

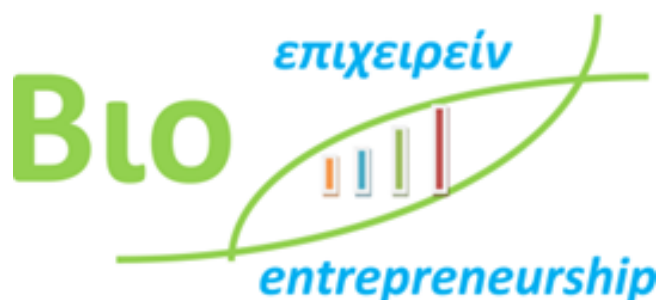


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**IN VITRO ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ: ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΜΙΔΙΚΑ
ΠΑΡΑΓΩΓΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ, ΚΥΡΙΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΖΩΤΟΥ
Α.Μ. 00036
ΑΘΗΝΑ, 2019**

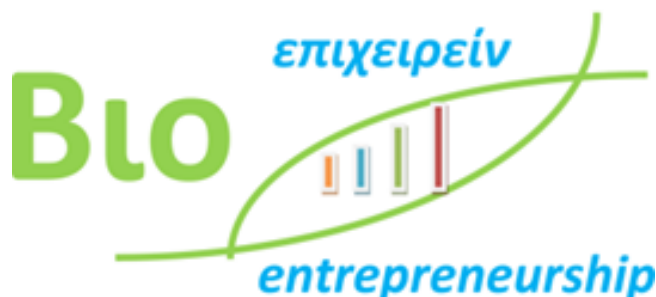


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

**IN VITRO BIOLOGICAL ASSESSMENT OF POTENTIAL ANTICANCER EFFECT OF
SMALL ORGANIC COMPOUNDS: BENZOTHIAZOLE AND AMIDE
DERIVATIVES**

SUPERVISOR: PANAGIOTIS GEORGIADIS, SENIOR RESEARCHER

**CHRISTINA ZOTOU
R.N. 00036
ATHENS, 2019**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Π. Γεωργιάδης

Κύριος Ερευνητής

Β. Πλέτσα

Κύρια Ερευνήτρια

Ι. Κώστας

Διευθυντής Ερευνών

Στους γονείς μου...

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ	4
ΣΚΟΠΟΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 <i>In vitro</i> μελέτες έναντι <i>in vivo</i> μελετών τοξικότητας.....	6
1.2 Σύγχρονες τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων.....	7
1.3 Βιολογική αποτίμηση εξεταζόμενων ενώσεων-Κριτήρια επιλογής.....	9
1.3.1 Βενζοθειαζολικά παράγωγα.....	9
1.3.2 Βενζοαμιδικά παράγωγα.....	13
1.3.3 Σουλφοναμιδική και κυκλοπρόπυλο-ομάδα.....	17
1.3.4 Δυνητικοί αναστολείς της κινάσης BRAF V600E.....	17
1.4 Ο ρόλος της κινάσης BRAF και οι αναστολείς της.....	18
1.5 Επιλογή κυτταρικών σειρών.....	20
1.6 Μελέτες βιωσιμότητας σε κύτταρα.....	20
1.6.1 Μέθοδος MTT.....	21
1.6.2 Μέθοδος ΧΤΤ.....	21
1.6.3 Μέθοδος LDH.....	22
1.7 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου.....	23
1.7.1 Απόπτωση.....	24
1.7.2 Κασπάσες.....	25
1.7.3 Νέκρωση.....	25
1.7.4 Προγραμματισμένη νέκρωση-Νεκρόπτωση.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 Χημικά αντιδραστήρια.....	27
2.2 Χημικές ενώσεις.....	28
2.3 Μοριακή πρόσδεση (<i>In silico</i> docking).....	29
2.3.1 Επικύρωση μεθόδου μοριακής πρόσδεσης.....	32
2.4 Κυτταρικές σειρές.....	34
2.4.1 Καλλιέργεια κυτάρων.....	35
2.5 Μεθοδολογία MTT.....	36
2.5.1 Δοκιμασία MTT για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα.....	36
2.5.2 Δοκιμασία MTT για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα.....	38
2.6 Μεθοδολογία ΧΤΤ.....	39
2.6.1 Προετοιμασία του αντιδραστηρίου.....	39
2.6.2 Δοκιμασία ΧΤΤ για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα.....	39

