακτύλιο του βενζοθειοφαινίου είναι το τρίτο δομικό στοιχείο. Το τελευταίο και το πιο σημαντικό είναι η καρβονυλική άρθρωση που βρίσκεται μεταξύ της βασικής πλευρικής αλυσίδας και της ολεφίνης (Εικόνα, 1), (Grese, 1997).

**Εικόνα 1A και 1B: Δομικές διαφορές τη ταμοξιφαίνης (A) και της ραλοξιφαίνης (B)**



(Grese et al, 1997)

Εκτός από τους SERMs, μια άλλη κατηγορία αντιοιστρογόνων είναι τα λεγόμενα «καθαρά αντιοιστρογόνα» τα οποία ανακαλύφθηκαν από τους Wakeling και συνεργάτες (1987). Η ένωση ICI182,780 γνωστή, επίσης, ως fulvestrant ή με την εμπορική ονομασία *Faslodex*® είναι το πιο ισχυρό αντιοιστρογόνο αυτής της κατηγορίας (Wakeling, 1991) και ήδη χορηγείται σε ασθενείς που παρουσίασαν αντοχή στην ταμοξιφαίνη. Τα καθαρά αντιοιστρογόνα έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης από τα SERM. Η αγωνιστική τους δράση είναι μηδενική καθώς η πρόσδεσή τους στον ER προκαλεί αποδόμηση του τελευταίου από το πρωτεάσωμα. Το ενδεχόμενο χρήσης του *Faslodex* για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού θα ήταν επομένως πολύ ελκυστικό, εάν δεν υπήρχαν οι πολύ σοβαρές παρενέργειες της οστεοπόρωσης και των καρδιαγγειακών νόσων που συνδέονται με την πλήρη απαλοιφή της σηματοδότησης μέσω του ERα. Παρόλα τα μειονεκτήματα, ενδείκνυται για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού σε ασθενείς ανεξάρτητα αν έχουν δεχθεί ή όχι ταμοξιφαίνη για 5 χρόνια (Howell, 2002 – Osborne, 2002).

### **Αντοχή στη θεραπεία με αντιοιστρογόνα**

Παρόλο που οι ενδοκρινικές θεραπείες (αρχικά, κυρίως με ταμοξιφαίνη *Nolvadex*® - ανταγωνιστές του ER και δευτερευόντως με φουλβεστράνη *Faslodex*® - αποσταθεροποιητής του ER) έχουν αλλάξει τη φυσική ιστορία του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού, ένα σημαντικό ποσοστό του, είτε δεν αποκρίνεται εξαρχής στην ταμοξιφαίνη ή την φουλβεστράνη, είτε αναπτύσσει αντίσταση προϊούσης της θεραπείας (επίκτητη αντίσταση), καθώς >30% των ασθενών με ER θετικό (+) καρκίνο του μαστού σε πρώιμα στάδια, υποτροπιάζουν μέσα σε 15 χρόνια ακολουθώντας ανοσοενισχυτική θεραπεία με ταμοξιφαίνη και παράλληλα περίπου 20% των ασθενών στους οποίους χορηγείται κάποιος αρωματικός αναστολέας (AI) υποτροπιάζει μέσα σε 9 χρόνια (Miller et al, 2011). Η αντίσταση αυτή, συχνά οφείλεται σε ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K λόγω αυξημένης ενεργοποίησης ή έκφρασης των IGF-1R ή/και EGFR/HER2 ή/και

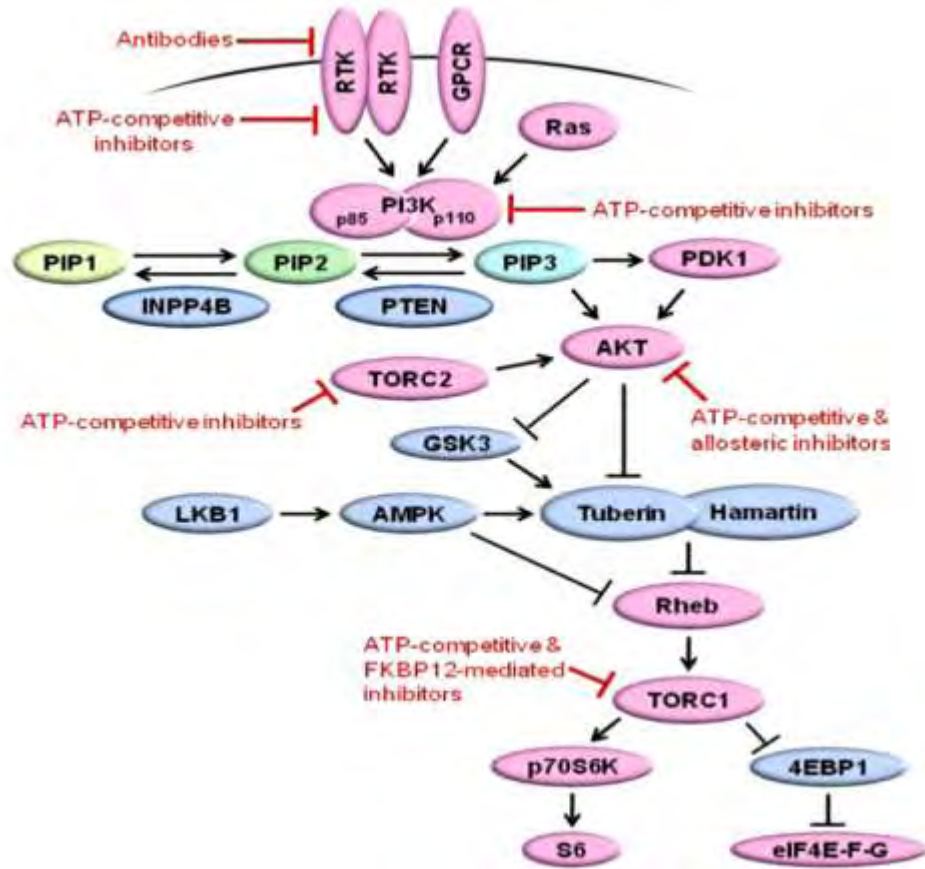


απορύθμισης του μονοπατιού PI3K λόγω μετάλλαξης της PIK3CA ή/και απάλειψης PTEN.

### **Σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφοινοσιτιδικής 3-κινάσης (PI3K) και ER θετικός (+) καρκίνος του μαστού**

Το μονοπάτι της φωσφοινοσιτιδικής 3-κινάσης (PI3K) είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο μονοπάτι στον καρκίνο του μαστού, με >70% των όγκων να εμφανίζουν γενετικές μεταλλαγές σε τουλάχιστον ένα συστατικό του μονοπατιού (Miller et al, 2011). Αυτές αφορούν μετάλλαξη ή και ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις καταλυτικές υπομονάδες p110α (PIK3CA) και p110β (PIK3CB) της PI3K, την ρυθμιστική υπομονάδα p85α (PIK3R1) της PI3K, υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης (RTKs), όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER)2 (ERBB2) και ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR)1, τον ενεργοποιητή της PI3K K-Ras, τους τελεστές της PI3K AKT1, AKT2 καθώς και την εξαρτώμενη από το φωσφοινοσιτιδίο, κινάση 1 (PDK1) και απώλεια της λιπιδικής φωσφατάσης PTEN (**Πίνακας 1**). Η PI3K ενεργοποιείται από υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης και υποδοχείς που δεσμεύονται με G πρωτεΐνες. Η PI3K φωσφορυλιώνει το φωσφοινοσιτιδικό 4,5-διφωσφορικό (PIP2) έτσι ώστε να παραχθεί το φωσφοινοσιτιδικό 3,4,5-τροφωσφορικό (PIP3). Στη συνέχεια, το PIP3 «επιστρατεύει» στην πλασματική μεμβράνη πρωτεΐνες με περιοχές PH (pleckstrin homology domain), όπως η PDK1 και η AKT, η ενεργοποίηση των οποίων, οδηγεί στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στην κυτταρική επιβίωση. Αρνητική ρύθμιση του παραπάνω βιοχημικού μονοπατιού, μπορεί να επιτευχθεί από το PTEN και το INPP4B, τα οποία αποφωσφορυλιώνουν το PIP3 σε PIP2, αντίστοιχα (**Εικόνα 2**).

Εικόνα 2: Διάγραμμα του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K



Οι υποκινητές και καταστολείς όγκων σημαίνονται με ροζ και μπλε, αντίστοιχα. Οι κόμβοι που στοχεύονται από φάρμακα σε κλινική εφαρμογή, παρουσιάζονται με κόκκινο. AMPK: AMP-activated protein kinase, GPCR: G-protein-coupled receptor, GSK3: glycogen synthase kinase 3, INPP4B: inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, LKB1: liver kinase B1, PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, PIP1: phosphatidylinositol monophosphate, PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PTEN: phosphatase and tensin homolog, RTK: receptor tyrosine kinase (Miller et al, 2011)

Οι ισομορφές της τάξης IA PI3K είναι ετεροδιμερείς λιπιδικές κινάσες, οι οποίες περιέχουν μια καταλυτική υπομονάδα, p110, και μία ρυθμιστική υπομονάδα, p85. Τα τρία γονίδια PIK3CA, PIK3CB και PIK3CD κωδικοποιούν τα ομόλογα p110α, p110β, και p110δ ισοένζυμα, αντίστοιχα. Η έκφραση του p110δ περιορίζεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και του αιμοποιητικού συστήματος, ενώ αυτή των p110α και p110β υπομονάδων εκφράζεται παντού. Οι μεταλλάξεις του PIK3CA γονιδίου είναι οι πιο συχνές γενετικές μεταλλάξεις αυτού του μονοποπατιού στον καρκίνο του μαστού, όπου  $\geq 80\%$  συμβαίνουν στις ελικοειδείς περιοχές (E542K και E545K) και στις περιοχές κινάσης (H1047R) της p110α. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις, προσδίδουν αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα μέσω διαφόρων μηχανισμών, αλλά και οι δύο επάγουν χαρακτηριστικά κυτταρικού μετασχηματισμού, τα οποία περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό ανεξάρτητο αυξητικών παραγόντων και πρόσφυσης καθώς και αντοχή σε θάνατο λόγω μη πρόσφυσης (anoikis). Παροδική-ρυθμιζόμενη έκφραση της μεταλλαγμένης περιοχής H1047R στον μαστικό αδένα διαγονιδιακών ποντικών επάγει τον σχηματισμό όγκου στον μαστό. Γενετική ή φαρμακολογική απενεργοποίηση της έκφρασης του PIK3CA H1047R οδήγησε σε εξαφάνιση των όγκων. Παρόλα αυτά, σε μερικά οι όγκοι επανήλθαν και ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στην αναστολή της PI3K μέσω της υπερέκφρασης του c-myc.

Στον καρκίνο του μαστού συνυπάρχουν οι μεταλλάξεις στο μονοπάτι της PI3K, υποδεικνύοντας ότι αυτές προσδίδουν κάποιο πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα μέσω διάφορων μηχανισμών. Για παράδειγμα, κάποιες φορές συμβαίνουν μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA σε όγκους του μαστού, οδηγώντας σε απώλεια του PTEN ή σε υπερέκφραση του HER2. Οι μεταλλάξεις της καταλυτικής υπομονάδας p110α, του PIK3CA γονιδίου είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη των όγκων, ενώ η p110β φαίνεται να μεσολαβεί στην ογκογένεση κυττάρων με ανεπαρκή ποσότητα PTEN.

**Πίνακας 1: Μεταλλάξεις του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K στον καρκίνο του μαστού**

Gene (protein)	Alteration	Effect on signaling	Frequency			Reference
			Luminal (ER+)	HER2+	Basal (TN)	
<i>ErbB2</i> (HER2)	Gene amplification or overexpression	Hyperactivation of ErbB2 signaling (PI3K, MEK)	10%	~100%	0%	[30-32]
<i>PTEN</i>	Loss-of-function mutation or reduced expression	Hyperactivation of PI3K signaling	29-44%	22%	67%	[6,8,104,105]
<i>PIK3CA</i> (p110α/PI3K)	Activating mutation	Hyperactivation of PI3K signaling	28-47%	23-33%	8-25%	[6,52,66-68, 105-107]
<i>PIK3CB</i> (p110β/PI3K)	Amplification	Unknown		5% of all cases		[62]
<i>IGF1R</i> and <i>INSR</i> (IGF-1R, InsR)	Receptor activation, <i>IGF1R</i> amplification	Activates IGF-1R/InsR signaling (PI3K, MEK)	41-48%	18-64%	42%	[108,109]
<i>FGFR1</i>	Amplification, activating mutation	Hyperactivation of FGFR signaling (PI3K, MEK)	8.6-11.6%	5.4%	5.6%	[63,110]
<i>RPS6K1</i> (p70S6K)	Amplification	Unknown		3.8-12.5% of all cases		[111]
<i>INPP4B</i>	Reduced expression or genomic loss	Hyperactivation of PI3K signaling	10-33%	54%	53%	[64,112]
<i>PIK3R1</i> (p85α/PI3K)	Inactivating mutation	Derepression of catalytic activity of p110α		2% of all cases		[113]
<i>AKT1</i>	Activating mutation	Hyperactivation of AKT	2.6-3.8%	0%	0%	[65,66, 106,114]
<i>AKT2</i>	Amplification	Hyperactivation of AKT		2.8% of all cases		[115]
<i>EGFR</i>	Amplification	Hyperactivation of EGFR signaling (PI3K, MEK)		0.8% of all cases		[116]
<i>PDK1</i>	Amplification or overexpression	Hyperactivation of PDK1 (AKT, TORC1)	22%	22%	38%	[117]
<i>KRAS</i>	Activating mutation	Hyperactivation of PI3K and MEK		4-6% of all cases		[118,119]

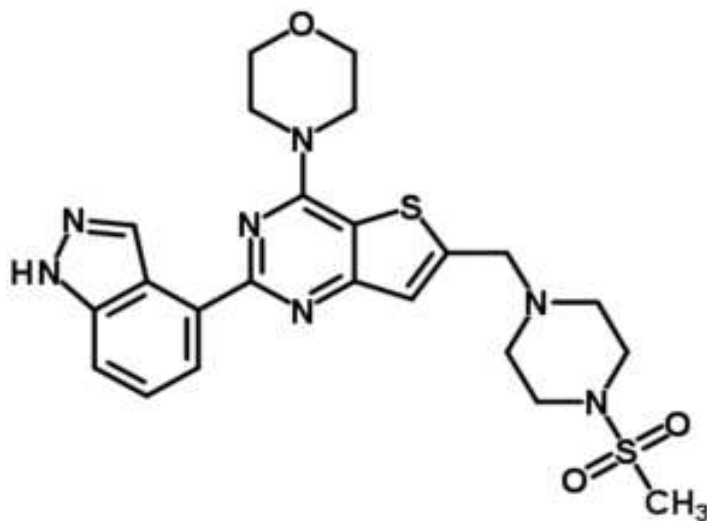
*EGFR: epidermal growth factor receptor, ER: estrogen receptor, FGFR: fibroblast growth factor receptor, IGF-1R: insulin-like growth factor-1 receptor, INPP4B: inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, InsR: insulin receptor, MEK: mitogen-activated protein kinase kinase, PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, TN: triple negative (Miller et al, 2011)*

### Ανάπτυξη αναστολέων της PI3K σε κλινικό στάδιο

Αρκετά φάρμακα που στοχεύουν πολλαπλά στάδια του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K (PI3K, AKT, mTOR) εξετάζονται κλινικά. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ουσίες που μιμούνται τη δράση του ATP και δεσμεύονται ανταγωνιστικά και αναστρέψιμα στη θέση σύνδεσης του ATP της p110 καταλυτικής υπομονάδας της PI3K. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει αναστολείς που δεσμεύονται αλλοστερικά και ανταγωνίζονται τη σύνδεση του ATP στις τρεις ισομορφές της AKT, ουσίες οι οποίες έχουν επίσης δείξει αντικαρκινική δράση σε προ-κλινικά μοντέλα. Αλλοστερικοί αναστολείς, όπως ο MK-2206, δεσμεύονται στην PH περιοχή και/ή στην ευέλικτη περιοχή της AKT έτσι ώστε να προωθήσουν την απενεργοποιημένη διαμόρφωση της AKT αποτρέποντας έτσι την περαιτέρω μεταφορά (και ενεργοποίησή) της στην πλασματική μεμβράνη (Πίνακας 2).

Η ένωση GDC-0941 (Εικόνα 3), ένα μικρό μόριο με υψηλή ειδικότητα σύνδεσης στη θέση δέσμευσης του ATP της PI3K, αποτελεί τον κυριότερο αναστολέα της και ανήκει στην πρώτη ομάδα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

**Εικόνα 3: Δομή του αναστολέα GDC-0941**



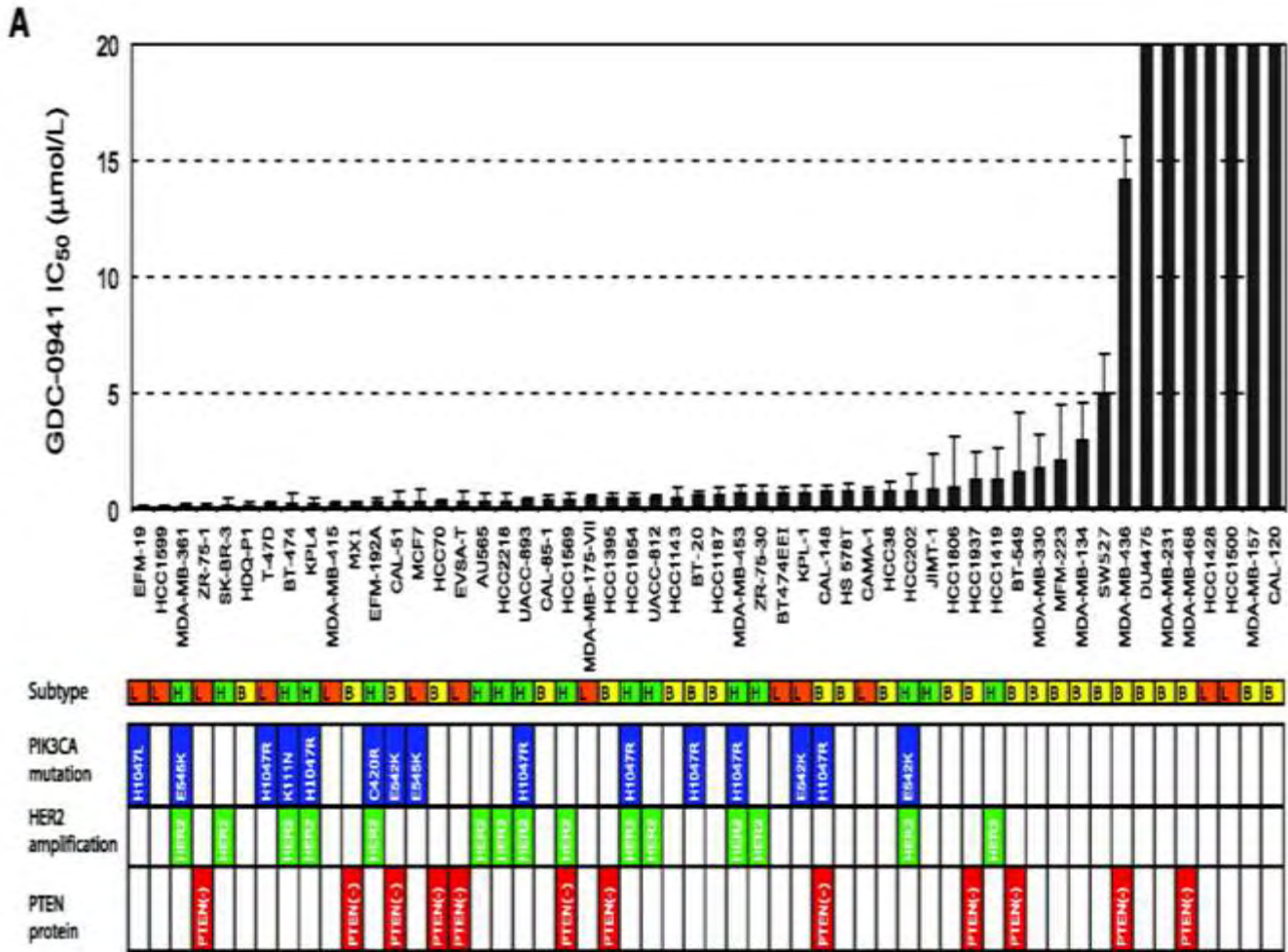
Η ειδικότητα του GDC-0941 είναι 300 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με άλλες κινάσες (288 σε αριθμό) (Folkes et al, 2008). Καταστέλλει όλες τις ισομορφές της PI3K κλάσης I, κυρίως όμως τις  $\alpha$  &  $\gamma$ , και έχει επιλεκτικότητα για την ισομορφή PIK3CA σε σχέση με την mTOR. Η σύνδεσή του στη θέση δέσμευσης του ATP της PI3K, αποτρέπει το σχηματισμό της PIP3, βήμα κλειδί για την πορεία του βιοχημικού μονοπατιού της PI3K. Η δράση του GDC-0941 έχει μελετηθεί in vitro σε πολυάριθμες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, είτε αυλικού τύπου που δεν εκφράζουν το ογκογονίδιο HER2 (Luminal, L), είτε σε HER2-θετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (HER2, H), ή βασικού τύπου (Basal, B), με τις αντίστοιχες μεταλλάξεις PIK3CA και PTEN (**Εικόνα 4**). Σε προκλινικές μελέτες σε μεγάλο αριθμό καρκινικών μοντέλων in vivo, το GD-0941 υπέδειξε σημαντική αντικαρκινική δράση, συμπεριλαμβανομένης της παύσης της ανάπτυξης των όγκων, την προώθηση του κυτταρικού θανάτου και την αναστολή αγγειογένεσης (**Εικόνα 5**).

**Πίνακας 2: Αναστολείς της PI3K σε κλινική ανάπτυξη**

<b>Kinase target</b>	<b>Drug</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Mechanism of action</b>
Pan-PI3K	BKM120	Novartis	ATP-competitive
	XL-147	Exelixis	ATP-competitive
	PX-866	Oncothyreon	ATP-competitive
	GDC-0941	Genentech/Roche	ATP-competitive
	CH5132799	Chugai Pharma	ATP-competitive
p110δ-specific	CAL-101	Calistoga	ATP-competitive
p110α-specific	BYL719	Novartis	ATP-competitive
	GDC-0032	Genentech/Roche	ATP-competitive
	INK-1117	Intellikine	ATP-competitive
PI3K/mTOR	PKI-587	Pfizer	ATP-competitive
	BEZ235	Novartis	ATP-competitive
	BGT226	Novartis	ATP-competitive
	PF-4691502	Pfizer	ATP-competitive
	GDC-0980	Genentech/Roche	ATP-competitive
	XL-765	Exelixis	ATP-competitive
	SF1126	Semafor	ATP-competitive/peptide-conjugate
	GSK1059615	GSK	ATP-competitive
	TORC1	Everolimus (RAD001)	Novartis
Temsirolimus (CCI-779)		Wyeth/Pfizer	Indirect, FKBP12-mediated
Ridaferolimus (AP-23573)		Merck/Ariad	Indirect, FKBP12-mediated
TORC1/TORC2	INK-128	Intellikine	ATP-competitive
	OSI-027	OSI Pharm.	ATP-competitive
AKT	AZD-8055	Astrazeneca	ATP-competitive
	AZD5363	Astrazeneca	ATP-competitive
	GDC-0068	Genentech/Roche	ATP-competitive
	GSK690693	GSK	ATP-competitive
	MK-2206	Merck	Allosteric
	VQD002	Vloquest	ATP-competitive

mTOR: mammalian target of rapamycin, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

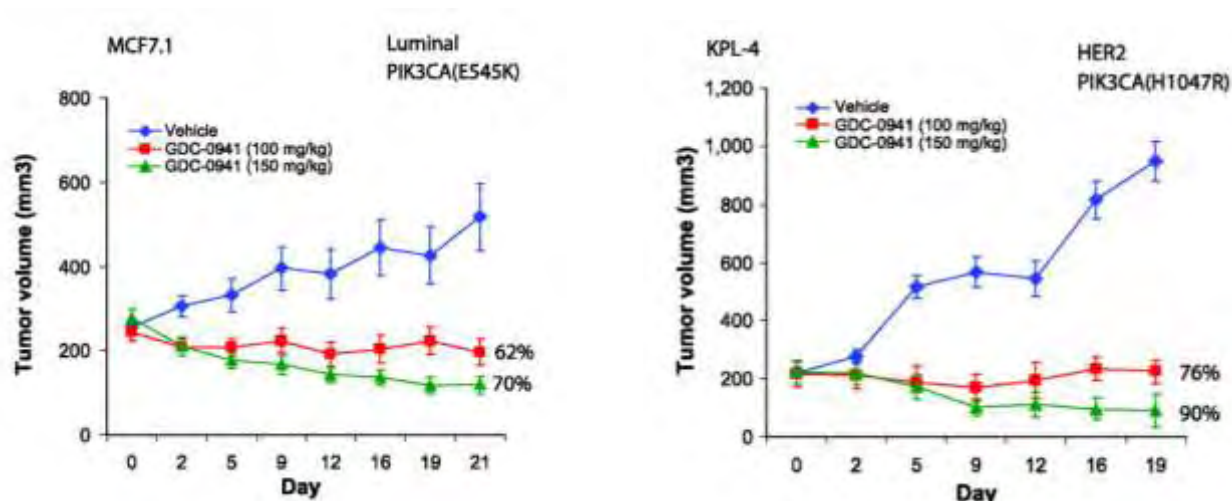
Εικόνα 4: Τιμές IC<sub>50</sub> του αναστολέα GDC-0941 για 54 κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού



(L): κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού αυλικού τύπου, (H): κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που εκφράζει το ογκογονίδιο *HER2*, (B): κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού βασικού τύπου (O'Brien C et al, 2010).



**Εικόνα 5: In vivo αντικαρκινική δράση του αναστολέα GDC-0941**



Μεταβολή του όγκου ξενοεμφυτευμάτων των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού MCF-7 (ER+/HER2-, E545K) και KPL-4 (ER+/HER2+, H1047R) μετά τη χορήγηση GDC-0941 100-150 mg/Kg βάρους σώματος. Η % καταστολή της ανάπτυξης του όγκου δηλώνεται στα δεξιά (O'Brien C et al, 2010).

### **Μετάλλαξη του μονοποτιού της PI3K και αντοχή στη θεραπεία με αντιοιστρογόνα**

Το μονοπάτι της PI3K εκτός από τον ρόλο που παίζει στην επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων, αλληλεπιδρά με τον οιστρογονικό υποδοχέα άμεσα ή έμμεσα. Η φωσφορυλίωση του ER στη Ser167 από την AKT ή την p70S6K αυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του ER που επάγεται από το οιστρογόνο και την ταμοξιφαίνη καθώς και την ανεξάρτητη από τον προσδέτη μεταγραφή του οιστρογονικού υποδοχέα ER. Επιπροσθέτως, η PI3K και η ογκοπρωτεΐνη Ras συμβάλλουν στην λειτουργική διαμόρφωση του ER και των μεταγραφικών παραγόντων. Κλινικά δεδομένα επίσης, υποδεικνύουν ότι ο ER είναι πιθανό να ενεργοποιεί το μονοπάτι της PI3K. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα σε μεγάλη ομάδα πειραματικών κυτταρικών μοντέλων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων με απάλειψη της πρωτεΐνης PTEN καθώς και σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες HER2, IGF-1R και σε αυτά που φέρουν μεταλλάξεις της

AKT1. Καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν αντοχή στην ενδοκρινική θεραπεία εμφανίζουν υπερέκφραση των IGF-1R, InsR, HER2, EGFR, καθώς επίσης και υπερενεργοποίηση των PI3K/AKT/mTOR. Αναστολή του μονοπατιού της PI3K αντιστρέφει τέτοιου είδους αντοχή. Παρόλα αυτά, αναστολή της PI3K ή της AKT μπορεί να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση των RTKs, η οποία οδηγεί σε αντοχή στην ενδοκρινή θεραπεία. (Miller et al, 2011)

Ο αυλικός καρκίνος τύπου B θεωρείται περισσότερο επιθετικός και ανθεκτικός στην ενδοκρινή θεραπεία. Ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K σχετίζεται με αυλικό καρκίνο του μαστού τύπου B και χειρότερη έκβαση της νόσου. Επιπλέον, η περαιτέρω σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού της PI3K φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον ER, με έναν μη προσδετοεξαρτώμενο τρόπο, καθιστώντας τον υποδοχέα αυτό μη αποκρινόμενο στα αντιοιστρογόνα (ταμοξιφαίνη ή άλλοι αναστολείς αρωματάσης). Αντιθέτως, ογκογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο της PIK3CA, δηλαδή στο γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της PI3K, σχετίζονται με τον αυλικό καρκίνο του μαστού τύπου A, αυξημένη συγκέντρωση ER και καλύτερη έκβαση της νόσου σε ασθενείς που λαμβάνουν ενδοκρινή θεραπεία. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με ασθενή ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K (πιθανόν λόγω ρύθμισης μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης). Από την άλλη μεριά, απώλεια της PTEN (phosphatase and tensin homolog) πρωτεΐνης ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B (AKT) και οδηγεί σε αντοχή στην ενδοκρινή θεραπεία. Μερική καταστολή της PTEN πρωτεΐνης κατά 20%, μπορεί να οδηγήσει σε όγκους του μαστού με μεγάλη διεισδυτικότητα. Η έκφραση της πρωτεΐνης PTEN είναι μειωμένη σε >50% των ER θετικών (+) καρκίνων του μαστού. Παράλληλα, μια μελέτη του TCGA (The Cancer Genome Atlas) έδειξε ότι οι μεταλλάξεις ή η απώλεια του γονιδίου PTEN είναι διπλάσιες σε συχνότητα στον αυλικό καρκίνο του μαστού τύπου B από τον τύπου A, σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις του PIK3CA γονιδίου όπου εμφανίζονται συχνότερα στον αυλικό καρκίνο του μαστού τύπου A (Fu et al, 2014).

**Συμβολή των αναστολέων της PI3K, στην καταστολή της αντίστασης των κυττάρων του καρκίνου του μαστού στα αντιοιστρογόνα**

Προκλινικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η στόχευση του οιστρογονικού υποδοχέα ER καθώς και της PI3K ενδέχεται να παρουσιάζει συνέργεια, γεγονός που προτείνει ως πιο αποτελεσματικό τον συνδυασμό αντιοιστρογόνων με αναστολείς του μονοπατιού της PI3K σε αντίθεση με τη χορήγηση μόνο αντιοιστρογόνων. (Miller et al, 2011)

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Δοθέντος ότι οι IGF-1R, EGFR/HER2 και PI3K αλληλεπιδρούν με τον οιστρογονικό υποδοχέα ER, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της δραστηριότητας υποψήφιων αλλοστερικών αναστολέων της PIK3CA E545K, καθώς και γνωστών ανταγωνιστικών αναστολέων του μονοπατιού της PI3K, όπως ο αναστολέας GDC-0941 (PI3K), κατά κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (ΚΣΚΜ) στην απουσία ή την παρουσία ταμοξιφαίνης. Περισσότερο χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που ανήκουν στον αυλικό τύπο A (ER+ ή/και PR+, HER2- / κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού: ZR75.1, MCF7). Ο Πίνακας 1 περιγράφει τα χαρακτηριστικά PIK3CA, PTEN, HER2, EGFR, ER και p53 των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της δραστηριότητας των υποψήφιων αναστολέων της PIK3CA. Όλες οι ΚΣΚΜ του Πίνακα 1 πολλαπλασιάζονται ως μονή στοιβάδα (τα κύτταρα T47D παρουσιάζονται για σύγκριση). Οι αυλικού τύπου καρκινικές κυτταρικές σειρές του Πίνακα 1 εμφανίζουν αντίσταση στην ταμοξιφαίνη είτε μόνιμα (T47D, ZR75.1) είτε ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (MCF7). Οι συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση PIK3CA ή PTEN. Όλες έχουν μετάλλαξη του p53 πλην της MCF7 που είναι ομόζυγη για το p53 άγριου τύπου. Τα κύτταρα T47D φέρουν τη μετάλλαξη H1047R σε 6 αλλήλια ενώ φέρουν και ένα αλλήλιο PIK3CA άγριου τύπου. Τα MCF7 φέρουν τη μετάλλαξη PIK3CA E545K. Τα κύτταρα ZR75.1 φέρουν PIK3CA άγριου τύπου αλλά έχουν απάλειψη του PTEN. Στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ έγινε πλασματική (mock) και πραγματική απάλειψη (KD) της έκφρασης PTEN στα κύτταρα T47D και MCF7. Οι ομάδες των κλώνων mock και KD συγκρίθηκαν μεταξύ τους καθώς και με τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού αγρίου τύπου, ως προς την ευαισθησία τους σε γνωστούς αναστολείς της PI3K παρουσία και απουσία ταμοξιφαίνης και φουλβεστράνης. Το εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ διαπίστωσε ότι ο γνωστός ανταγωνιστικός αναστολέας GDC-0941 είναι μη επιλεκτικός έναντι των ZR75.1, T47D και MCF7 και επομένως μπορεί να λειτουργεί ως αναστολέας αναφοράς στα πειράματα ελέγχου των υποψήφιων αλλοστερικών αναστολέων της PIK3CA E545K. Η παρούσα εργασία αξιοποίησε τα κύτταρα MCF7 και ZR75.1 καθώς και τον αναστολέα

GDC-0941 για in vitro έλεγχο 20 υποψήφιων αναστολέων της PIK3CA E545K, που είχαν προκύψει με in silico σάρωση χημικών βιβλιοθηκών, σε αναζήτηση αλλοστερικών αναστολέων της PIK3CA E545K.

**Πίνακας 1 : Μοριακά χαρακτηριστικά και ευαισθησία στην υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT) των ΚΣΚΜ που χρησιμοποιήθηκαν**

<b>ΚΥΤΤΑΡΑ</b>	<b>MCF-7</b>	<b>ZR-75.1</b>	<b>T47D</b>
ΕΚΦΡΑΣΗ ER	+	+	+
ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ HER2	-	-	-
ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ EGFR	-	-	-
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ p53	-	+	+
ΑΠΑΛΕΙΨΗ PTEN	-	+	-
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ PIK3CA	E545K	-	H1047R
<b>ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΟΗΤ</b>	(±)	+	+

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **Υλικά**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν από τις κάτωθι αναφερόμενες εταιρείες:

- Τα υλικά της καλλιέργειας των κυττάρων (MEM, RPMI 1640) από τη Biochrom (Germany).
- Η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη από την Gibco (Invitrogen, USA).
- Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS από την Gibco (Invitrogen, USA).
- Τα πλαστικά είδη της κυτταροκαλλιέργειας (τρυβλία διαμέτρου 100mm, 60mm και 35mm, 60mm πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων) από τη Nunc (Denmark).
- Το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Η E2 από την Steraloids (USA).
- Τα ICI182,780 από την Tocris-Bioscience (USA).
- Η μεθανόλη από την Carlo Erba Reagents (Italy).
- Το οξικό οξύ από την BDH, VWR International Ltd (England).
- Η ινσουλίνη από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Η αιθανόλη από τη Merck (Germany).
- Η ταμοξιφαίνη από την Sigma Aldrich (Germany).

### **Κυτταρικές σειρές**

- MCF-7: Ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού. (ATCC, American Tissue Culture Collection). Εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς και υποδοχείς προγεστερόνης, ενώ δεν εκφράζουν την HER2/neu πρωτεΐνη. Φέρουν τη μετάλλαξη PIK3CA E545K.
- MCF-7\_PTEN\_KD: MCF-7 κύτταρα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί σίγαση της έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN με τη τεχνική shRNA.
- MCF-7\_mock\_KD: MCF-7 κύτταρα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί πλασματική (mock) σίγαση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN με τη τεχνική shRNA.
- ZR-75.1: Ανθρώπινα κύτταρα πορογενούς καρκινώματος μαστού (ATCC, American Tissue Culture Collection). Εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς και φέρουν αγρίου τύπου PIK3CA, όμως έχουν απάλειψη της έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN.

### **Αποστείρωση**

Η καλλιέργεια των κυττάρων απαιτεί αποστειρωμένα υλικά. Τα γυάλινα καθώς και τα πλαστικά σκεύη πολλαπλών χρήσεων αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 30 min (υγρή αποστείρωση).

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Διαδικασίες για την καλλιέργεια των κυττάρων**

Όλες οι διαδικασίες της καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν κάτω από στείρες συνθήκες, ενώ στείρα ήταν επίσης και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία petri διαμέτρου 100mm και 60mm με 10ml πλήρους υλικού, στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στα ακόλουθα θρεπτικά υλικά:

MCF-7 αγρίου τύπου (wild type, wt), MCF-7\_PTEN\_KD, MCF-7\_mock\_KD: MEM\* χωρίς ερυθρό της φαινόλης παρουσία 10% FBS, 1mg/L ινσουλίνης και 0.1nM οιστραδιόλης (E2) (πλήρες υλικό καλλιέργειας).

ZR-75.1: RPMI-1640 1x + Glutamax\*\* παρουσία 2.5g D-γλυκόζης, 10% FBS, 1mg/L ινσουλίνης και 0.1nM οιστραδιόλης (E2).

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm, με 10 ml πλήρους υλικού, στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>.