2.6.3 Δοκιμασία ΧΤΤ για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα	41
2.7 Μεθοδολογία LDH	42
2.7.1 Σύνοψη διαδικασίας.....	42
2.7.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων	43
2.7.3 Προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού κυττάρων για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH.....	43
2.7.4 Δοκιμασία LDH για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα	46
2.7.5 Δοκιμασία LDH για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα	47
2.8 Ανίχνευση πρωτεϊνών-δεικτών κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	49
2.8.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών	49
2.8.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών	50
2.8.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) .	50
2.8.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης.....	52
2.8.5 Εμφάνιση συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος	52
2.8.6 Αντισώματα.....	53
2.9 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	54
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
3.1 Μοριακή πρόσδεση (<i>In silico</i> docking).....	56
3.2 Σύγκριση <i>in vitro</i> μεθοδολογιών κυτταρικής βιωσιμότητας με πρότυπη ουσία	65
3.3 Βιολογική αποτίμηση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων <i>in vitro</i>	68
3.4 Προσδιορισμός μηχανισμού κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά WESTERN.....	81
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τοξικότητα και η ανθεκτικότητα στα παραδοσιακά χημειοθεραπευτικά φάρμακα καθιστά επείγουσα την ανάπτυξη νέων στόχων και νέων φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση *in vitro* μίας σειράς βενζοθειαζολικών και αμιδικών παραγώγων, που σχεδιάστηκαν ως δυνητικοί αναστολείς της κινάσης BRAF V600E, αρχικά στην κυτταρική σειρά του μελανώματος (WM 164) και στη συνέχεια σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων παχέος εντέρου (HCT 116), ήπατος (Hep G2), αδενοκαρκινώματος προστάτη (PC-3), αδενοκαρκινώματος μαστού (MDA-MB 231), οστεοσαρκώματος (U2-OS) και πνεύμονα (A 549). Για συγκριτικούς σκοπούς, χρησιμοποιήθηκαν και οι φυσιολογικοί ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα εμβρύου HLF-1. Η επίδραση των ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα ανιχνεύθηκε με τις δοκιμασίες ΧΤΤ και ΜΤΤ, οι οποίες μετρούν τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων, ενώ σε επιλεγμένη ένωση προσδιορίστηκε απ' ευθείας η κυτταροτοξικότητα μετρώντας την απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης από τα λυμένα κύτταρα στο μέσο κυτταροκαλλιέργειας (LDH). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης, που πραγματοποιήθηκαν μέσω προγραμμάτων υπολογιστικής χημείας, επιβεβαιώθηκαν εν μέρει στην *in vitro* βιολογική αποτίμηση των εξεταζόμενων ενώσεων στα κύτταρα του μελανώματος, καθώς οι ενώσεις με τις χαμηλότερες τιμές docking score και με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις με τα κρίσιμα αμινοξέα διαπιστώθηκε πως έχουν μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις και μάλιστα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η εξέταση των ενώσεων στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από συμπαγείς όγκους κατέληξε σε ποικίλα συμπεράσματα, από μεγάλη αντιπολλαπλασιαστική δράση (μικρές τιμές IC₅₀) έως καθόλου δραστηριότητα, ενώ παράλληλα δεν έδειξε τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα, γεγονός που αποτελεί μία ένδειξη εκλεκτικότητας έναντι καρκινικών κυττάρων. Τέλος, βρέθηκε ότι οι ενώσεις επάγουν τόσο νεκρωτικό, όσο και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Βενζοθειαζολικά παράγωγα, Βενζοαμιδικά παράγωγα, Αναστολείς BRAF V600E, Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, Κυτταρική βιωσιμότητα, Κυτταροτοξικότητα.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η *in vitro* βιολογική αποτίμηση μίας σειράς βενζοθειαζολικών και αμιδικών παραγώγων, οι οποίες σχεδιάστηκαν ως δυνητικοί αναστολείς της κινάσης BRAF V600E και συντέθηκαν έπειτα από μελέτες μοριακής πρόσδεσης μέσω προγραμμάτων υπολογιστικής χημείας στο Εργαστήριο Οργανικής/ Οργανομεταλλικής Χημείας και Κατάλυσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας (ΙΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Κατά τη διάρκεια της υλοποίησης της εργασίας στο Πρόγραμμα Χημικής Καρκινογένεσης και Γενετικής Τοξικολογίας, μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση των παραγώγων αυτών αρχικά στα κύτταρα του μελανώματος, καθώς ο καρκίνος αυτός φέρει τη μετάλλαξη BRAF V600E και στη συνέχεια σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από συμπαγείς όγκους. Παράλληλα, έγιναν οι πρώτες προσπάθειες αποσαφήνισης του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που επάγουν επιλεγμένες ενώσεις.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *In vitro* μελέτες έναντι *in vivo* μελετών τοξικότητας

Μέχρι να διαγνωστούν πολλοί κοινοί τύποι καρκίνων είναι ήδη απειλητικοί για τη ζωή και παρ' όλο που σε πολλές περιπτώσεις η αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου παράγει σημαντικά οφέλη, μπορεί να έχει μικρή ευεργετική επίδραση στο προσδόκιμο ζωής. Από την εισαγωγή των κυτταροτοξικών παραγόντων για συστηματική θεραπεία της νόσου υπήρξε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης για πολλούς καρκινοπαθείς. Ωστόσο, οι αριθμοί εξακολουθούν να δείχνουν ότι για πολλούς συμπαγείς όγκους αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει, στην καλύτερη περίπτωση, μία βελτίωση του προσδόκιμου, 2-3 ετών, και το όφελος αυτό πρέπει επίσης να αντισταθμιστεί με τις δυσάρεστες ή ακόμα και επικίνδυνες παρενέργειες. Υπάρχει, λοιπόν, μία επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη αποτελεσματικότερων και λιγότερο τοξικών θεραπειών για τον καρκίνο.

Ιστορικά, η ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων ήταν σε μεγάλο βαθμό μία εμπειρική διαδικασία, με νέες χημικές ενώσεις να εξετάζονται σε διάφορες κυτταρικές σειρές και πειραματικούς όγκους σε ζώα που αντιστοιχούν σε ανθρώπινους γνωστούς καρκίνους. Η πλειονότητα των παραγόντων που εντοπίστηκαν με αυτή τη διαδικασία ήταν «κυτταροτοξικοί», αλλά είχαν την τάση να είναι ενεργοί στην «μέγιστη ανεκτή δόση». Οι κανονισμοί πάντα απαιτούσαν δοκιμές τοξικότητας πριν από τις κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, λόγω των γνωστών κυτταροτοξικών ιδιοτήτων πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων, οι απαιτήσεις για εκτεταμένη προκλινική τοξικολογία στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων είναι υπερβολικές, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή κλινική τους χρήση. Παρ' όλο που υπάρχει κάποια τεκμηρίωση ως προς τον προσδιορισμό της οξείας τοξικότητας και της μέγιστης ανεκτής δόσης ως οδηγό για μία ασφαλή αρχική δόση σε κλινικές δοκιμές, οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας είναι πιο δύσκολο να τεκμηριωθούν.

Δεν υπάρχει καμία τεκμηρίωση για τις σημερινές απαιτήσεις για προκλινικές τοξικολογικές δοκιμές αντικαρκινικών παραγόντων χρησιμοποιώντας μη τρωκτικά μοντέλα και εκτεταμένες χρόνιες μελέτες. Διαπιστώθηκε ότι όσον αφορά μία ασφαλή αρχική δόση και τα συνήθη δο-

σολογικά όρια τοξικότητας, η τοξικολογία μόνο στα τρωκτικά είδη είναι ένας ασφαλής και γρήγορος τρόπος για να προχωρήσουν νέοι παράγοντες στις κλινικές δοκιμές φάσης I. Για τους μελλοντικούς παράγοντες που θα είναι πιο εκλεκτικοί έναντι των καρκινικών κυττάρων, θα χρειαστεί σοβαρή επανεκτίμηση της σημασίας των προκλινικών δοκιμών τοξικότητας.

Αν δεν υπάρξει αναθεώρηση από τους ρυθμιστικούς φορείς, οι τρέχουσες απαιτήσεις για προκλινική τοξικολογία θα καθυστερούν τη χρήση των νέων θεραπειών στην κλινική πράξη. Πρέπει να είναι ανήθικη η απειρισκεψία που αφορά την άσκοπη ταλαιπωρία των ζώων και την άρνηση στους καρκινοπαθείς της πρόσβασης σε πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Σε τελική ανάλυση, η αποτελεσματικότητα οποιασδήποτε νέας θεραπείας μπορεί να προσδιοριστεί μόνο στην κλινική πράξη, στο εργαστήριο είναι δυνατή μόνον η προσπάθεια για μοντελοποίηση της κλινικής ασθένειας (Double *et al.*, 2002).

Ποιές είναι όμως οι εναλλακτικές; Υπάρχει μία ιδέα προς τα που κινείται η επιστήμη της τοξικολογίας. Οι δοκιμές σε ζώα παρέχουν προκλινικές πληροφορίες σχετικές με τους δυνητικούς κινδύνους για την υγεία, καθώς και τον καθορισμό μίας ασφαλούς αρχικής δόσης για μελέτες σε ανθρώπους. Το Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity programme διαπίστωσε ότι ενώ οι δοκιμές οξείας τοξικότητας σε τρωκτικά ήταν ακριβείς μόνο κατά 65% στην πρόβλεψη των θανατηφόρων συγκεντρώσεων στο αίμα ανθρώπων, ένας συνδυασμός *in vitro* δοκιμών κυτταροκαλλιέργειας από κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης, προέβλεπε την οξεία τοξικότητα με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια. 29 ανεξάρτητα εργαστήρια μελέτησαν ένα σύνολο 50 χημικών ενώσεων με χρήση 61 διαφορετικών *in vitro* δοκιμών και βρέθηκαν τέσσερις δοκιμές οι οποίες, εάν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό, θα μπορούσαν να προβλέψουν τις θανατηφόρες συγκεντρώσεις στο αίμα με ακρίβεια περίπου 80%. Επομένως, η μετάβαση στις μεθόδους *in vitro* κυτταροκαλλιέργειών και σε άλλες δοκιμές χωρίς χρήση ζώων αποτελεί ιατρική αναγκαιότητα (Barnard *et al.*, 2002).

1.2 Σύγχρονες τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων

Το γεγονός ότι το 75% περίπου του συνολικού κόστους σχεδιασμού φαρμάκων οφείλεται στις αποτυχημένες προσπάθειες κατά το στάδιο των κλινικών δοκιμών δημιούργησε την ανάγκη εύρεσης νέων τεχνικών με μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας.