\* (για 1L υλικό): 1 μπουκάλι σκόνη MEM, 2% sodium bicarbonate 7.5%, 1% L- γλουταμίνη, 1% sodium pyruvate 100mM, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 10,000U

\*\* (για 1L υλικό): 1L RPMI-1640 1x + Glutamax, 1% sodium pyruvate 100mM, 1% HEPES 1M, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 10,000U



### **Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με τρυψίνη (τρυψινοποίηση)**

Η ανακαλλιέργεια με τρυψίνη πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το μεγαλύτερο ποσοστό του ταπήτιου του τρυβλίου (70-80% πληρότητα), καθώς δεν υπάρχει άλλος χώρος προκειμένου να αναπτυχθούν περαιτέρω. Σε πρώτη φάση, παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και ελέγχεται η μορφολογία τους αλλά και η πληρότητα του ταπήτιου τους (confluency). Έπειτα απομακρύνεται (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1X (14,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /80,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5, 2,68 mM KCl, 136,7 mM NaCl). Στη συνέχεια απομακρύνεται το PBS και προστίθεται 1,5 ml διαλύματος τρυψίνης-EDTA 0,25 (ανάλογα με την κυτταρική σειρά) και ανακινείται το τρυβλίο προκειμένου να καλυφθεί όλη η επιφάνειά του με το διάλυμα της τρυψίνης. Ακολουθεί επώαση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα (ανάλογα με την κυτταρική σειρά, απαιτείται και διαφορετικός χρόνος επώασης, από 2-10 min). Μετά το πέρας της επώασης προστίθεται τριπλάσιος όγκος θρεπτικού διαλύματος έτσι ώστε να σταματήσει η δράση της τρυψίνης. Λαμβάνεται στο τέλος η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1/3-1/2) για το νέο τρυβλίο και προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού υλικού. Τέλος, διασπείρονται τα κύτταρα ομοιόμορφα στο τρυβλίο ώστε να αναπτυχθούν. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα σε συγκεκριμένα πειράματα.

### **Προετοιμασία των ενώσεων**

Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διαλύθηκαν αρχικά σε διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση  $10^{-2}$  M και στη συνέχεια αραιώθηκαν διαδοχικά με διαλύτη για την παρασκευή ενδιάμεσων αραιώσεων των ενώσεων σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη αυτής που ελέγχθηκε. Η τελική αραιώση προέκυψε με την προσθήκη 1 μl της ενδιάμεσης αραιώσεως σε DMSO σε 1 ml υλικού καλλιέργειας, διασφαλίζοντας ότι η συγκέντρωση του DMSO στην οποία εκτέθηκαν τα κύτταρα δεν ξεπερνούσε το 0,1%.

### **Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού**

Το κρυσταλλικό ιώδες είναι μια χημική ένωση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων σε καλλιέργειες μονοστιβάδας ως συνάρτηση της βαφής που απορροφήθηκε από τα κύτταρα. Πλέον, το κρυσταλλικό ιώδες χρησιμοποιείται για την απόκτηση ποσοτικής πληροφορίας όσον αφορά τη σχετική πυκνότητα των κυττάρων που προσκολλήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας. Η χρώση αυτή βάφει το DNA των κυττάρων και το χρώμα που προκύπτει εξαρτάται από το pH του διαλύματος (Vega-Avila, 2011). Κατά τη διάρκεια της διαλυτοποίησης, η ποσότητα που απορροφάται από την κυτταρική μονοστιβάδα και η ένταση του χρώματος που παράγονται είναι ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων. Τα πειράματα προσδιορισμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επώαστηκαν για 5 min με μεθανόλη 100 μl προκειμένου αυτά να μονιμοποιηθούν. Κατόπιν, τα κύτταρα επώαστηκαν με 50 μl κρυσταλλικού ιώδους για 10 min. Ακολούθως, έγιναν 4 εκπλύσεις με νερό βρύσης (150 μl ανά θέση) και αφού η πλάκα στέγνωσε, ακολούθησε επώαση με 100 μl οξικού οξέος 33% για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550 nm πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πολυμετρητή Safire II (TECAN).

### **Προσδιορισμός του αριθμού ζώντων και νεκρών κυττάρων με χρήση μικροσκοπίου**

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζώντων και νεκρών κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωστική trypan blue. Το trypan blue ανήκει στην κατηγορία των χρωστικών που δεν διαπερνούν την μεμβράνη των ζώντων κυττάρων και χρωματίζουν μόνο τα νεκρά ή αποδιοργανωμένα κύτταρα. Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας συλλέχθηκαν όλα τα κύτταρα, προσκολλημένα και μη. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε το υλικό καλλιέργειας στο οποίο μπορεί να αιωρούνταν κύτταρα και προστέθηκαν σε αυτό

και τα προσκολλημένα κύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν με τρυψινοποίηση. Μέρος του τελικού εναιωρήματος των κυττάρων αραιώθηκε με προσθήκη ίσου όγκου 0,4% Trypan blue σε PBS και έγινε καταμέτρηση χρησιμοποιώντας αιμοκυττόμετρο (Neubauer). Ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος υπολογίστηκε από τον τύπο:

**Αριθμός κυττάρων/ml εναιωρήματος = αριθμός κυττάρων x αραιώση x 10000**

### **Λύση κυττάρων με RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay buffer), συλλογή και απομόνωση πρωτεϊνών**

Για τη συλλογή δειγμάτων για την ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών από κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD και MCF-7\_mock\_KD. Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 θέσεων (σε πλήρες θρεπτικό υλικό) και επώαστηκαν με τις υπό εξέταση ενώσεις για 1 ώρα. Έπειτα απομακρύνθηκε (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και ακολούθησε μία πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1x. Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων με RIPA (150 Mm sodium chloride, 1% NP-40 ή Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 50 Mm Tris, Ph 8.0 + αναστολείς πρωτεασών) και εναπόθεση της πλάκας στον πάγο για ~ 5min. Ακολούθησε η συλλογή των κυττάρων σε eppendorf και η αποθήκευσή τους στους -80°C. Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών έγινε επώαση υπό ανάδευση για 30min στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 20 min στους 4°C. Ακολούθησε η μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούριο eppendorf και η προσθήκη Laemmli buffer. Τέλος, τα δείγματα επώαστηκαν στους 99°C για 10 min.

### **Δοκιμασία Bradford**

Η δοκιμασία Bradford είναι μια χρωματομετρική διαδικασία μέτρησης της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, η οποία βασίζεται στην αλλαγή της

απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η κόκκινη μορφή της χρωστικής μεταρέπεται σε μπλε, όταν αυτή δεσμεύεται στις πρωτεΐνες. Έτσι η ποσότητα του συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο διάλυμα και μπορεί να υπολογισθεί με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης είναι επίσης σημαντική για τον καθορισμό της συγκέντρωσης της άγνωστης πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις BSA (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός) (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800 mg/ml). Σε 5 μl δείγματος (BSA ή εκχύλισμα πρωτεϊνών) προστέθηκαν 200 μl αραιωμένου 1/5 αντιδραστηρίου Bradford . Στο εκχύλισμα των πρωτεϊνών έγινε αραιώση 1/10 πριν τη χρήση του. Ακολούθησε επώαση 5 min υπό ανάδευση και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm με τη χρήση του πολυμετρητή Safire II (TECAN).

### **Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western**

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western αποτελεί μια τεχνική που ανιχνεύει συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε ένα δείγμα. Αρχικά, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους βάρους με ηλεκτροφόρηση σε gel SDS (sodium dodecyl sulfate) – πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis). Έπειτα, αυτές μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, ενώ έπειτα επωάζονται με αντισώματα, ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο. Σημαντικό είναι να γίνει παρεμπόδιση της σύνδεσης του αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις στην μεμβράνη, ώστε να μειωθεί το ποσοστό του θορύβου και η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Για το σκοπό αυτό γίνεται επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα 3% BSA ή 5% γάλακτος σε TBS (Tris-Buffered Saline). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτεΐν αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση σε 0,125% BSA ή γάλα, έναντι της πρωτεΐνης στόχου, overnight στους 4°C. Ακολουθούν πλυσίματα με TBS 1x (x2) και TBS 1x + NP-40 +Tween (x2) και η επώαση της μεμβράνης για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με το δευτερεύον αντίσωμα στην επιθυμητή αραιώση σε 0,125% BSA ή γάλα

το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο αναφοράς (εδώ horseradish peroxidase). Ακολουθούν πλυσίματα με TBS 1x (x2), TBS 1x + NP-40 +Tween (x2) και PBS 1x. Το ένζυμο που φέρει το δευτερεύον αντίσωμα χρησιμοποιείται για να αποδιατάξει έναν παράγοντα χημειοφωταύγειας (ECL), και έτσι παράγεται φωτοβολία ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης, η οποία αποτυπώνεται σε φιλμ ακτινογραφίας που έχει τοποθετηθεί προηγουμένως πάνω στη μεμβράνη. Η μεμβράνη και το φιλμ ακτινογραφίας, τοποθετούνται σε κασέτα εμφάνισης και η εμφάνιση πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο. Κάθε εμφάνιση πραγματοποιείται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, ξεκινώντας από τα 30 sec και προχωρώντας σταδιακά σε 1 min, 3 min, 6 min, 12 min μέχρι το σήμα να αρχίσει να εξασθενεί. Μετά από κάθε εμφάνιση το φιλμ ακτινογραφίας τοποθετείται για ~ 1 min σε διάλυμα developer το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη του χρώματος πάνω στο φιλμ, έπειτα σε νερό το οποίο αφαιρεί την περίσσεια του διαλύματος και σε διάλυμα fixer το οποίο μονιμοποιεί το φιλμ ακτινογραφίας. Τέλος, αυτό ξεπλένεται με νερό και στεγνώνεται.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα πρωτεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Akt (mouse, 1:2000), phosphoAkt (pAKT) (rabbit, 1:1000), ERK (mouse, 1:1000), phosphoERK (pERK) (mouse, 1:1000) και τα δευτερεύοντα ήταν anti-mouse (1:1000), anti-rabbit (1:1000).

### **Δημιουργία κλώνων MCF-7 PTEN KD και MCF-7 mock KD**

Η απάλειψη της πρωτεΐνης PTEN έγινε από το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ χρησιμοποιώντας το σύστημα MISSION® shRNA (Sigma-Aldrich).

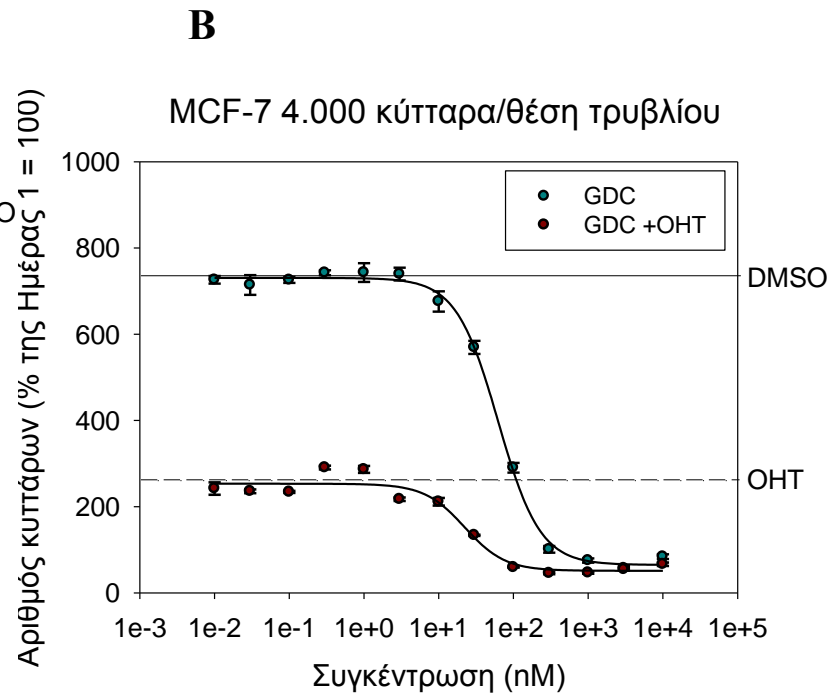
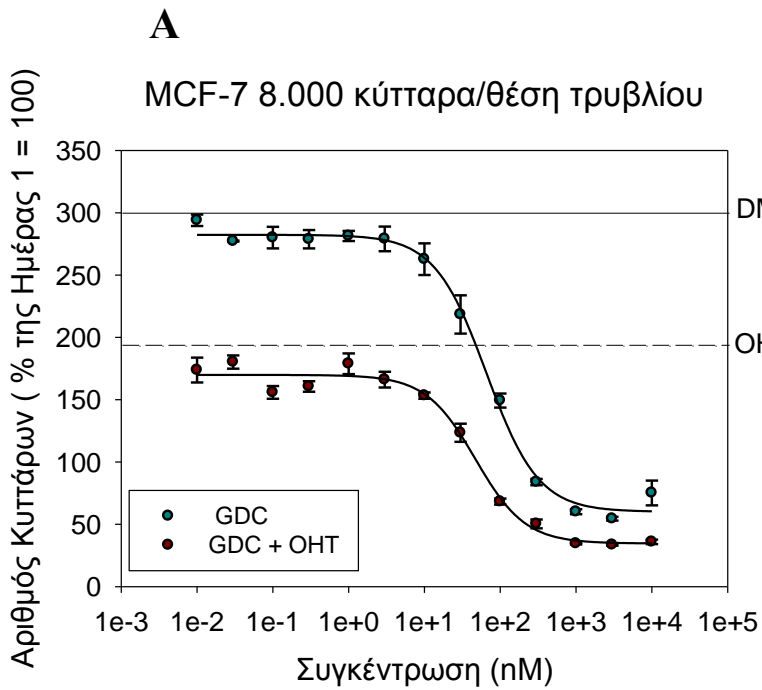
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

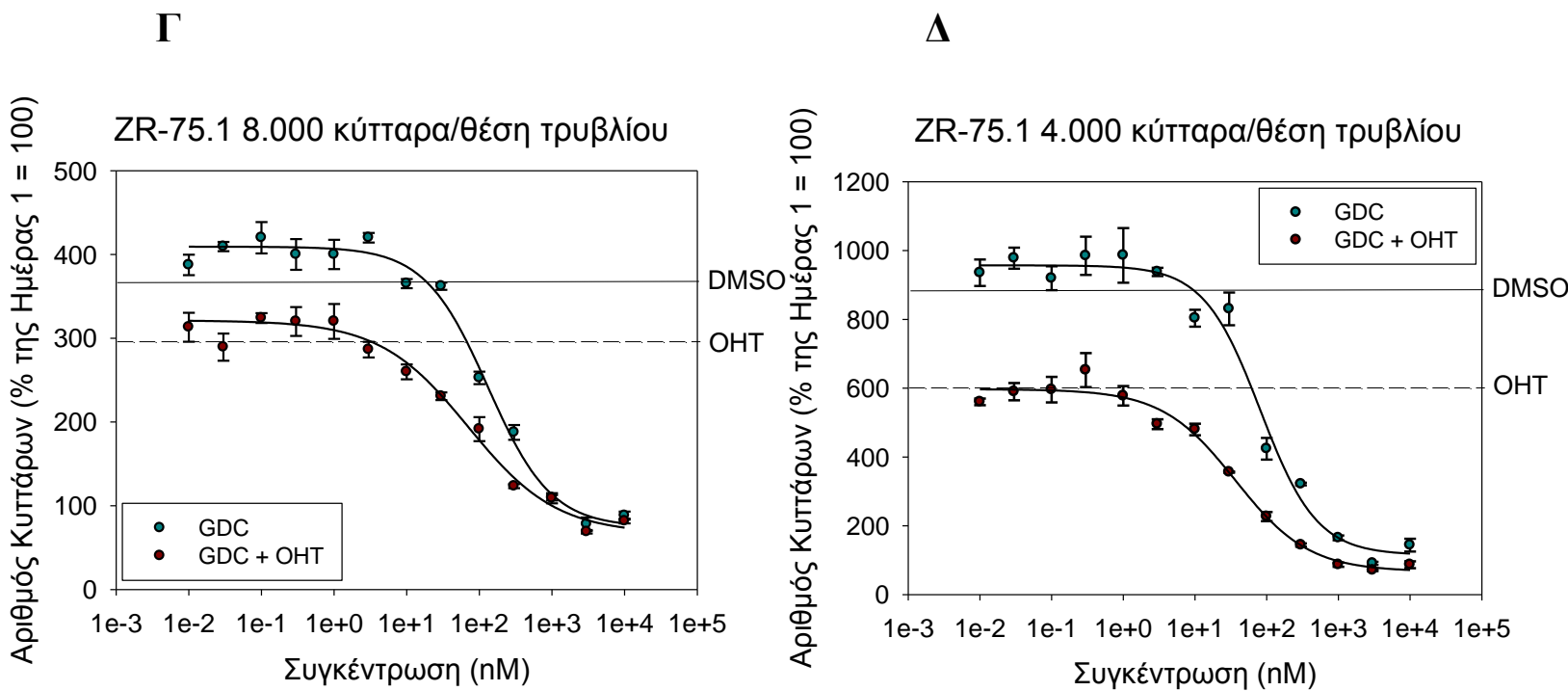
### Επιλογή κατάλληλου πρωτόκολλου καλλιέργειας κυττάρων

Αρχικά οι κυτταρικές σειρές MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1 καλλιεργήθηκαν σε δύο διαφορετικές συνθήκες, ούτως ώστε να διαπιστωθεί ποιά από τις δύο είναι ευνοϊκότερη για την ανάπτυξη των κυττάρων. Η πρώτη συνθήκη, αφορά την καλλιέργεια σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 8.000 κυττάρων ανά θέση σε πλήρες θρεπτικό υλικό: τα MCF-7 αγρίου τύπου σε MEM phenol red free + 10% FBS, 0,1nM 17β-οιστραδιόλη ( $E_2$ ), 10mg/ml ινσουλίνη, και τα ZR-75.1 σε RPMI 1640 + 10% FBS, 0,1nM  $E_2$ , 10mg/ml ινσουλίνη. Την επόμενη ημέρα (Ημέρα 1) τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ημέρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα GDC-0941 παρουσία 100 nM υδρόξυ-ταμοξιφαίνης (OHT) ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ή 0,1% DMSO. Η δεύτερη συνθήκη αφορά την καλλιέργεια σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 4.000 κυττάρων ανά θέση σε πλήρες θρεπτικό υλικό: MCF-7 αγρίου τύπου σε MEM phenol red free + 10% FBS, 0,1nM  $E_2$ , 10mg/ml ινσουλίνη, και τα ZR-75.1 σε RPMI + 10% FBS, 0,1nM  $E_2$ , 10mg/ml ινσουλίνη. Την επόμενη ημέρα (Ημέρα 1) τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ημέρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα GDC-0941 παρουσία 100 nM OHT ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ή 0,1% DMSO. Μετά τις πρώτες τρεις ημέρες της επώασης το υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις στο τέλος της επώασης σε σχέση με αυτόν της Ημέρας 1 (που τέθηκε ίσος με 100) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του crystal violet και είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Οι διαφορές της ανάπτυξης των κυττάρων, στις δύο διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1**. Είναι εμφανές ότι σε κάθε περίπτωση στο επταήμερο πρωτόκολλο με τη συγκέντρωση 4.000 κυττάρων ανά θέση τρυβλίου, αυτά πραγματοποιούν περισσότερους κύκλους πολλαπλασιασμού (κύκλοι πολλαπλασιασμού στα MCF-7 αγρίου τύπου: σχεδόν τρεις, κύκλοι πολ/σμού στα ZR-75.1: ανάμεσα σε 3-4) σε αντίθεση με το πενταήμερο πρωτόκολλο των 8.000 κυττάρων ανά θέση τρυβλίου

(κύκλοι πολλαπλασιασμού στα MCF-7 αγρίου τύπου: ανάμεσα σε 1-2, κύκλοι πολ/σμού στα ZR-75.1: σχεδόν τρεις). Εξαιτίας αυτής της παρατήρησης το πενταήμερο πρωτόκολλο με τη συγκέντρωση 8.000 κυττάρων ανά θέση τρυβλίου απορρίφθηκε και τα πειράματα συνεχίστηκαν ακολουθώντας το επταήμερο πρωτόκολλο της συγκέντρωσης 4.000 κυττάρων ανά θέση τρυβλίου.