Οι τεχνικές αυτές βασίστηκαν στην πρόοδο των τομέων της βιολογίας, της βιοτεχνολογίας, της συνδυαστικής χημείας και της πληροφορικής. Συγκεκριμένα, οι επαναστατικές ανακαλύψεις στους τομείς της πρωτεομικής (proteomics) και της γονιδιωματικής (genomics), καθώς και οι διαρκείς εξελίξεις της επιστήμης της πληροφορικής και των ηλεκτρονικών υπολογιστών αξιοποιήθηκαν, ώστε από την εποχή της τυχαίας ανακάλυψης που στηριζόταν κυρίως στην παρατήρηση και στη μελέτη των φυσικών προϊόντων να περάσουμε πλέον στην εποχή του Ορθολογικού Σχεδιασμού Φαρμάκων (Rational Drug Design) ή σχεδιασμού με βάση τη δομή (Structure-based drug design-SBDD).

Σήμερα, οι επιστήμονες έχουν κατανοήσει τους μηχανισμούς των ασθενειών που εξετάζουν τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε μοριακό επίπεδο. Επομένως, η αναζήτηση νέων φαρμάκων έχει ως σημείο εκκίνησης την ίδια την ασθένεια.

Η Σάρωση Υψηλής Απόδοσης (High Throughput Screening-HTS) με ρομποτικά συστήματα αποτελεί μία από τις πλέον σύγχρονες μεθόδους σχεδιασμού φαρμάκων. Πρόκειται ουσιαστικά για μία αυτοματοποιημένη διαδικασία σάρωσης και δοκιμής μεγάλου αριθμού υποψήφιων ενώσεων που δρουν ενάντια σε συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους, π.χ. ένζυμα, όπως κινάσες. Κύριος στόχος της μεθόδου είναι η σάρωση μεγάλων βιβλιοθηκών μορίων σε ποσοστό που μπορεί να υπερβεί μερικές χιλιάδες ενώσεων ανά ημέρα ή εβδομάδα. Έτσι, διευκολύνεται η πρόωρη απομάκρυνση των ακατάλληλων για τον εκάστοτε βιολογικό στόχο ενώσεων.

Οι *in silico* τεχνικές είναι τεχνικές μοριακού σχεδιασμού με χρήση Η/Υ και βασίζονται σε αρχές και μεθόδους της κβαντικής χημείας. Το κυριότερο πλεονέκτημα τους είναι η ταχεία ανάλυση και αξιοποίηση βιολογικών και ιατρικών δεδομένων, που αντλούνται από διάφορες πηγές. Οι παραπάνω πληροφορίες χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία υπολογιστικών μοντέλων προσομοίωσης. Οι τεχνικές αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή της ένωσης-οδηγού (lead compound), έτσι ώστε να μειωθεί το ποσοστό των αποτυχημένων προσπαθειών κατά τις κλινικές δοκιμές.

Η μοριακή πρόσδεση (*in silico docking*) είναι η υπολογιστική τεχνική που αναφέρεται στον σχετικό προσανατολισμό του προσδέτη σε σχέση με την πρωτεΐνη-στόχο. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αυτή η τεχνική για την επιλογή των ενώσεων που θα εξεταστούν ως προς την ενδεχόμενη αντικαρκινική τους δράση.

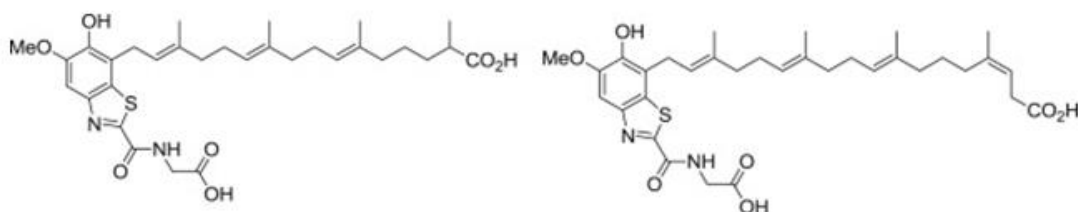
1.3 Βιολογική αποτίμηση εξεταζόμενων ενώσεων-Κριτήρια επιλογής

1.3.1 Βενζοθειαζολικά παράγωγα

Τα θειαζόλια και τα βενζοθειαζόλια βρίσκονται σε μία μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών μορίων και φυσικών προϊόντων. Οι χερσαίοι και θαλάσσιοι οργανισμοί και μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντική πηγή αυτών των ετερόκυκλων ενώσεων, οι οποίες καταλαμβάνουν ένα κυρίαρχο μέρος στην οργανική και φαρμακευτική χημεία, καθότι ως επί το πλείστον λειτουργούν ως φαρμακοφόρα. Το θειαζόλιο και τα παράγωγά του έχουν μεγάλη επιστημονική εκμετάλλευση και ενδιαφέρον, καθώς συνοδεύονται από σχεδόν όλες τις βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιβακτηριακές, αντιπρωτοζωικές, ανθελονοσιακές, αντικαρκινικές, αντιυπερτασικές, αντιφλεγμονώδεις, για θεραπεία αλλεργιών, δράσεις γονιδιακής διαμόρφωσης, κατά της σχιζοφρένειας, κατά των λοιμώξεων από τον HIV και πολλές άλλες (Rouf *et al.*, 2015).

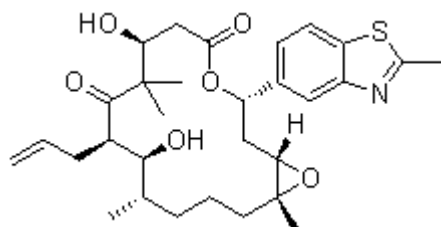
1.3.1.1 Βενζοθειοζόλια ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Τα φυσικώς απαντώμενα παράγωγα βενζοθειαζολίου, οι ερυθραζόλες A και B (Εικόνα 1.1), απομονώθηκαν από το *erythrobacter* sp. από ιζήματα μαγκρόβιου. Οι ερυθραζόλες είναι μικτής βιοσυνθετικής προέλευσης που περιέχουν ένα τετραυποκατεστημένο βενζοθειαζόλιο, μία προσδεμένη διπερπενική πλευρική αλυσίδα και μία μονάδα γλυκίνης. Η ερυθραζόλη B είχε διερευνηθεί ότι κατέχει ισχυρή κυτταροτοξική δραστηριότητα εναντίον μίας ομάδας κυτταρικών σειρών μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται από 1,5 έως 6,8 mM.



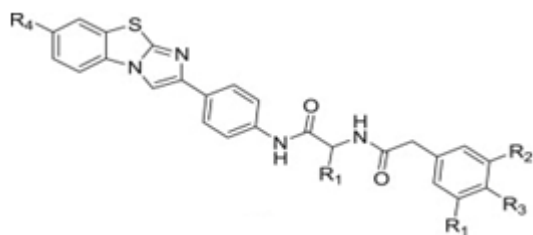
Εικόνα 1.1: Χημική δομή της Ερυθραζόλης Α (αριστερά) και Β (δεξιά).

Τα μακρολίδια είναι μία καλή πηγή πολλών βιοδραστικών θειαζολών και τα πιο καλά μελετημένα είναι οι εποθιλόνες. Οι εποθιλόνες απομονώθηκαν αρχικά από την γλοιώδη μούχλα *Sorangium cellulosum* και διαπιστώθηκε ότι εμφανίζουν αντιμυκητιασική δράση, καθώς επίσης ότι δρουν σε μικροσωληνίσκους όπως η ταξόλη, δηλαδή επάγωντας τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης σε μικροσωληνίσκους και σταθεροποιώντας αυτούς. Στη συνέχεια, ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων των εποθιλονών παρασκευάστηκε με βιοσύνθεση, ολική σύνθεση και ημισύνθεση για κλινικές δοκιμές από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, μεταξύ των οποίων και το βενζοθειαζολικό παράγωγο σαγκοπιλόνη (Εικόνα 1.2).



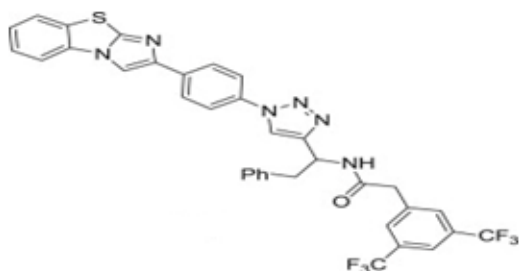
Εικόνα 1.2: Χημική δομή της σαγκοπιλόνης, παράγωγο της Εποθιλόνης.

Καινούριο είδος οργανικών μορίων που περιέχουν το νέο τμήμα 4-[ιμιδαζο(2,1-b)βενζοθειαζολ-2-υλ]φαινουλίου (Εικόνα 1.3) έχει αξιολογηθεί λεπτομερώς σε βιολογικές μελέτες έναντι του νέου Met υποδοχέα κινασών τυροσίνης (ο υποδοχέας αυτός είναι ένας στόχος σε αντικαρκινικές θεραπείες κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου και της ανθεκτικότητας στη θεραπεία). Τα αμινοξικά αμίδια που περιέχουν αυτό το τμήμα μελετήθηκαν με μοριακή μοντελοποίηση και ελέγχθηκαν βιολογικώς και βρέθηκαν αρκετά αποτελεσματικοί παράγοντες που στοχεύουν στην ογκογένεση που κατευθύνεται από τον Met υποδοχέα.



Εικόνα 1.3: Χημική δομή οργανικού μορίου που περιέχει το τμήμα 4-[ιμιδαζο(2,1-β)βενζοθειαζολ-2-υλ)]φαινυλίου.

Μία νέα βενζοθειαζολική ένωση με βάση την τριαζόλη συντέθηκε με κυκλοπροσθήκη καταλυόμενη από μονοσθενή χαλκό. Οι βιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η ένωση ήταν ικανή να αναστείλει αποτελεσματικά *in vitro* την ογκογένεση των καρκινικών κυτταρικών σειρών H1437 (μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα) και GTL-16 (ανθρώπινο γαστρικό καρκίνωμα) (Εικόνα 1.4).

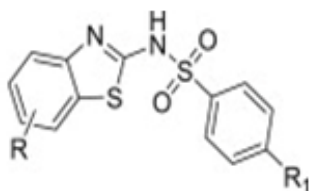


Εικόνα 1.4: Χημική δομή βενζοθειαζολικής ένωσης με βάση την τριαζόλη.