**Εικόνα 1: Διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων, στις δύο διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. (Α), (Γ):** Καλλιέργεια MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1 αντίστοιχα, σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 8.000 κυττάρων ανά θέση σε πλήρες θρεπτικό υλικό (όπως αναφέρεται παραπάνω). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 ημέρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα GDC-0941 (GDC) παρουσία 100 nM υδρόξυ-ταμοξιφαίνης (OHT) ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ( η δράση της παρουσιάζεται με διακεκομμένη γραμμή) ή 0,1% DMSO (παρουσιάζεται με πλήρη γραμμή).

**(Β), (Δ):** Καλλιέργεια MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1 αντίστοιχα, σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 4.000 κυττάρων ανά θέση σε πλήρες θρεπτικό υλικό (όπως αναφέρεται παραπάνω). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 ημέρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα GDC-0941 (GDC) παρουσία 100 nM υδρόξυ-ταμοξιφαίνης OHT ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ( παρουσιάζεται με διακεκομμένη γραμμή) ή 0,1% DMSO (παρουσιάζεται με πλήρη γραμμή).



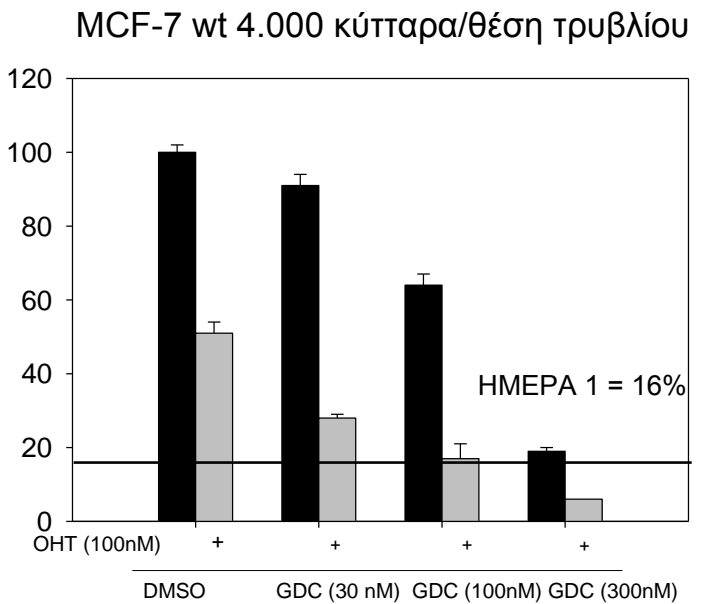
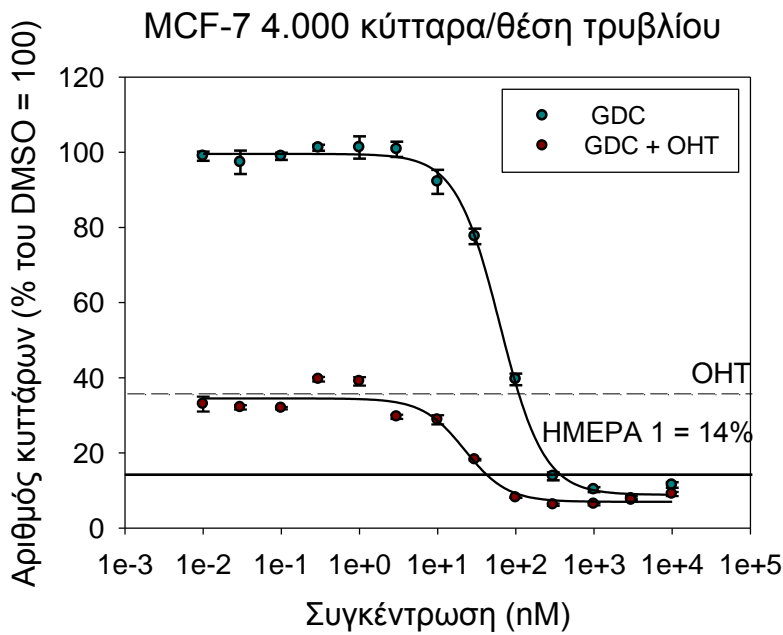
**Μέτρηση της συνέργειας του αναστολέα GDC-0941 με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT) στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1**

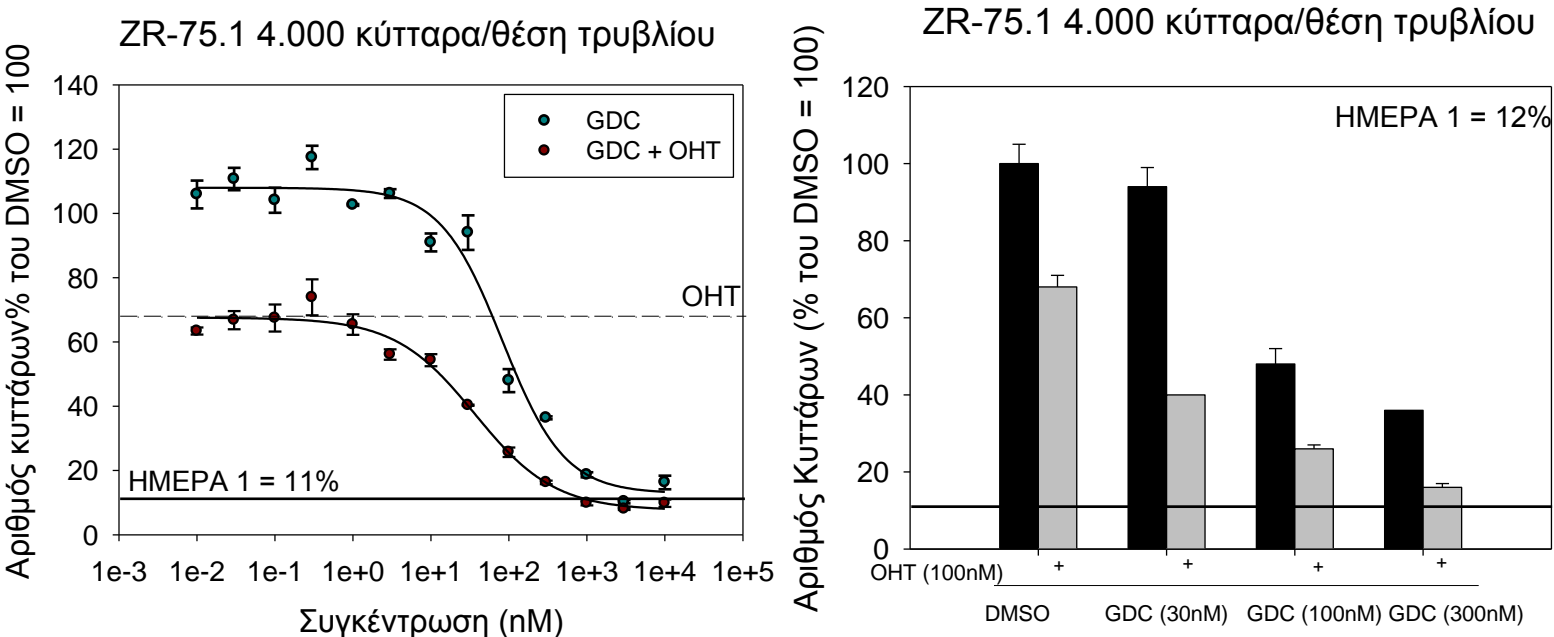
Για τη μελέτη της συνέργειας των υποψήφιων αναστολέων με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της **Εικόνας 2**. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 2A** δεξιά, (μέσος όρος 2 ανεξάρτητων πειραμάτων) υποδεικνύουν ότι ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου παρουσία του αναστολέα GDC-0941 σε συγκέντρωση 100 nM είναι 64% του τελικού αριθμού κυττάρων παρουσία μόνο εκδόχου (0,1% DMSO) (TAKΠΜΕ = 100%), ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 50% του TAKΠΜΕ. Με δεδομένο ότι ο αριθμός τους την Ημέρα 1 είναι μόλις 16% του τελικού, τα κύτταρα προφανώς εμφανίζουν σημαντική αντίσταση στην υδρόξυ-ταμοξιφαίνη. Η αποτελεσματικότητα της κατασταλτικής δράσης είναι αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού κυττάρων που απομένει μετά τη δράση, εκφρασμένου ως % του TAKΠΜΕ. Η αποτελεσματικότητα, χαρακτηρίζεται ως πολύ μεγάλη, όταν ο αριθμός των κυττάρων μετά τη δράση ισούται με τον αρχικό (δηλαδή τον αριθμό της Ημέρας 1). Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού 100 nM GDC-0941 + 100 nM OHT υπολογίζεται ίσο με  $(64\% \times 0,5 =)$  32% του TAKΠΜΕ, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα του συνδυασμού είναι 17% (**Εικόνα 2A** δεξιά). Η κατά  $(32\% - 17\% =)$  15% μεγαλύτερη καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού οφείλεται σε συνέργεια. Σημειωτέον, ότι ο συνδυασμός 100 nM GDC-0941 + 100 nM OHT προορίζει τον αριθμό των κυττάρων στα επίπεδα της Ημέρας 1, δηλαδή καταστέλλει πλήρως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF7 αγρίου τύπου. Επομένως, με το συνδυασμό, επιτυγχάνεται πλήρες θεραπευτικό αποτέλεσμα, με μικρότερη συγκέντρωση GDC-0941 από αυτή που απαιτείται για το ίδιο αποτέλεσμα με χρήση μόνο του GDC-0941, περιορίζοντας τις παρενέργειες που θα προκαλούσε η αυξημένη συγκέντρωση του GDC-0941 στη δεύτερη περίπτωση. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 2B** δεξιά, (αντιπροσωπευτικό πείραμα) υποδεικνύουν ότι ο αριθμός των κυττάρων ZR-75.1 παρουσία του αναστολέα GDC-0941 σε συγκέντρωση 100 nM είναι 48% του TAKΠΜΕ, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 68% του TAKΠΜΕ. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού 100 nM GDC-0941 + 100 nM OHT υπολογίζεται ίσο με  $(48\% \times 0,68=)$  33% του TAKΠΜΕ, ενώ το πραγματικό

αποτέλεσμα του συνδυασμού είναι 26% (**Εικόνα 2B** δεξιά). Η κατά 7% μεγαλύτερη καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού πιθανόν οφείλεται σε συνέργεια.

**Συμπερασματικά**, τα αποτελέσματα των Εικόνων 2A-B δείχνουν ότι ο αναστολέας GDC-0941 στην συγκέντρωση των 100 nM, παρουσιάζει μέτρια έως ισχυρή συνέργεια με την υδόξυ-ταμοξιφαίνη στα MCF-7 αγρίου τύπου και μέτρια συνέργεια στα ZR-75.1. (**Πίνακας 3**).

**A**



**B****Εικόνα 2: Μελέτη συνέργειας του GDC-0941 με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT).**

**(A) MCF-7, (B) ZR-75.1** (Αριστερά) Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 4.000 κυττάρων ανά θέση τρυβλίου και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ημέρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα GDC-0941 παρουσία 100 nM OHT ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ή 0,1% DMSO. Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του *crystal violet*. Αποτελούν αντιπροσωπευτικά πειράματα. (Δεξιά). Απεικόνιση της επίδρασης 30, 100 και 300 nM GDC-0941 (MCF-7 αγρίου τύπου, ZR-75.1), ή μόνο του εκδόχου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην παρουσία ή την απουσία 100 nM OHT. Ο αριθμός κυττάρων την Ημέρα 1 εκφράζεται στα γραφήματα με πλήρη γραμμή. Αποτελούν τον μέσο όρο 2 ανεξάρτητων πειραμάτων. Όπου wt = αγρίου τύπου.

## Έλεγχος δραστηριότητας υποψήφιων αναστολέων της PIK3CA E545K

Στα πλαίσια εύρεσης αλλοστερικών αναστολέων της PIK3CA E545K, ελέγχθηκαν είκοσι ενώσεις (BRF-001 – BRF-020) με *in silico* υπολογισμένη δυνατότητα αλλοστερικής ρύθμισης της ενεργότητας της PIK3CA E545K, ως προς το κατασταλτικό αποτέλεσμα που επέφεραν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου (PIK3CA E545K) και ZR-75.1 (PIK3CA αγρίου τύπου). Σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 4.000 κυττάρων ανά θέση σε πλήρες θρεπτικό υλικό (όπως έχει αναφερθεί αρχικά). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ημέρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων (1, 10 και 100  $\mu\text{M}$ ) καθώς και παρουσία εκδόχου (0,1 % DMSO). Η κατασταλτική δράση των περισσότερων ενώσεων στη συγκέντρωση του 1  $\mu\text{M}$  ήταν μηδαμινή, ενώ οι ενώσεις που στη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{M}$  παρουσίασαν κάποια σημαντική κατασταλτική δράση (>25%, BRF-004 και -008), επιλεκτική κατασταλτική δράση στα MCF7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR75.1 (BRF-003) ή και τα δυο (BRF-020) καθώς και δειγματοληπτικά δυο ενώσεις με καμιά από τις παραπάνω ιδιότητες (BRF-005 και -006) ελέγχθηκαν περαιτέρω παρουσία 100 nM OHT ή εκδόχου (0,1% DMSO). Επίσης ελέγχθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρουσία μόνο 100 nM OHT.

Ο Πίνακας 1 περιγράφει την αποτελεσματικότητα των υποψήφιων αναστολέων της PIK3CA E545K να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF7 αγρίου τύπου (PIK3CA E545K) σε σχέση με τα ZR75.1 (PIK3CA αγρίου τύπου). Η κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των αναστολέων σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  ήταν ασήμαντη, ενώ σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  σημαντική (>25%) κατασταλτική δράση είχαν οι ενώσεις BRF- 004, -008 και -020.

**Πίνακας 1: Δράση υποψήφιων αναστολέων της PIK3CA E545K απουσία και παρουσία υδρόξυ-ταμοξιφαίνης (OHT)**

	Αριθμός κυττάρων MCF7 αγρίου τύπου στη παρουσία				Αριθμός κυττάρων ZR75.1 στη παρουσία			
	..εκδόχου (DMSO)		....0,1 μM OHT		.....εκδόχου		....0,1 μM OHT	
Ενωση (μM)	Αριθμός (% ΤΑΚΠΜΕ)	Καταστολή (%)	Αριθμός (% ΤΑΚΠΜΕ)	Καταστολή (%)	Αριθμός (% ΤΑΚΠΜΕ)	Καταστολή (%)	Αριθμός (% ΤΑΚΠΜΕ)	Καταστολή (%)
0,1% DMSO	100±2 <sup>#</sup>				100±3 <sup>#</sup>			
OHT (0,1)	55±1 <sup>#</sup>	45			76±2 <sup>#</sup>	22		
ICI182,780 (0,1)	30±1 <sup>#</sup>	70			60±3 <sup>#</sup>	40		
	<sup>#</sup> ΣΣΜΟ επτά ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν				<sup>#</sup> ΣΣΜΟ έξι ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν			
BRF-001 (1)	102±1	-2			95±1	5		
BRF-001 (10)	101±2	-1			93±1	7		
BRF-001 (100)	10±1	90			6±0	94		
BRF-002 (1)	97±0	3			95±1	5		
BRF-002 (10)	88±0	12			84±1	16		
BRF-002 (100)	26±1	74			14±1	86		

BRF-003 (1)	99±3*	1	48±1	7		97±2*	3	77±2	15
BRF-003 (10)	85±3*	15	53±2	-2		93±2*	7	79±6	13
BRF-003 (100)	16±2*	84	8±1	84		14±2*	86	9±0	90
BRF-004 (1)	74±2**	26	44±2**	20		82±5**	18	72±3**	5
BRF-004 (10)	41±1**	59	19±1**	65		39±2**	61	38±2**	51
BRF-004 (100)	8±1**	92	8±1**	86		11±1**	89	8±1**	89
BRF-005 (1)	98±4*	2	48±4	8		91±2*	9	78±5	14
BRF-005 (10)	88±2*	12	47±1	9		78±1*	22	75±2	17
BRF-005 (100)	23±2*	77	22±1	58		31±3*	69	31±1	66
BRF-006 (1)	96±3*	4	50±4	4		100±3*	0	89±2	2
BRF-006 (10)	97±2*	3	53±3	-2		95±2*	5	91±2	1
BRF-006 (100)	43±2*	57	26±2	50		79±2*	21	50±4	45
BRF-007 (1)	102±1	-2				95±1	5		
BRF-007 (10)	96±3	4				90±2	10		
BRF-007 (100)	76±2	24				79±3	21		

BRF-008 (1)	92±2*	8	51±3	1		96±2*	4	91±4	0
BRF-008 (10)	66±2*	34	36±1	30		59±2*	41	62±3	32
BRF-008 (100)	17±1*	83	15±2	70		19±1*	81	23±2	75
BRF-009 (1)	102±1	-2				96±0	4		
BRF-009 (10)	100±1	0				78±6	22		
BRF-009 (100)	91±3	9				64±2	36		
BRF-010 (1)	96±1	4				87±2	13		
BRF-010 (10)	97±2	3				92±4	8		
BRF-010 (100)	97±2	3				109±1	-9		
BRF-011 (1)	93±3	7				103±2	-3		
BRF-011 (10)	84±0	16				85±3	15		
BRF-011 (100)	8±1	92				10±1	90		
BRF-012 (1)	103±0	-3				94±0	6		
BRF-012 (10)	78±3	22				77±0	23		
BRF-012 (100)	7±1	93				10±2	90		