1.3.1.2 Βενζοθειαζόλια ως αντιμικροβιακοί και αντιμυκητιασικοί παράγοντες

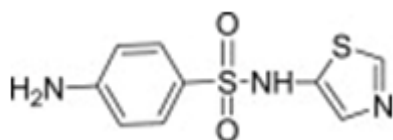
Η αυξανόμενη τάση στην αντοχή στους αντιβακτηριακούς παράγοντες κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη νέων χημικών ουσιών με χαμηλές ανεπιθύμητες ενέργειες και χωρίς αντοχή. Μία βιβλιοθήκη νέων θειαζολικών παραγώγων έχει αναφερθεί και αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική σε σύγκριση με τα αντιβιοτικά β-λακτάμης όσον αφορά την βακτηριακή αντοχή.

Διάφορα θειαζόλια και βενζοθειαζόλια που περιέχουν ένα τμήμα βενζυλοσουλφοναμιδίου (Εικόνα 1.5) έχουν συντεθεί για βιολογικούς σκοπούς και έχουν υποβληθεί σε δοκιμασία έναντι μίας ομάδας επιλεγμένων Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, ζυμών και μούχλας. Τα συντιθέμενα υποκατεστημένα σουλφανιλαμίδια έδειξαν αποτελεσματικές αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι Gram θετικών βακτηρίων, όπως αρκετών βάκιλλων, σταφυλόκοκκων και στρεπτόκοκκων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών *S. aureus* και *Staphylococcus epidermidis*, σε σύγκριση με εκείνες των προτύπων αμπικιλίνης και σουλφαμεθοξαζόλης. Η αντιμυκητιασική δραστηριότητα συγκρίθηκε με ένα αντιμυκητιασικό φάρμακο, τη μικοναζόλη.



Εικόνα 1.5: Χημική δομή βενζοθειαζολικού παραγώγου που περιέχει το τμήμα βενζυλοσουλφοναμιδίου.

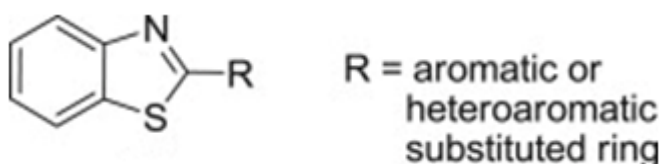
Η ένωση σουλφαθειαζόλη που περιέχει θειαζόλιο βρέθηκε να δείχνει καλή αντιβακτηριακή δραστηριότητα (Εικόνα 1.6). Μία βιβλιοθήκη βενζοθειαζολικών παραγώγων συντέθηκε και αξιολογήθηκε για αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Η δραστηριότητα μερικών από τις συντιθέμενες ενώσεις έναντι των προτύπων αμπικιλίνης και χλωραμφενικόλης βρέθηκε να είναι δύο φορές καλύτερη έναντι των στελεχών των Gram θετικών βακτηρίων *Bacillus theringiensis* και των Gram αρνητικών *Escherichia coli*.



Εικόνα 1.6: Χημική δομή της σουλφαθειαζόλης.

1.3.1.3 Βενζοθειαζολία ως αναστολείς β-γλυκουρονιδάσης

Μία ποικιλία βενζοθειαζολικών παραγώγων έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για δραστικότητα αναστολής της β-γλυκουρονιδάσης. Από τη βιολογική αξιολόγηση, πολλά παράγωγα βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερη δράση αναστολής της β-γλυκουρονιδάσης από την πρότυπη 1,4-λακτόνη του D-σακχαρικού οξέος, η οποία έχει προστατευτική δράση με αντικαρκινογόνες, αποτοξινωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Bhattacharya *et al.*, 2011). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής πρόσδεσης για το καλύτερο μοτίβο πρόσδεσης (Εικόνα 1.7).



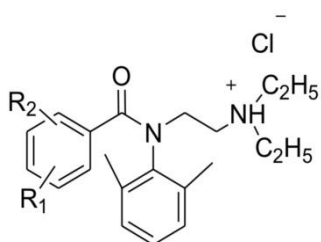
Εικόνα 1.7: Χημική δομή βενζοθειαζολικών παραγώγων ως αναστολείς β-γλυκουρονιδάσης.

1.3.2 Βενζοαμιδικά παράγωγα

Τα βενζοαμίδια θεωρούνται σημαντική δομική μονάδα που υπάρχει σε πολλές ενώσεις με πιθανές βιολογικές δράσεις και εξάγονται από φυσικές πηγές. Στο αμίδιο και τα τρία άτομα στην αλυσίδα O-C-N είναι αντιδρώντα, γεγονός που το καθιστά χρήσιμο τμήμα στις οργανικές ενώσεις και ως εκ τούτου αποτελεί βασικό μέρος στη φαρμακευτική χημεία. Τα βενζοαμιδικά παράγωγα κατέχουν διαφορετικά είδη φαρμακολογικών δράσεων, όπως αντιμικροβιακές, αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, καρδιαγγειακές, αντιοξειδωτικές, αντισπασμωδικές, αντικαταθλιπτικές και άλλες βιολογικές δράσεις. Για το λόγο αυτό, οι επιστήμονες έχουν ενδιαφερθεί για την ανάπτυξη διαφόρων νέων βενζοαμιδικών παραγώγων. Υπάρχει ακόμη ανάγκη να βελτιωθούν τα ήδη χρησιμοποιούμενα και να αναζητηθούν νέα και πιο αποτελεσματικά βενζοαμιδικά παράγωγα (Asif *et al.*, 2016).

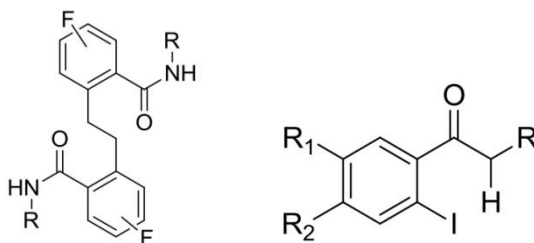
1.3.2.1 Εφαρμογές βενζοαμιδικών παραγώγων

Τα βενζοαμιδικά παράγωγα που φαίνονται στην Εικόνα 1.8 παρουσίασαν βέλτιστη αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*.



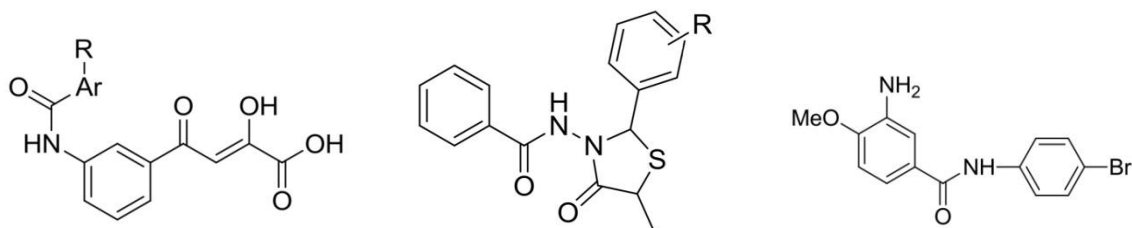
Εικόνα 1.8: Χημική δομή βενζοαμιδικών παραγώγων με αντιμικροβιακή δράση.

Φθοροπαράγωγα του βενζοαμιδίου συντέθηκαν και έδειξαν αντιμυκητιασική δράση, όπως επίσης παράγωγα του 2-ιωδοβενζοαμιδίου με δράση έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *P.citrophthora*, *B.cinerea*, *R.solani* και ειδών *Alternaria* (Εικόνα 1.9).



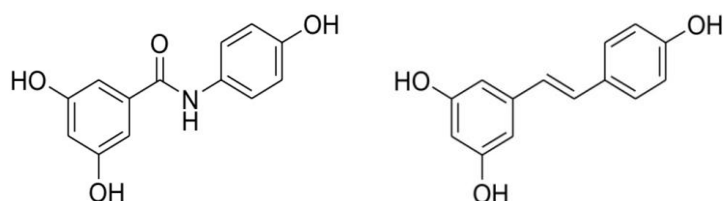
Εικόνα 1.9: Χημική δομή φθοροπαράγωγων του βενζοαμιδίου (αριστερά) και παραγώγων του 2-ιωδοβενζοαμιδίου (δεξιά).

Βενζοαμίδια που περιέχουν δικετοοξέα σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν για δραστηριότητα έναντι του ιού HIV. Ακόμη, το N-(υποκατεστημένο φαινυλ-5-μεθυλ-4-οξο-1,3-θειαζολιδιν-3-υλ)βενζοαμίδιο παρουσίασε σημαντική αντι-HIV δράση. Μία σειρά από N-φαινυλβενζοαμιδικά παράγωγα συντέθηκε, εκ των οποίων η ένωση που φαίνεται στην Εικόνα 1.10 (δεξιά) ήταν πολλά υποσχόμενη έναντι του εντεροϊού.



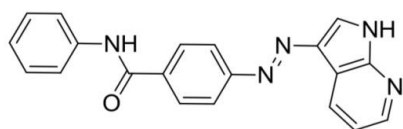
Εικόνα 1.10: Χημική δομή βενζοαμιδίων που περιέχουν δικετοοξέα (αριστερά), του N-(υποκατεστημένου φαινυλ-5-μεθυλ-4-οξο-1,3-θειαζολιδιν-3-υλ)βενζοαμιδίου (κέντρο) και ενός N-φαινυλβενζοαμιδικού παραγώγου (δεξιά).

Το 3,5-διυδροξυ-N-(4-υδροξυφαινυλ)βενζοαμίδιο έδειξε ικανότητα δέσμευσης ριζών παρόμοια με εκείνη της *trans*-ρεσβερατρόλης (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11: Χημική δομή του 3,5-διυδροξυ-N-(4-υδροξυφαινυλ)βενζοαμιδίου (αριστερά) και της *trans*-ρεσβερατρόλης (δεξιά).

Μία ετεροκυκλική ένωση που περιέχει αρωματικά συστήματα (Εικόνα 1.12) συντέθηκε και αξιολογήθηκε για αναλγητική δράση.



Εικόνα 1.12: Χημική δομή βενζοαμιδικού παραγώγου που περιέχει ετεροκυκλικά αρωματικά συστήματα με αναλγητική δράση.