BRF-013 (1)	91±2	9				101±4	-1		
BRF-013 (10)	86±2	14				86±3	14		
BRF-013 (100)	79±2	21				72±3	28		
BRF-014 (1)	98±1	2				96±2	4		
BRF-014 (10)	93±2	7				102±3	-2		
BRF-014 (100)	98±2	2				114±2	-14		
BRF-015 (1)	97±2	3				89±4	11		
BRF-015 (10)	93±2	7				90±3	10		
BRF-015 (100)	104±2	-4				92±3	8		
BRF-016 (1)	95±2	5				94±3	6		
BRF-016 (10)	89±2	11				89±2	11		
BRF-016 (100)	5±1	95				6±1	94		
BRF-017 (1)	100±0	0				100±1	0		
BRF-017 (10)	85±1	15				86±1	14		
BRF-017 (100)	19±1	81				27±1	73		

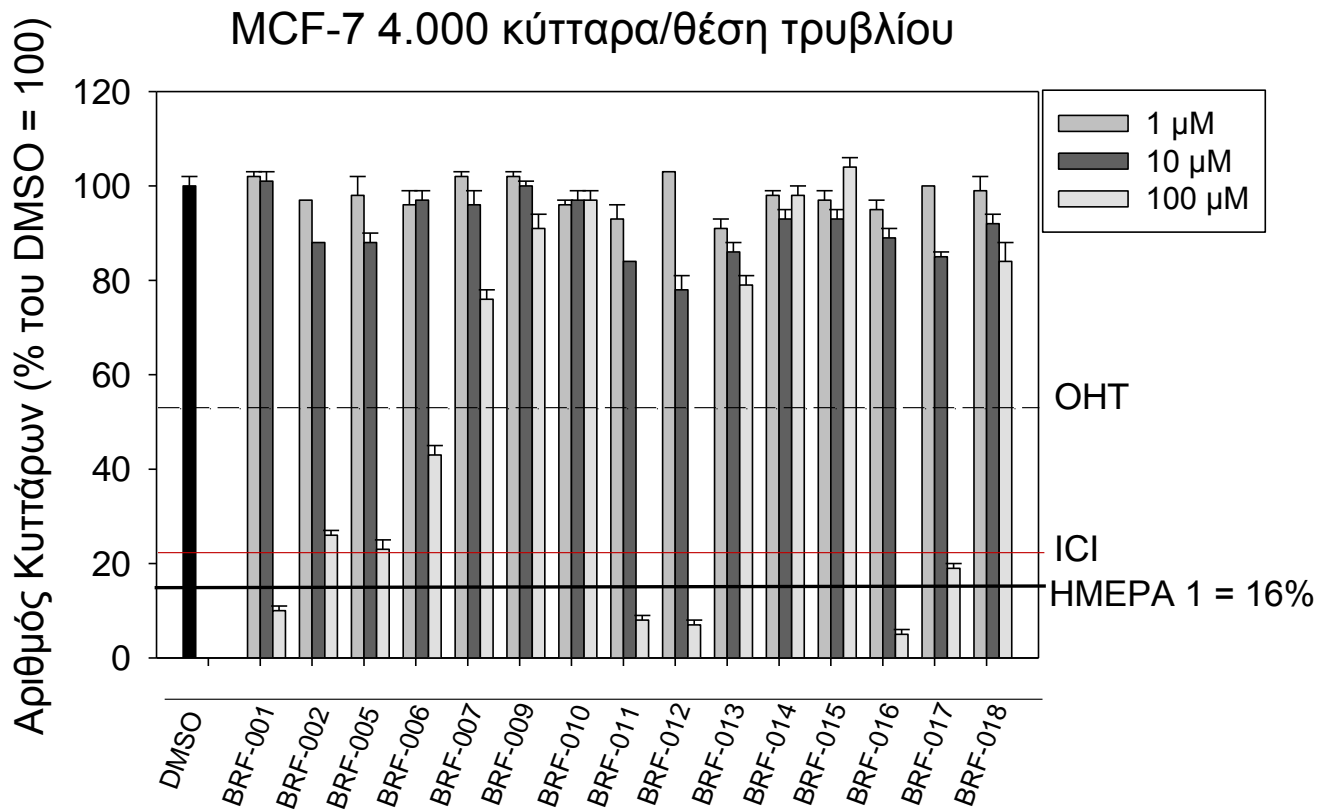


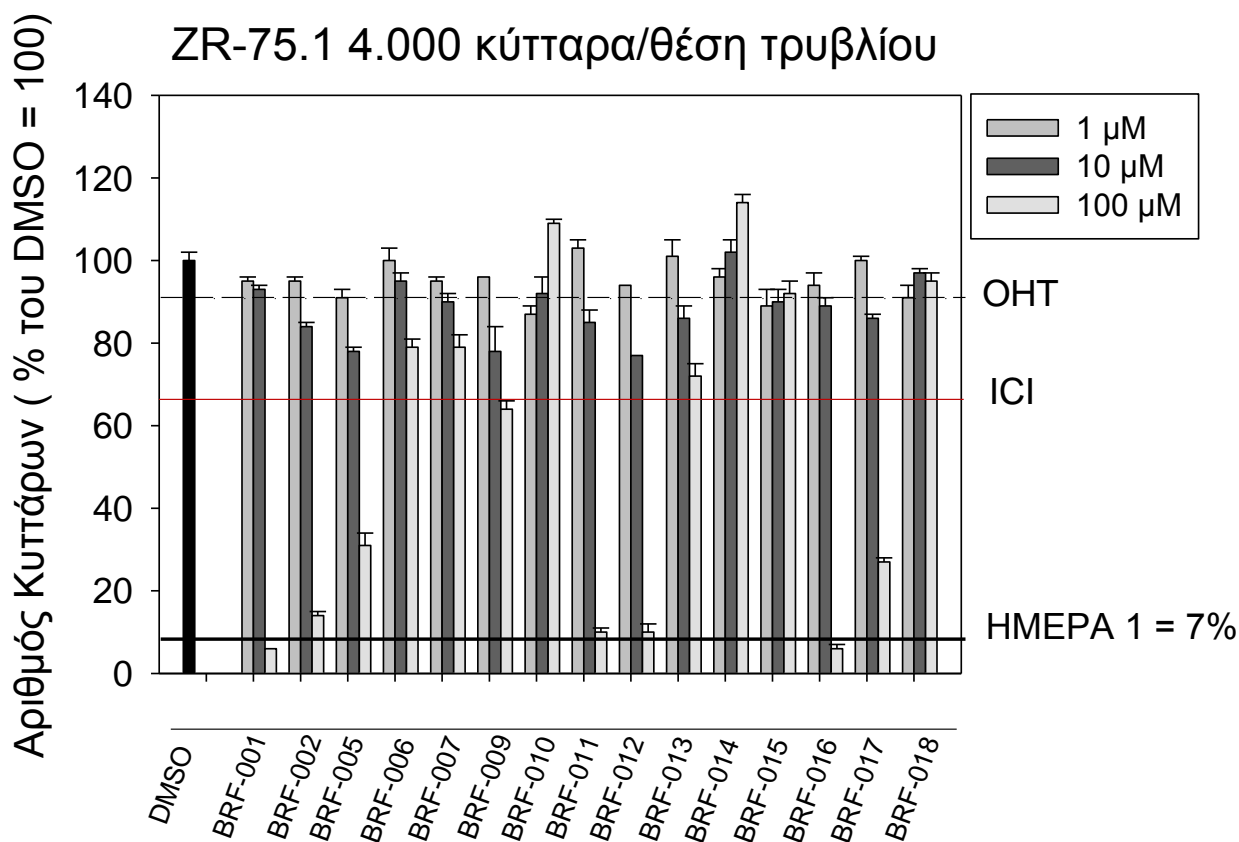
BRF-018 (1)	99±3	1				91±3	9		
BRF-018 (10)	92±2	8				97±1	3		
BRF-018 (100)	84±4	16				95±2	5		
BRF-020 (1)	99±3*	1	51±3	1		100±2*	0	81±5	11
BRF-020 (10)	31±3*	69	21±4	60		48±3*	52	48±3	47
BRF-020 (100)	9±2*	91	7±1	87		10±2*	90	8±0	91

*ΤΑΚΙΠΜΕ: Τελικός Αριθμός Κυττάρων Παρουσία Μόνο Εκδόχου (0,1% DMSO)*

*ΣΣΜΟ μέτρησης εις τριπλούν, \*ΣΣΜΟ 2 ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν, \*\*ΣΣΜΟ 4 ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν*

Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζονται οι ενώσεις, η κατασταλτική δράση των οποίων στις φαρμακολογικά δόκιμες συγκεντρώσεις 1 & 10  $\mu\text{M}$  στον πολλαπλασιασμό τόσο των MCF-7 αγρίου τύπου όσο και των ZR-75.1 κυττάρων, δεν ήταν >25%.



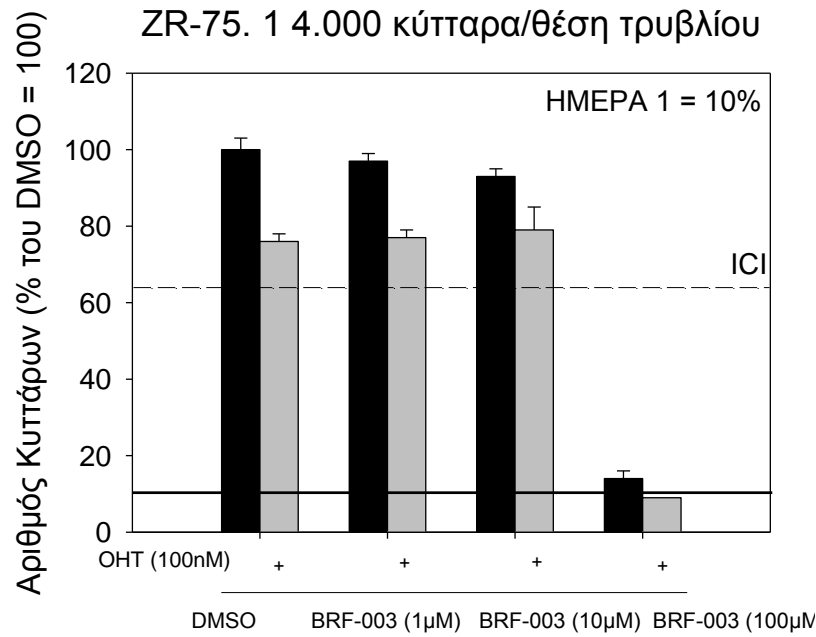
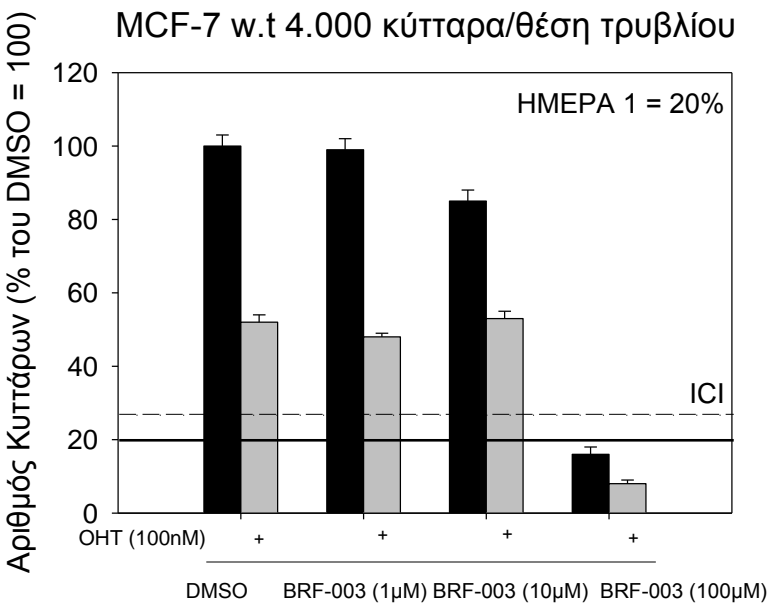
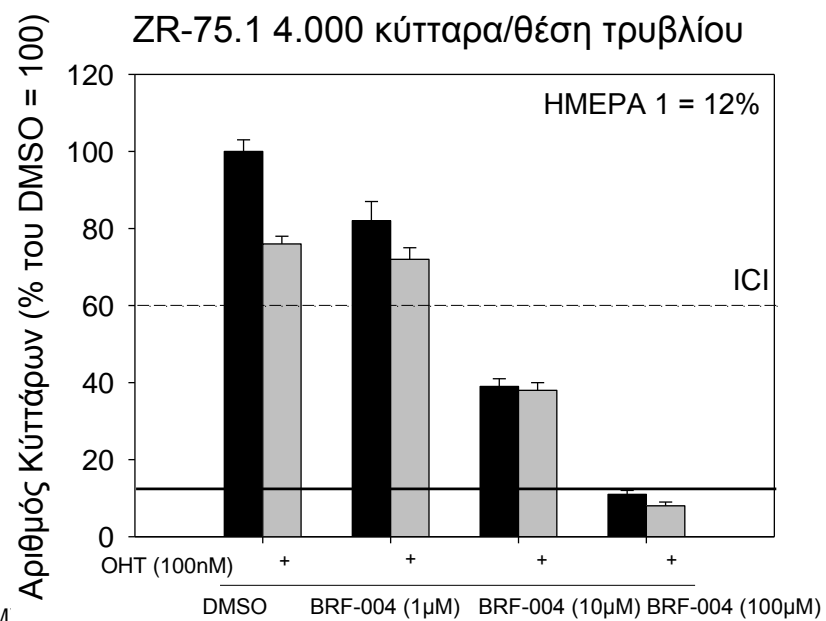
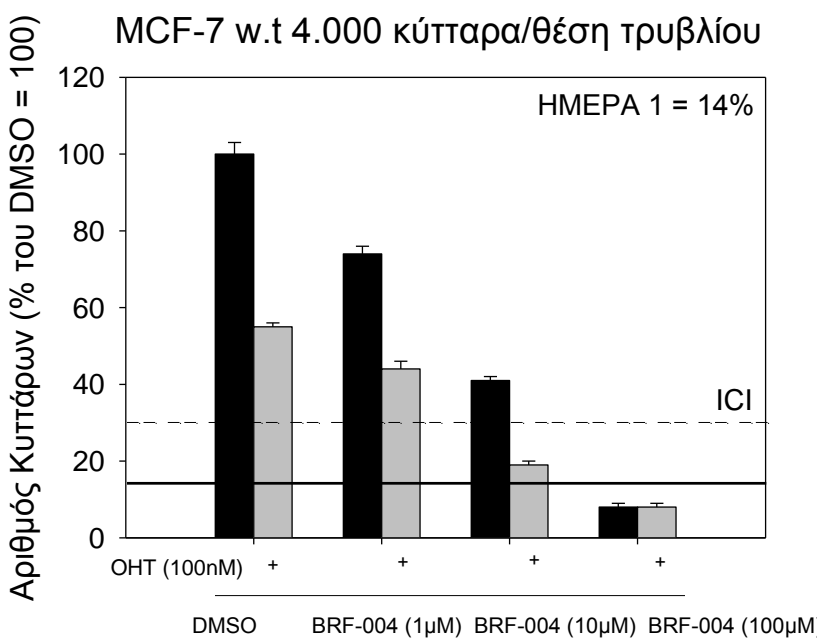


**Εικόνα 3:** Ενώσεις με χαμηλή κατασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1. Οι ενώσεις ελέγχθηκαν σε τρεις συγκεντρώσεις (1, 10 και 100 μM) ενώ οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων αναφέρονται παραπάνω. Με συνεχόμενη γραμμή εκφράζεται ο αριθμός κυττάρων την Ημέρα 1, ενώ με διακεκομμένη ο αριθμός τους στη παρουσία υδροξυ-ταμοξφαίνης (OHT). Επίσης με κόκκινη γραμμή δηλώνεται ο αριθμός τους στη παρουσία ICI182,780 (fulvestrant ή Faslodex®). Αποτελούν αντιπροσωπευτικά πειράματα

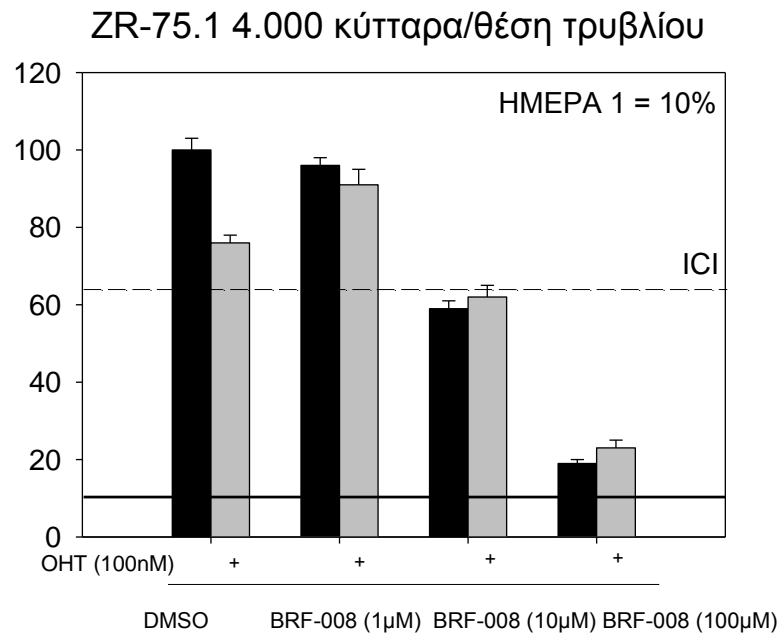
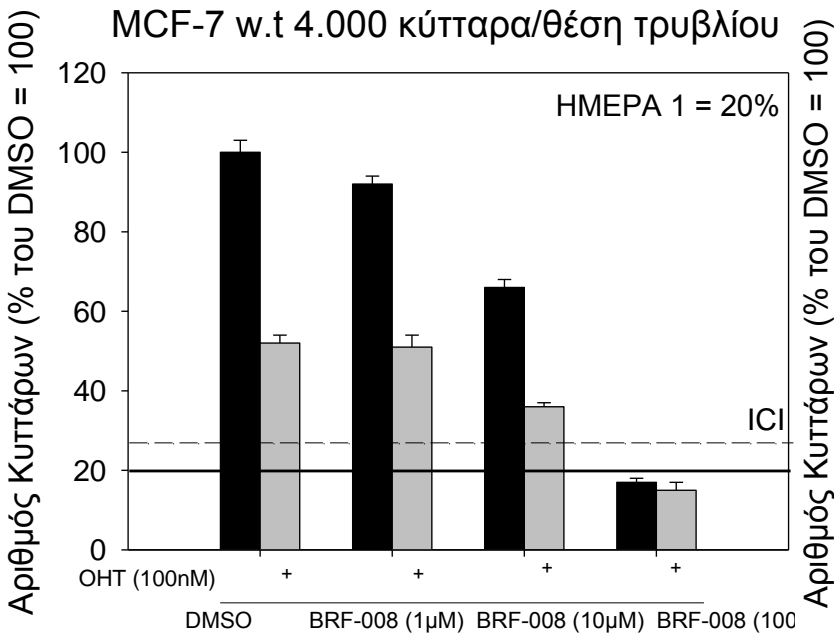
Στην **Εικόνα 4** παρουσιάζεται τη δράση των BRF-003, -004, -008, -020, δηλαδή των ενώσεων οι οποίες έπειτα από έλεγχο σε κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1, επιλέχθηκαν βάσει του σχετικά σημαντικού κατασταλτικού αποτελέσματος που επέφεραν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (BRF-004 και -008), της σχετικά μεγαλύτερης καταστολής των MCF7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR75.1 (BRF-003) ή και των δύο αυτών ιδιοτήτων μαζί (BRF-020). Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω. Στην **Εικόνα 4A**

αριστερά, ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου παρουσία της BRF-003 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  είναι 85% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 52% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού υπολογίζεται ίσο με  $(85\% \times 0,52 =) 44\%$  του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 53% του TAKΠME. Στην **Εικόνα 4A** δεξιά, ο αριθμός των κυττάρων ZR-75.1 παρουσία της BRF-003 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  είναι 93% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 76% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού υπολογίζεται ίσο με  $(93\% \times 0,76 =) 71\%$  του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 79% του TAKΠME. Έτσι, ενώ η ένωση BRF-003 παρουσιάζει αυξημένη κατασταλτική δράση στα MCF-7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR-75.1, στην παρουσία 100 nM OHT εμφανίζει αρνητική αλληλεπίδραση με την OHT τόσο στα MCF-7 αγρίου τύπου όσο και στα ZR75.1. Στην **Εικόνα 4B** αριστερά (μέσος όρος 4 ανεξάρτητων πειραμάτων), ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου παρουσία της ένωσης BRF-004 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  είναι 41% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 55% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού τους υπολογίζεται ίσο με  $(41\% \times 0,55 =) 23\%$  του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 19% του TAKΠME. Η κατά 4% μεγαλύτερη καταστολή πιθανόν οφείλεται σε συνέργεια. Στην **Εικόνα 4B** δεξιά (μέσος όρος 4 ανεξάρτητων πειραμάτων), ο αριθμός των κυττάρων ZR-75.1 παρουσία της BRF-004 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  είναι 39% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 76% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού τους υπολογίζεται ίσο με  $(39\% \times 0,76 =) 30\%$  του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 38% του TAKΠME. Η ένωση BRF-004 στην παρουσία 100 nM OHT εμφανίζει οριακά θετική συνέργεια με την OHT στα MCF-7 αγρίου τύπου και αρνητική αλληλεπίδραση στα ZR75.1. Στην **Εικόνα 4Γ** αριστερά, ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου παρουσία της BRF-008 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  είναι 66% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 52% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού υπολογίζεται ίσο με  $(66\% \times 0,52 =) 34\%$  του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 36% του TAKΠME. Στην **Εικόνα 4Γ** δεξιά, ο αριθμός των κυττάρων ZR-75.1 παρουσία της BRF-008 σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  είναι 59% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT ο αριθμός τους είναι 76% του TAKΠME. Το αθροιστικό

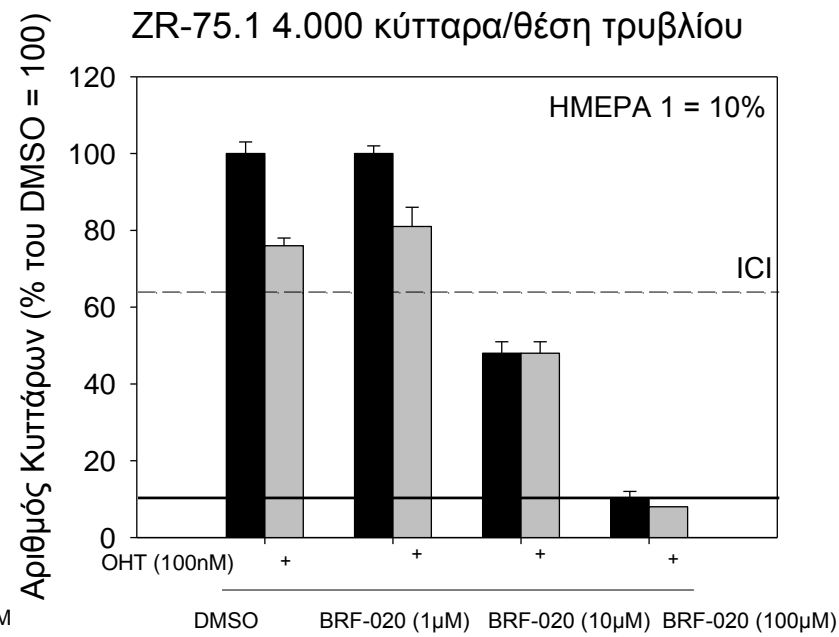
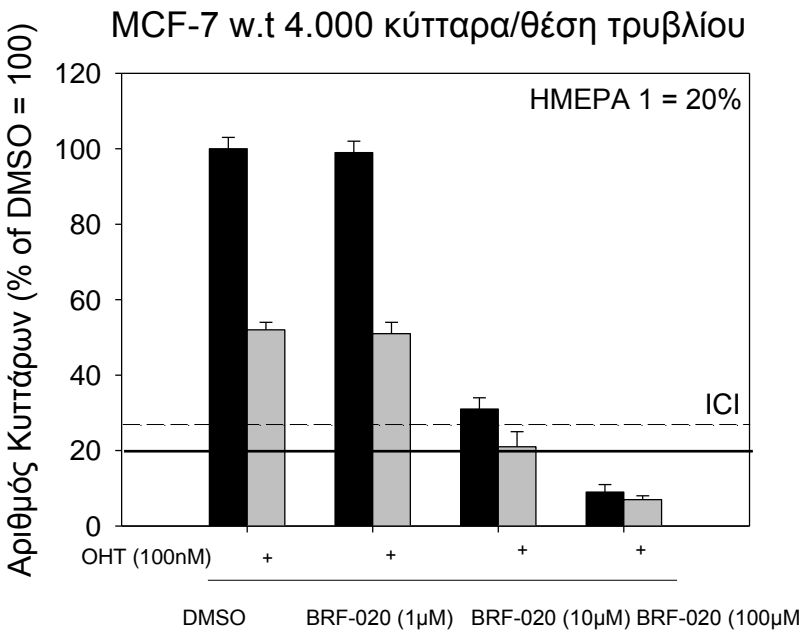
αποτέλεσμα του συνδυασμού τους υπολογίζεται ίσο με  $(59\% \times 0,76 =)$  45% του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 62% του TAKΠME. Έτσι, ενώ η ένωση BRF-008 εμφάνισε στην παρουσία 100 nM OHT αυξημένη κατασταλτική δράση στα MCF-7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR-75.1, εμφάνισε επίσης αρνητική αλληλεπίδραση με την OHT και στα δύο κύτταρα. Στην **Εικόνα 4Δ** αριστερά, ο αριθμός των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου παρουσία της BRF-020 σε συγκέντρωση 10  $\mu$ M είναι 31% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT είναι 52% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού υπολογίζεται ίσο με  $(31\% \times 0,52 =)$  16% του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 21% του TAKΠME. Στην **Εικόνα 4Δ** δεξιά, ο αριθμός των κυττάρων ZR-75.1 παρουσία της BRF-020 σε συγκέντρωση 10  $\mu$ M είναι 48% του TAKΠME, ενώ παρουσία 100 nM OHT είναι 76% του TAKΠME. Το αθροιστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού τους υπολογίζεται ίσο με  $(48\% \times 0,76 =)$  37% του TAKΠME, ενώ το πραγματικό αποτέλεσμα είναι 48% του TAKΠME. Έτσι ενώ η ένωση BRF-020 παρουσιάζει αυξημένη κατασταλτική δράση στα MCF-7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR-75.1 στην απουσία και στην παρουσία 100 nM OHT, εμφάνισε αρνητική αλληλεπίδραση με την OHT και στα δύο κύτταρα και η ελαφρά επιλεκτική της δράση μειώθηκε αναλογικά στην παρουσία OHT. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι μόνο η ένωση BRF-004 αξίζει παραπέρα διερεύνησης, καθώς στην παρουσία OHT εμφάνισε μικρή συνέργεια στα κύτταρα MCF7 και επιλεκτική καταστολή των MCF7 σε σχέση με τα ZR75.1.

**A****B**

Γ



Δ



**Εικόνα 4 : Κατασταλτική δράση των ενώσεων BRF-003, -004, -008, -020 στα κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1 παρουσία και απουσία OHT.** *Κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου και ZR-75.1 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων σε αρχική συγκέντρωση 4000 κυττάρων ανά θέση για 6 ημέρες στην παρουσία εκδόχου ή BRF-003, -004, -008, ή -020, στην απουσία και τη παρουσία υδρόξυ-ταμοξιφαίνης (OHT 100 nM) και μετρήθηκαν όπως στην Εικόνα 2. Οι τιμές εκφράζονται ως % της τιμής εκδόχου (DMSO). (BRF-003, -008, -020 αντιπροσωπευτικά πειράματα, BRF-004 μέσος όρος 4 ανεξάρτητων πειραμάτων). Ο αριθμός κυττάρων στη παρουσία ICI182,780 εκφράζεται στα γραφήματα με διακεκομμένη γραμμή, ενώ αυτός της Ημέρας 1 με συνεχόμενη γραμμή. Όπου wt = αγρίου τύπου.*

**Συμπερασματικά,** οι ενώσεις BRF-003, BRF-004, BRF-008 και BRF-020 εμφανίζουν οριακή, σημαντική, μέτρια και πολύ σημαντική, αντίστοιχα, αποτελεσματικότητα καταστολής των MCF7 αγρίου τύπου. Επιπλέον, η BRF-020 εμφανίζει σημαντική επιλεκτικότητα καταστολής των MCF7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR75.1. Οι τέσσερις ενώσεις εμφανίζουν αρνητική αλληλεπίδραση με την OHT στα κύτταρα ZR75.1. Επιπλέον, οι BRF-003, BRF-008 και BRF-020 εμφανίζουν έλλειψη θετικής συνέργειας με την OHT στα κύτταρα MCF7 αγρίου τύπου. Αντιθέτως η BRF-004 στη συγκέντρωση 10  $\mu$ M σε συνδυασμό με 100 nM OHT εμφανίζει επιλεκτικότητα συνεργιστικής καταστολής των MCF-7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR-75.1 και η κατασταλτική δράση του συνδυασμού αυτού φαίνεται να αυξάνει σημαντικά λόγω συνέργειας.

**Μελέτη της δραστηριότητας του αναστολέα της PIK3CA GDC-0941 καθώς και της BRF-004 σε κυτταρικές σειρές που έχουν υποστεί απάλειψη του PTEN.**

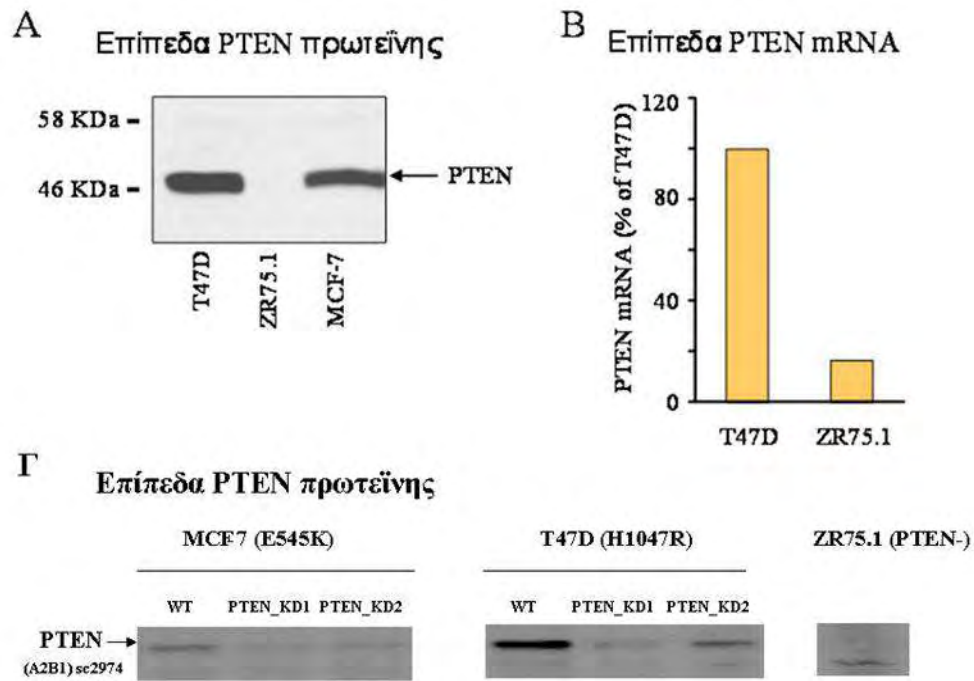
Προκειμένου να ενισχυθεί το μονοπάτι σηματοδότησης της PI3K και εξ αιτίας αυτού η ένταση της αλληλεπίδρασής του με τον ER, έγινε από το EME-IBΦXB πραγματική και πλασματική (mock) απάλειψη της έκφρασης PTEN στα κύτταρα MCF7 και T47D (**Εικόνα 5**). Ακολούθησε αντιπαραβολή της ευαισθησίας των PTEN\_KD και mock\_KD κυττάρων στους υποψήφιους αναστολείς στην απουσία και την παρουσία των



αντιοιστρογόνων OHT και φουλβεστράνη (ICI182,780). Σειρά πειραμάτων έδειξε ότι τα κύτταρα T47D\_PTEN\_KD στα οποία έχει απαλειφθεί η έκφραση του PTEN, παρουσίασαν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (RPMI + 10% FBS + 0,1nM E2 + 1mg/L ινσουλίνη) αύξηση της αντίστασης στην OHT και στο GDC-0941 σε σχέση με τα κύτταρα T47D αγρίου τύπου και mock\_KD που πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K λόγω της απάλειψης PTEN (αποτελέσματα του εργαστηρίου Μοριακής Ενδοκρινολογίας που δεν παρουσιάζονται εδώ). Αύξηση της αντίστασης στην OHT και στο GDC-0941 διαπιστώθηκε επίσης στα κύτταρα MCF7\_PTEN\_KD σε σχέση με τα MCF7 αγρίου τύπου και MCF7\_mock\_KD (**Εικόνα 6**).

**Συμπερασματικά**, τα κύτταρα PTEN\_KD εμφανίζουν μεγαλύτερη αντίσταση σε OHT και GDC-0941 σε σχέση με τα αντίστοιχα mock\_KD και αγρίου τύπου κύτταρα και επομένως προσφέρονται για μελέτη συνέργειας μεταξύ OHT και των υποψήφιων αναστολέων του μονοπατιού της PI3K.

**Εικόνα 5.: Στόχευση της έκφρασης PTEN σε κύτταρα T47D και MCF7**



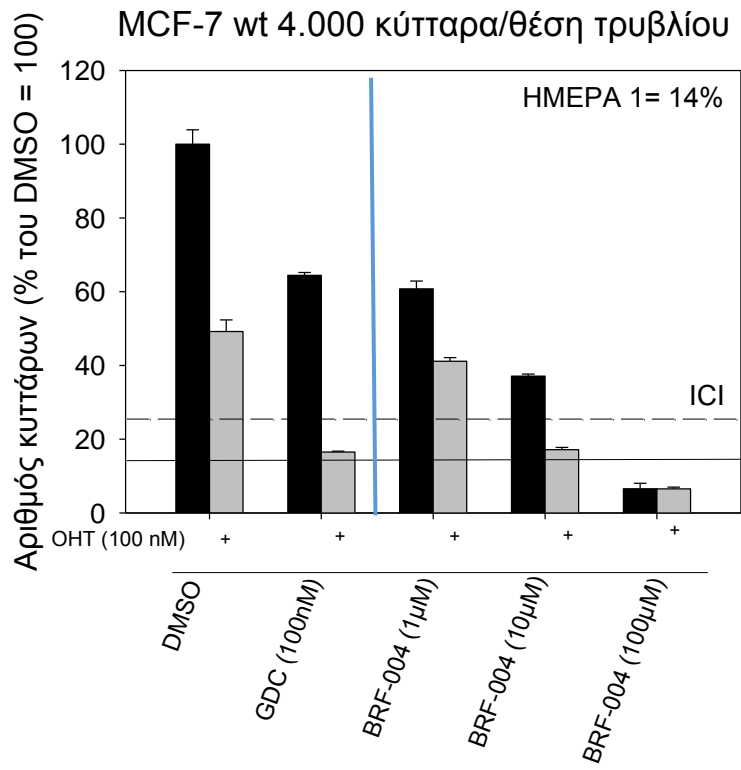
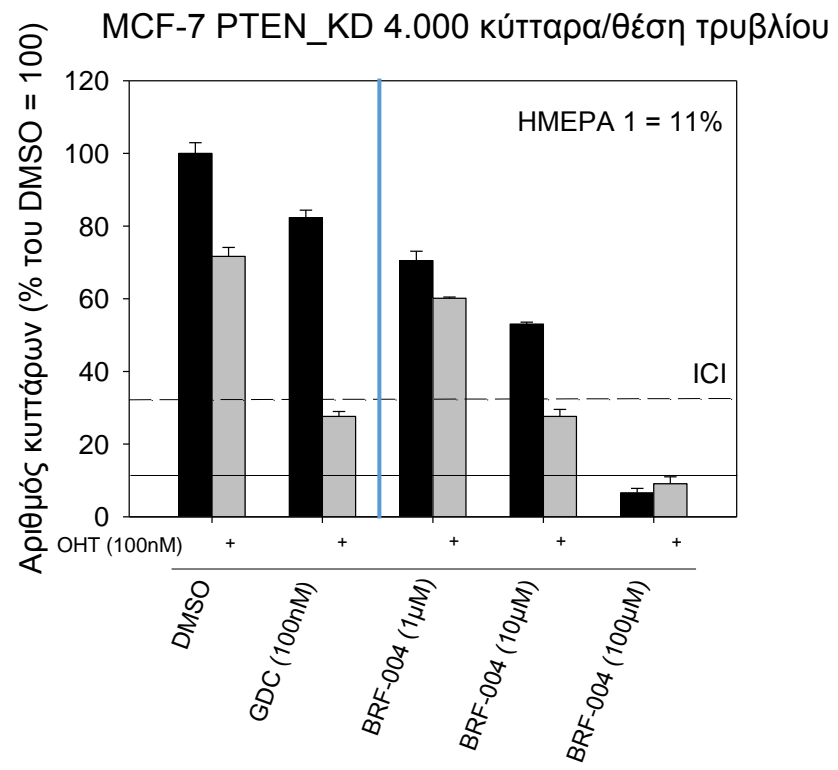
(Α) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της PTEN πρωτεΐνης σε εκχύλισμα των ΚΣΚΜ T47D, ZR-75.1 και MCF-7, με ανοσοαποτύπωση και χρήση του αντισώματος A2B1 της PTEN.

(Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του PTEN mRNA στις ΚΣΚΜ T47D και ZR-75.1, με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

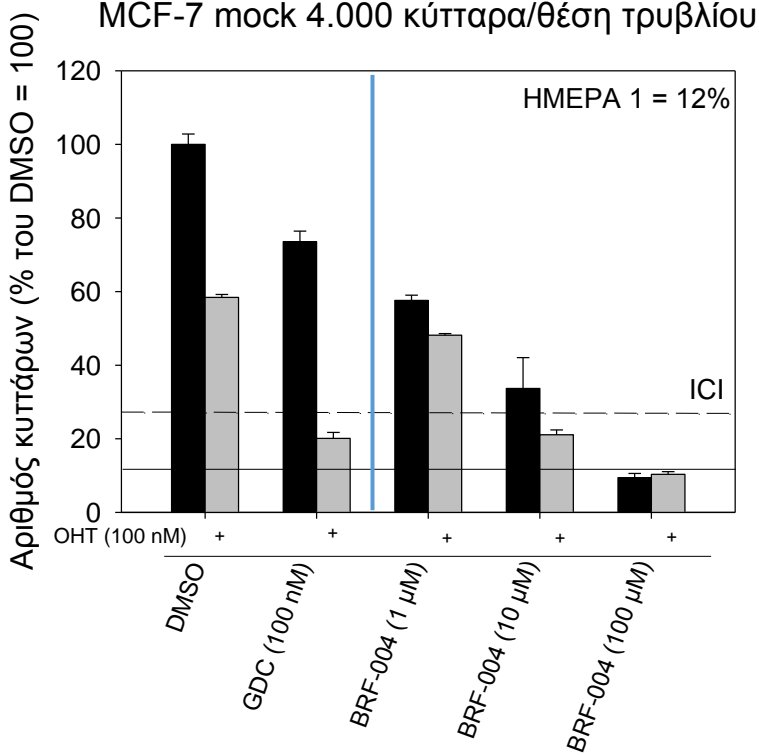
(Γ) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της PTEN πρωτεΐνης, όπως περιγράφεται παραπάνω σε κύτταρα MCF-7, T47D και ZR-75.1 καθώς και σε κύτταρα MCF-7 και T47D στα οποία έχει απαλειφθεί η έκφραση του PTEN (PTEN\_KD) με χρήση shRNA. (αποτελέσματα του Εργαστηρίου Μοριακής Ενδοκρινολογίας)

Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται η κατασταλτική δράση της ένωσης BRF-004 σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 100  $\mu\text{M}$  σε κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD καθώς και MCF-7\_mock\_KD, ενώ ακόμη αυτή συγκρίνεται με την κατασταλτική δράση του αναστολέα GDC-0941, ο οποίος βρίσκεται σε συγκέντρωση 100 nM. Τα κύτταρα

καλλιιεργήθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων σε συγκέντρωση 4.000 κυττάρων ανά θέση σε πλήρες θρεπτικό υλικό: MEM phenol red free + 10% FBS, 0,1nM E<sub>2</sub>, 10mg/ml ινσουλίνη. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ημέρες με την ένωση BRF-004 (αυξανόμενες συγκεντρώσεις) ή τον αναστολέα GDC-0941 παρουσία 100 nM OHT ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ή 0,1% DMSO. Μετά τις πρώτες τρεις μέρες της επώασης το υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο. Ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε με τη μέθοδο του crystal violet. Όπως φαίνεται και στις **Εικόνες 6A, 6B και 6Γ** τα MCF-7\_PTEN\_KD εμφανίζουν ανθεκτικότητα στον αναστολέα GDC-0941 και στην OHT σε σχέση με τα MCF-7 αγρίου τύπου και τα mock\_KD. Πιο αναλυτικά, βάσει των % τιμών καταστολής του **Πίνακα 2**, παρουσία του GDC-0941, τα MCF-7\_PTEN\_KD παρουσιάζουν 2 και 1,4 φορές μικρότερη καταστολή σε σχέση με τα MCF-7 αγρίου τύπου και τα MCF-7\_mock\_KD αντίστοιχα. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και παρουσία 100 nM OHT, όπου τα MCF-7\_PTEN\_KD παρουσιάζουν 1,8 και 1,5 φορές μικρότερη καταστολή σε σχέση με τα MCF-7 αγρίου τύπου και τα MCF-7\_mock\_KD, αντίστοιχα. Όσον αφορά την ένωση BRF-004 σε συγκέντρωση 10 μM, τα MCF-7\_PTEN\_KD παρουσιάζουν 1,3 και 1,4 φορές μικρότερη καταστολή σε σχέση με τα MCF-7 αγρίου τύπου και τα MCF-7\_mock\_KD. Επιπλέον, βάσει του **Πίνακα 2**, διαπιστώνεται ότι ο συνδυασμός GDC-0941 (100 nM) με OHT (100 nM), βρέθηκε ότι όχι μόνο έχει βελτιωμένη κατασταλτική δράση και στα τρία κύτταρα, αλλά επίσης ότι μειώνει δραματικά την αντοχή των MCF-7\_PTEN\_KD, καθώς επιφέρει καταστολή (61%) όμοια με αυτή των MCF-7 αγρίου τύπου (66%) και των MCF-7\_mock\_KD (65%). Από την άλλη, ο συνδυασμός BRF-004 (10 μM) με την OHT (100 nM) μειώνει λίγο την αντοχή των MCF-7\_PTEN\_KD, καθώς επιφέρει καταστολή κατά (61% - 47% =) 14% μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν που επιφέρει η BRF-004 μόνη της, ενώ στα κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου δεν εμφανίζει βελτιωμένη κατασταλτική δράση. Τέλος, στα MCF-7\_mock\_KD η % καταστολή του συνδυασμού είναι μικρότερη (64%) από αυτήν της BRF-004 μόνη της (66%), εκδήλωση προφανώς ανταγωνιστικής και όχι συνεργιστικής δράσης με την OHT. Όσον αφορά την ένωση BRF-004 σε συγκέντρωση 1 μM η δράση της είναι όχι μόνο περιορισμένη, αλλά και ανταγωνιστική, ενώ η δράση της BRF-004 σε συγκέντρωση 100 μM είναι όχι μόνο ανταγωνιστική, αλλά και φαρμακολογικά αδιάφορη (λόγω του ύψους της συγκέντρωσης).

**A****B**

**Γ**



**Εικόνα 6: Κυτταροτοξική δράση της ένωσης BRF-004 στα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD και MCF-7\_mock\_KD**

(A) MCF-7 αγρίου τύπου, (B) MCF-7\_PTEN\_KD, (Γ) MCF-7\_mock\_KD παρουσία 100 nM GDC-0941, 1, 10 και 100 μM BRF-004 σε συνδυασμό ή όχι με 100 nM OHT και εκδόχου (DMSO). Η Ημέρα 1 δηλώνεται με συνεχόμενη γραμμή, ενώ με διακεκομμένη, η τιμή του ICI182,780. Αποτελούν αντιπροσωπευτικά πειράματα. Όπου wt = αγρίου τύπου

Τα MCF-7\_PTEN\_KD παρουσιάζουν ανθεκτικότητα τόσο στην OHT όσο και στον αναστολέα GDC-0941 και την ένωση BRF-004, πιθανόν λόγω αυξημένης ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K, αντοχή η οποία μειώνεται δραματικά παρουσία GDC + OHT. Αντίθετα μειώνεται ελάχιστα παρουσία BRF-004 + OHT. Επιπλέον η BRF-004 εμφανίζει δράση ανταγωνιστική της OHT στη συγκέντρωση των 10 μM στα MCF-7\_mock\_KD.

<b>Πίνακας 2: Κατασταλτική δράση GDC-0941, BRF-004 απουσία και παρουσία υδρόξυ-ταμοξιφαίνης</b>				
	Αριθμός κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου παρουσία			
	... εκδόχου (DMSO)		...100 nM OHT	
ΕΝΩΣΗ	Αριθμός (%)	Καταστολή (%)	Αριθμός (%)	Καταστολή (%)
GDC (100 nM)	64±1 <sup>#</sup>	36	17±0 <sup>#</sup>	65*
BRF-004 (1μM)	61±2 <sup>#</sup>	39	41±1 <sup>#</sup>	16
BRF-004 (10 μM)	37±1 <sup>#</sup>	63	17±1 <sup>#</sup>	65
BRF-004 (100 μM)	7±1 <sup>#</sup>	93	7±0 <sup>#</sup>	86
OHT (100 nM)			49±3 <sup>#</sup>	51
	Αριθμός κυττάρων MCF-7_PTEN_KD παρουσία			
	... εκδόχου (DMSO)		...100 nM OHT	
ΕΝΩΣΗ	Αριθμός (%)	Καταστολή (%)	Αριθμός (%)	Καταστολή (%)
GDC (100 nM)	82±2 <sup>#</sup>	18	28±1 <sup>#</sup>	61
BRF-004 (1μM)	71±3 <sup>#</sup>	29	60±0 <sup>#</sup>	17
BRF-004 (10 μM)	53±1 <sup>#</sup>	47	28±2 <sup>#</sup>	61
BRF-004 (100 μM)	7±1 <sup>#</sup>	93	9±2 <sup>#</sup>	88
OHT (100 nM)			72±2 <sup>#</sup>	28
	Αριθμός κυττάρων MCF-7_mock_KD παρουσία			
	... εκδόχου (DMSO)		...100 nM OHT	
ΕΝΩΣΗ	Αριθμός (%)	Καταστολή (%)	Αριθμός (%)	Καταστολή (%)
GDC (100 nM)	74±3 <sup>#</sup>	26	20±2 <sup>#</sup>	66
BRF-004 (1μM)	58±1 <sup>#</sup>	42	48±0 <sup>#</sup>	17
BRF-004 (10 μM)	34±8 <sup>#</sup>	66	21±1 <sup>#</sup>	64
BRF-004 (100 μM)	9±1 <sup>#</sup>	91	10±1 <sup>#</sup>	83
OHT (100 nM)			58±1 <sup>#</sup>	42

\*  $(49-17) \times 100 / 49 = 65\%$

<sup>#</sup> ΣΣΜΟ μέτρησης εις τριπλούν

Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται τα ευρήματα μιας σειράς πειραμάτων αναζήτησης συνέργειας του GDC-0941 (σε συγκεντρώσεις 30 και 100 nM) και των BRF-003, -004, -008 και -020 (σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 μM) με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη (OHT 100 nM). Στη στήλη (1) του Πίνακα 3 παρουσιάζεται ο αριθμός κυττάρων (ως % του TAKIME) παρουσία του GDC-0941 και των BRF. Στη στήλη (2) παρουσιάζεται ο αριθμός κυττάρων (ως % του TAKIME) παρουσία OHT (100 nM). Στη στήλη (3) υπολογίζεται η αθροιστική δράση των GDC-0941 και BRF με την OHT, ως το γινόμενο των δύο πρώτων στηλών. Στην στήλη (4) παρουσιάζεται ο αριθμός κυττάρων (% του TAKIME) παρουσία του συνδυασμού των αναστολέων με την OHT και στην στήλη (5) η συνέργεια των GDC-0941 και BRF με την OHT ως η % αύξηση της

κατασταλτικής αποτελεσματικότητας του συνδυασμού σε σχέση με το άθροισμα της δράσης της OHT και του αναστολέα. Τέλος, στην τελευταία στήλη αποδίδεται η ένταση της συνέργειας ως ισχυρή (>50 %), μέτρια (31-50%), ασθενής (11-30%) ή οριακή (≤10%).

Ο συνδυασμός OHT με GDC-0941 εμφανίζει ισχυρή συνέργεια στα κύτταρα MCF7 αγρίου τύπου, MCF7\_PTEN\_KD και MCF7\_mock\_KD και μέτρια συνέργεια στα ZR75.1. Ο συνδυασμός OHT με BRF-004 εμφανίζει ασθενή συνέργεια στα κύτταρα MCF7\_PTEN\_KD και MCF7 αγρίου τύπου, ενώ αρνητική στα ZR-75.1 και MCF-7\_mock\_KD. Αντίθετα οι συνδυασμοί OHT με BRF-003, -008 και -020 δεν εμφανίζουν συνέργεια ή εμφανίζουν αρνητική αλληλεπίδραση, δηλαδή μειωμένη κατασταλτική δράση σε σχέση με την αθροιστική δράση αναστολέα και OHT. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν τον συνδυασμό 100 nM OHT + 100 nM GDC-0941 ως τον πλέον κατάλληλο για την καταστολή της αντίστασης στην υδρόξυ-ταμοξιφαίνη κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού που φέρουν τη μεταλλάξη PIK3CA E545K με ή χωρίς απάλειψη PTEN.

**Συμπερασματικά**, όσον αφορά στο συνδυασμό GDC-0941 + OHT διαπιστώσαμε μέτρια (ZR75.1) ή ισχυρή συνέργεια (MCF7 αγρίου τύπου, PTEN\_KD και mock\_KD), ενδεικτικό της ισχυρής αλληλεπίδρασης ER και PI3K, και μεγάλη (MCF7 αγρίου τύπου, mock\_KD) ή μικρή (ZR75.1, MCF7\_PTEN\_KD) αποτελεσματικότητα στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενδεικτικό της συμβολής της ενεργοποίησης της PI3K στην ανάπτυξη αντοχής όχι μόνο στην OHT αλλά και στο συνδυασμό. Όσον αφορά στο συνδυασμό BRF-004 + OHT διαπιστώσαμε αντίστοιχα μεγάλη (MCF7 αγρίου τύπου και mock\_KD) ή μικρή (ZR75.1, MCF7\_PTEN\_KD) αποτελεσματικότητα, ενδεικτικό της συμβολής της ενεργοποίησης της PI3K, αλλά αρνητική (ZR-75.1, MCF7\_mock\_KD) ή ασθενή συνέργεια (MCF7 αγρίου τύπου και PTEN\_KD), ενδεικτικό της ασθενούς (ή της μη) αλληλεπίδρασης ER και PI3K στην παρουσία της BRF-004. Δεν είναι γνωστό αν η ασθενής (ή η μη) αλληλεπίδραση είναι χαρακτηριστικό της αλλοστερικής δράσης της BRF-004 στην PIK3CA E545K ή απλά υποδηλώνει έλλειψη αλληλεπίδρασης της BRF-004 με την PIK3CA E545K. Σημειωτέον ότι η αξιοσημείωτη συνέργεια OHT και GDC-0941 στα MCF7\_PTEN\_KD αποτελεί σημαντικό εύρημα γιατί δείχνει ότι ακόμα και η

αυξημένη αντίσταση στην ΟΗΤ λόγω μετάλλαξης PIK3CA E545K και παράλληλης απάλειψης PTEN μπορεί να αντιμετωπιστεί με το συνδυασμό ΟΗΤ και GDC-0941.

<b>Πίνακας 3: Κατασταλτική δράση ενώσεων και του συνδυασμού τους με ΟΗΤ</b>						
Αριθμός κυττάρων (% του εκδόχου)						
MCF-7 αγρίου τύπου						
Ένωση (1)		ΟΗΤ/100 (2)	(3)=(1)×(2)	Ένωση+ΟΗΤ (4)	[(3-4)/(3)]×100	ΣΥΝΕΡΓΕΙΑ
GDC (30nM)	91±3*	0,51	46	28±1*	39%	<b>ΜΕΤΡΙΑ</b>
GDC (100nM)	64±2*	0,50	32	17±3*	50%	<b>ΙΣΧΥΡΗ</b>
BRF-003 (10μM)	85±3	0,52	44	53±2	-20%	-
BRF-004 (10μM)	41±1 <sup>#</sup>	0,55	22	19±1 <sup>#</sup>	18%	<b>ΑΣΘΕΝΗΣ</b>
BRF-008 (10μM)	66±2	0,52	34	36±1	-6%	-
BRF-020 (10μM)	31±3	0,52	16	21±4	-31%	-

MCF-7_PTEN_KD						
GDC (100nM)	82±2	0,72	59	28±1	53%	<b>ΙΣΧΥΡΗ</b>
BRF-004 (10μM)	53±1	0,72	38	28±2	26%	<b>ΑΣΘΕΝΗΣ</b>
MCF-7_mock_KD						
GDC (100nM)	74±3	0,58	43	20±2	53%	<b>ΙΣΧΥΡΗ</b>
BRF-004 (10μM)	34±8	0,58	20	21±1	-5%	-

ZR-75.1						
GDC (30nM)	94±5	0,68	64	40±0	38%	<b>ΜΕΤΡΙΑ</b>
GDC (100nM)	48±4	0,68	33	26±1	21%	<b>ΑΣΘΕΝΗΣ</b>
BRF-003 (10μM)	93±2	0,91	85	79±6	7%	<b>ΟΡΙΑΚΗ</b>
BRF-004 (10μM)	39±2 <sup>#</sup>	0,76	30	38±2 <sup>#</sup>	-27%	-
BRF-008 (10μM)	59±2	0,91	54	62±3	-15%	-
BRF-020 (10μM)	48±3	0,91	44	48±3	-9%	-

ΣΣΜΟ μέτρησης εις τριπλούν, \*ΣΣΜΟ δύο ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν, <sup>#</sup>ΣΣΜΟ τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν



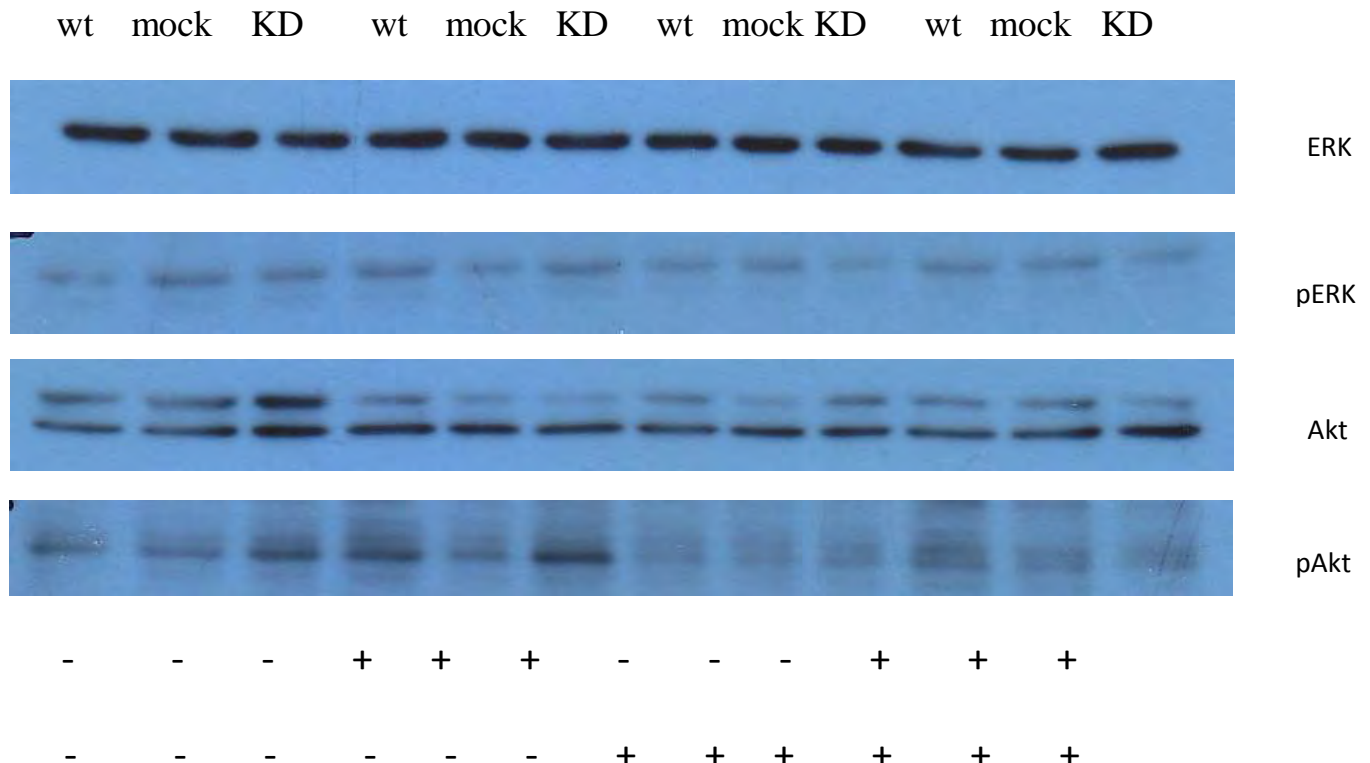
### **Μελέτη της δράσης GDC-0941 και BRF-004 με ανοσοαποτύπωση κατά Western**

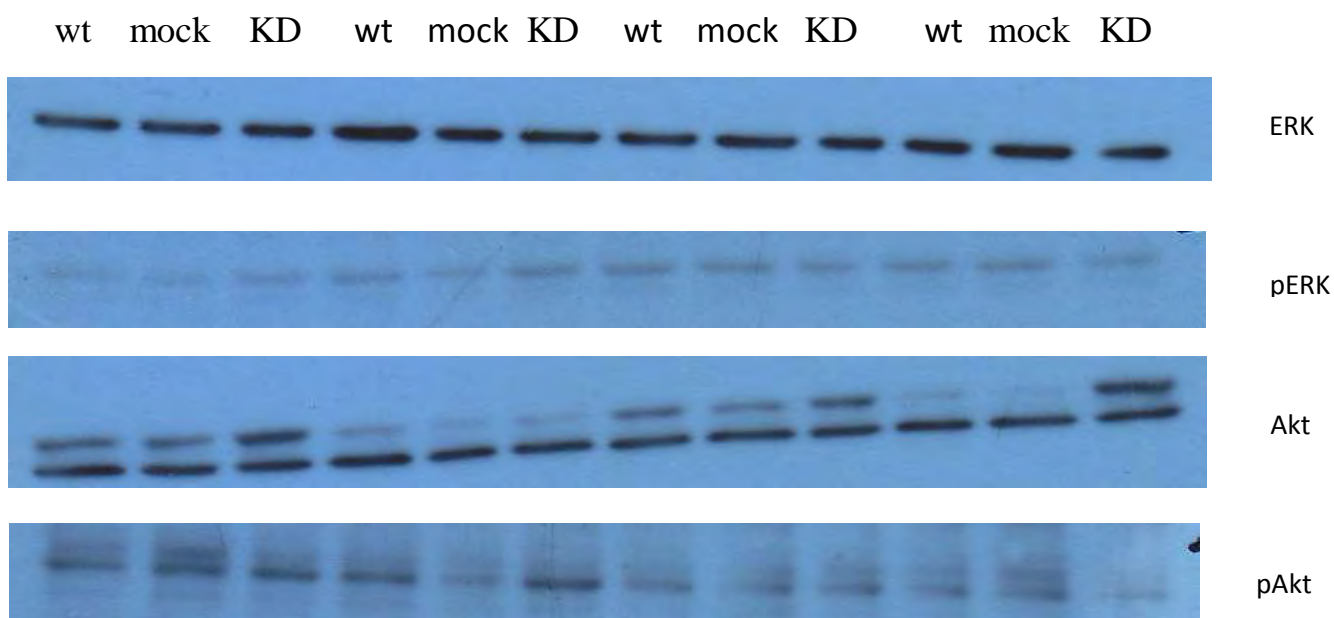
Προκειμένου να ελεγχθεί η δράση του αναστολέα GDC-0941 και της ένωσης BRF-004 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K, εφαρμόστηκε ανοσοαποτύπωση Western σε κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD2, MCF-7\_mock\_KD. Κάθε κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε τρυβλίο 6 θέσεων σε συγκέντρωση 120.000 κυττάρων ανά θέση τρυβλίου σε πλήρες θρεπτικό υλικό (MEM phenol red free + 10% FBS, 0,1nM E<sub>2</sub>, 10mg/ml ινσουλίνη). Έπειτα από δύο ημέρες τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα με 100 nM του αναστολέα GDC-0941 ή με 10 μM της ένωσης BRF-004, παρουσία 100 nM OHT ή εκδόχου (0,1% DMSO) καθώς και παρουσία μόνο 100 nM OHT ή 0,1% DMSO. Εν συνεχεία έγινε λύση των κυττάρων και απομόνωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντισώματα ERK, pERK, Akt και pAkt. Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης σε κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_mock\_KD και MCF-7PTEN\_KD με OHT (100 nM), GDC-0941 (100 nM) και τον συνδυασμό τους (**Εικόνα 7A**), ή με OHT, BRF-004 (10 μM) και τον συνδυασμό τους (**Εικόνα 7B**). Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα ERK και pERK δεν διαφέρουν μεταξύ κυττάρων ανά συνθήκη ή μεταξύ συνθηκών ανά κύτταρο (7A & B). Όμως τα επίπεδα pAkt ) της ομάδας OHT δεν είναι χαμηλότερα από αυτά της ομάδας εκδόχου στα κύτταρα αγρίου τύπου (7A & B), ενδεικτικό της αντοχής των τελευταίων στην OHT. Τα επίπεδα Akt και pAkt της ομάδας GDC είναι αρκετά χαμηλότερα από αυτά της ομάδας εκδόχου στα κύτταρα αγρίου τύπου και mock\_KD αλλά οριακά χαμηλότερα στα PTEN\_KD, ενδεικτικό της αντοχής των τελευταίων στον αναστολέα GDC-0941 (7A). Δεν παρατηρείται το ίδιο την ομάδα BRF-004, όπου τα επίπεδα της Akt είναι ελαφρά χαμηλότερα από αυτά της ομάδας εκδόχου και αυτά της pAkt δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (7B). Τέλος τα επίπεδα Akt της ομάδας GDC + OHT όπως και αυτά της pAkt είναι χαμηλότερα από αυτά της ομάδας εκδόχου στα κύτταρα αγρίου τύπου και mock\_KD αλλά ακόμα πιο χαμηλά στα PTEN\_KD, ενδεικτικό της ευαισθησίας των τελευταίων στο συνδυασμό GDC-0941 + OHT (7A). Δεν παρατηρείται το ίδιο στην ομάδα BRF-004 + OHT, όπου τα επίπεδα της Akt είναι ελαφρά χαμηλότερα

από αυτά της ομάδας εκδόχου στα κύτταρα αγρίου τύπου και mock\_KD αλλά όχι στα PTEN\_KD (7A), ενώ αυτά της pAkt δεν διαφέρουν μεταξύ των δύο ομάδων (7B), ενδεικτικό της μειωμένης ευαισθησίας και των τριών στον συνδυασμό BRF-004 + OHT.

**Συμπερασματικά**, τα παρακάτω αποτελέσματα συμβαδίζουν με την υπόθεση ότι η απάλειψη της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN διεγείρει τη δραστηριότητα του μονοπατιού της PI3K με κατάληξη την αυξημένη έκφραση και φωσφορύλιωση της Akt, την αυξημένη αντίσταση στην OHT και την αύξηση της ευαισθησίας (μείωση της αντίστασης) στην OHT παρουσία GDC-0941 αλλά όχι παρουσία BRF-004.

**A**



**B**

OHT 100 nM

- - - + + + - - - + + +

BRF-004 10μM

- - - - - + + + + + +

**Εικόνα 7: Η απάλειψη PTEN διεγείρει τη δραστηριότητα του μονοπατιού της PI3K, την ευαισθησία σε GDC-0941 και την αντίσταση στην OHT.** (πάνω) Κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD και MCF-7\_mock\_KD εκτέθηκαν για 1 ώρα σε 100 nM OHT, 100 nM GDC-0941 και στο συνδυασμό OHT + GDC-0941 ή (κάτω) σε 100 nM OHT, 10 μM BRF-004 και στο συνδυασμό OHT + BRF-004 και το συνολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western και με αντισώματα κατά ERK, pERK, AKT και pAKT. Όπου wt = αγρίου τύπου.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα τα πειράματα μέτρησης της καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε μικροπλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας το επτάημερο πρωτόκολλο καλλιέργειας 4000 κυττάρων ανά θέση, καθώς αυτό επιτρέπει αρκετούς κύκλους πολλαπλασιασμού και επομένως καλύτερη αξιολόγηση της κατασταλτικής αποτελεσματικότητας των υπό έλεγχο ενώσεων.

Έπειτα από έλεγχο είκοσι υποψήφιων αλλοστερικών αναστολέων της PIK3CA E545K (ενώσεις BRF-001 – BRF-020), ως προς την αποτελεσματικότητα της καταστολής του πολλαπλασιασμού κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού που φέρουν την PIK3CA E545K (MCF-7 αγρίου τύπου) ή την PIK3CA άγριου τύπου (ZR-75.1), παρατηρήσαμε ότι η κατασταλτική δράση όλων στην συγκέντρωση του 1  $\mu\text{M}$  ήταν μηδαμινή, ενώ στην συγκέντρωση των 10  $\mu\text{M}$  ξεχώρισαν οι ενώσεις BRF-003, BRF-004, BRF-008 και BRF-020 ως έχουσες οριακή, σημαντική, μέτρια και πολύ σημαντική, αντίστοιχα, αποτελεσματικότητα καταστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 αγρίου τύπου. Επιπλέον, η BRF-020 ξεχώρισε, γιατί εμφάνισε σημαντική επιλεκτικότητα καταστολής των MCF-7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR75.1. Επόμενα πειράματα που αφορούσαν τον συνδυασμό των τεσσάρων ενώσεων με 100 nM OHT, έναντι των ίδιων κυτταρικών σειρών, έδειξαν ότι οι τέσσερις ενώσεις εμφανίζουν αρνητική συνέργεια με την OHT στα κύτταρα ZR75.1 και ότι το ίδιο ισχύει για τις BRF-003, BRF-008 και BRF-020 στα κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου, γεγονός που τις οδηγεί εκτός του πλαισίου τρέχοντος ενδιαφέροντος για ενώσεις με αλλοστερική κατασταλτική δράση συνέργειας με την OHT. Αντίθετα, η BRF-004 στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  σε συνδυασμό με 100 nM OHT εμφάνισε επιλεκτικότητα συνεργιστικής καταστολής των MCF-7 αγρίου τύπου σε σχέση με τα ZR-75.1 και η κατασταλτική δράση του συνδυασμού αυτού φάνηκε να αυξάνει σημαντικά λόγω συνέργειας.

Διαπιστώσαμε ότι τα κύτταρα ZR75.1 που φέρουν απάλειψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, καθώς και κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου στα οποία έχει γίνει απάλειψη της έκφρασης PTEN (PTEN\_KD) εμφανίζουν μεγαλύτερη

αντίσταση σε OHT, GDC-0941 και BRF-004 σε σχέση με τά κύτταρα MCF-7 αγρίου τύπου και με αυτά στα οποία έχει γίνει πλασματική απάλειψη της έκφρασης PTEN (mock\_KD) και επομένως προσφέρονται για εκτενέστερη μελέτη της συνέργειας μεταξύ OHT και των υποψήφιων αλλοστερικών αναστολέων του μονοπατιού της PI3K σε αντιπαραβολή με τον γνωστό ανταγωνιστικό αναστολέα της PI3K. Έτσι, σε επόμενα πειράματα διαπιστώσαμε μέτρια (ZR75.1) ή ισχυρή συνέργεια (MCF-7 αγρίου τύπου, MCF7\_PTEN\_KD και MCF7\_mock\_KD) όσον αφορά στο συνδυασμό GDC-0941 + OHT, ενδεικτικό της ισχυρής αλληλεπίδρασης του συνδεδεμένου με OHT υποδοχέα ER και της PI3K, και παράλληλα μεγάλη (MCF7 αγρίου τύπου, mock\_KD) ή μικρή (ZR75.1, MCF7\_PTEN\_KD) αποτελεσματικότητα στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενδεικτικό της συμβολής της ενεργοποίησης της PI3K στην ανάπτυξη αντοχής όχι μόνο στην OHT αλλά και στο συνδυασμό OHT + GDC-0941. Όσον αφορά στον συνδυασμό BRF-004 + OHT διαπιστώσαμε, αντίστοιχα, μεγάλη (MCF-7 αγρίου τύπου και MCF-7\_mock\_KD) ή μικρή (ZR75.1, MCF7\_PTEN\_KD) αποτελεσματικότητα καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενδεικτικό ξανά της αρνητικής συμβολής της ενεργοποίησης της PI3K και αντίθετα, αρνητική (ZR-75.1, MCF-7\_mock\_KD) ή ασθενή συνέργεια (MCF-7 αγρίου τύπου και MCF-7\_PTEN\_KD), ενδεικτικό της ασθενούς (ή της μη) αλληλεπίδρασης του υποδοχέα ER και της PI3K στην παρουσία της BRF-004. Δεν είναι γνωστό αν αυτή η ασθενής (ή η μη) αλληλεπίδραση είναι χαρακτηριστικό της αλλοστερικής δράσης της BRF-004 στην PIK3CA E545K ή απλά υποδηλώνει έλλειψη αλληλεπίδρασης της BRF-004 με την PIK3CA E545K. Τέλος, αξιωματικά ότι η αξιοσημείωτη συνέργεια OHT και GDC-0941 στα MCF7\_PTEN\_KD αποτελεί σημαντικό εύρημα καθόσον δείχνει ότι ακόμα και η αυξημένη αντίσταση στην OHT που παρατηρείται λόγω της μετάλλαξης PIK3CA E545K και της παράλληλης απάλειψης PTEN, μπορεί να αντιμετωπιστεί με το συνδυασμό OHT και GDC-0941.

Αποτελέσματα πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western που αποσκοπούσαν στη μελέτη της δράσης του υποψήφιου αλλοστερικού αναστολέα BRF-004 σε σύγκριση με τη δράση του γνωστού ανταγωνιστικού αναστολέα GDC-0941 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K διαπιστώθηκε ότι συμβαδίζουν με την υπόθεση ότι η απάλειψη της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN διεγείρει τη δραστηριότητα του μονοπατιού της PI3K με κατάληξη την αυξημένη έκφραση και φωσφορυλίωση της Akt, την αυξημένη

αντίσταση στην OHT και την αύξηση της ευαισθησίας (δηλαδή μείωση της αντίστασης) στην OHT παρουσία GDC-0941 αλλά όχι παρουσία BRF-004.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δείχνουν ότι ο αναστολέας GDC-0941 παρουσιάζει ισχυρή συνέργεια με την υδρόξυ-ταμοξιφαίνη στα MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD και MCF-7\_mock\_KD και μέτρια συνέργεια στα ZR-75.1. Αντίθετα, ο συνδυασμός OHT με BRF-004 εμφανίζει αρνητική (ZR-75.1, MCF-7\_mock\_KD) ή ασθενή συνέργεια (MCF-7 αγρίου τύπου, MCF-7\_PTEN\_KD). Τέλος, οι συνδυασμοί OHT με BRF-003, -008 και -020 δεν εμφανίζουν συνέργεια ή εμφανίζουν αρνητική αλληλεπίδραση, δηλαδή μειωμένη κατασταλτική δράση σε σχέση με την OHT. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν τον συνδυασμό 100 nM OHT + 100 nM GDC-0941 ως τον πλέον κατάλληλο για την καταστολή της αντίστασης στη υδρόξυ-ταμοξιφαίνη κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού που φέρουν της μεταλλάξη PIK3CA E545K με ή χωρίς απάλειψη PTEN. Κατά αναλογία, τα αποτελέσματα μας δεν φαίνεται να προτείνουν δράση αλλοστερικού αναστολέα για τις υπό έλεγχο ενώσεις BRF, με επιφύλαξη για την BRF-004 στο βαθμό που ανταγωνιστικοί και αλλοστερικοί αναστολείς της PIK3CA E545K δεν θα αλληλεπιδρούσαν με τον ίδιο τρόπο με την OHT μέσω του υποδοχέα ER.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Cauley, J. A. et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat* 2001, 65, 125-34.
- Folkes et al. The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem.* 2008, 25;51, 5522-32.
- Fournier, A. et al. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer* 2005, 114, 448-54.
- Fu et al. Overcoming endocrine resistance due to reduced PTEN levels in estrogen receptor-positive breast cancer by co-targeting mammalian target of rapamycin, protein kinase B, or mitogen-activated protein kinase kinase. *Breast Cancer Research* 2014, 16:430.
- Grese, A. T. et al. Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 14105–14110, December 1997, Pharmacology.
- Howell, A. et al. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 2002, 20, 3396-403.
- Klopper, A.; Hall, M. New synthetic agent for the induction of ovulation: preliminary trials in women. *Br Med J* 1971, 1, 152-4.
- Lerner, L. J.; Jordan, V. C. Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. *Cancer Res* 1990, 50, 4177-89.
- Marsden, J.; Sacks, N. The national randomised trial of hormone replacement therapy in women with a history of early stage breast cancer: an update. *J Br Menopause Soc* 2002, 8, 129.
- Miller et al. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2011, 13, 224.

- Muti, P. The role of endogenous hormones in the etiology and prevention of breast cancer: the epidemiological evidence. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1028, 273-82.
- O'Brien et al. Predictive Biomarkers of Sensitivity to the phosphatidylinositol 3  $\epsilon$  Kinase Inhibitor GDC-0941 in Breast Cancer Preclinical Models. *Clin Cancer Res* 2010, 16:3670-3683, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2828.
- Osborne, C. K. et al. Double-blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial. *J Clin Oncol* 2002, 20, 3386-9.
- Vogel, V. G. et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama* 2006, 295, 2727-41.
- Wakeling, A. E.; Bowler, J. Steroidal pure antioestrogens. *J Endocrinol* 1987, 112, R7-10.
- Wakeling, A. E.; Dukes, M.; Bowler, J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 1991, 51, 3867-73.
- Williamson, J. G.; Ellis, J. D. The induction of ovulation by tamoxifen. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1973, 80, 844-7.
- Yager, J. D.; Davidson, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006, 354, 270-82.