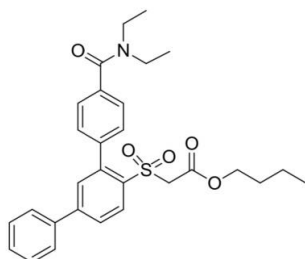
Η ινδαπαμίδα, το 3-(αμινοσουλφονυλ)-4-χλωρο-N-(2,3-διϋδρο-2-μεθυλ-1H-ινδολ-1-υλ)βενζοαμίδιο (Εικόνα 1.13), είναι ένας μη θειαζιδικός αντιυπερτασικός διουρητικός παρά-

γοντας που περιέχει ένα τμήμα σουλφαμοϋλχλωροβενζοαμιδίου και ένα μεθυλοϊνδολίνης. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ήπια και συνεχιζόμενη αντιυπερτασική του δράση όταν χορηγείται από το στόμα σε χαμηλές δόσεις.



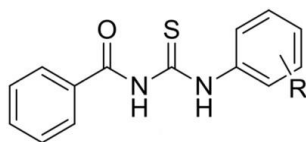
Εικόνα 1.13: Χημική δομή ινδαπαμίδης, [3-(αμινοσουλφονυλ)-4-χλωρο-N-(2,3-διϋδρο-2-μεθυλ-1H-ινδολ-1-υλ)βενζοαμίδιο].

Η αγγειοτενσίνη II (Ang II) είναι το κύριο συστατικό του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της διατήρησης της ομοιόστασης των υγρών και των ηλεκτρολυτών. Αυτό το οκταπεπτίδιο δρα μέσω διέγερσης δύο υποτύπων υποδοχέων, του AT1 και του AT2. Το υποκατεστημένο τριφαινυλοπαράγωγο του βενζοαμιδίου που φαίνεται στην Εικόνα 1.14 παρουσίασε υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα AT2.



Εικόνα 1.14: Χημική δομή υποκατεστημένου τριφαινυλοπαράγωγου του βενζοαμιδίου.

Το υποκατεστημένο N-(ανιλνοκαρβονοθειούλ)βενζοαμίδιο (Εικόνα 1.15) έδειξε σημαντική αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 1.15: Χημική δομή υποκατεστημένου N-(ανιλινοκαρβονθειούλ)βενζοαμιδίου.

1.3.3 Σουλφοναμίδική και κυκλοπρόπυλο-ομάδα

Το σουλφοναμίδιο ως φαρμακοφόρο είναι γνωστό ότι είναι βιολογικά δραστικό παρουσιάζοντας διάφορες δράσεις, όπως αντιμικροβιακή, μυκητοκτόνο, αντιιική και αντνευροεκφυλιστική δράση. Διαφορετικά μόρια που περιέχουν τμήματα σουλφοναμιδίου εμφανίζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις συμπεριλαμβανομένης της αντικαρκινικής. Επιπρόσθετα, τα σουλφοναμίδια βρέθηκε ότι έχουν ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες σε υγιή κύτταρα (Iqbal *et al.*, 2018).

Η κυκλοπρόπυλο-ομάδα προστέθηκε προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα των ενώσεων.

1.3.4 Δυνητικοί αναστολείς της κινάσης BRAF V600E

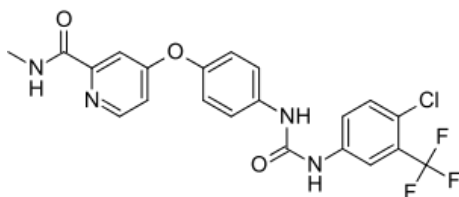
Αρχικά, σχεδιάστηκε μία σειρά ενώσεων που περιέχουν το βενζοθειαζολικό δακτύλιο, μαζί με σουλφοναμίδική ή/και κυκλοπρόπυλο-ομάδα και μία σειρά βενζοαμιδικών παραγώγων ως δυνητικών αναστολέων της κινάσης BRAF V600E. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής πρόσδεσης στις ενώσεις αυτές μέσω προγραμμάτων υπολογιστικής χημείας της εταιρείας Schrödinger. Η τελική επιλογή των δομών προς σύνθεση έγινε με κριτήρια το χαμηλό σκορ πρόσδεσης (docking score) και τον μέγιστο αριθμό κρίσιμων αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη.

1.4 Ο ρόλος της κινάσης BRAF και οι αναστολείς της

Το μονοπάτι σηματοδότησης RAS (rat sarcoma) / RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma) / MEK (mitogen-activated protein) / ERK (extracellular signal-regulated kinase) ελέγχει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Η οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών RAF (ARAF, BRAF και CRAF) επηρεάζει σημαντικά το μονοπάτι αυτό. Η πρόσληψη των RAF κινασών από την μεμβράνη που σχετίζεται με τις πρωτεΐνες RAS ενεργοποιεί το μονοπάτι που οδηγεί σε μία αλληλουχία γεγονότων, η οποία περιλαμβάνει την φωσφορλίωση των MEK1 και MEK2 κινασών από τις RAF και την επακόλουθη φωσφορλίωση και ενεργοποίηση των ERK1 και ERK2 κινασών. Το βήμα κλειδί για την ενεργοποίηση των RAF πρωτεϊνών είναι ο σχηματισμός ομοδιμερών και ετεροδιμερών, καθώς τα RAF μονομερή είναι ανενεργά εξ' αιτίας της αυτοαναστολής από την αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain-NTD).

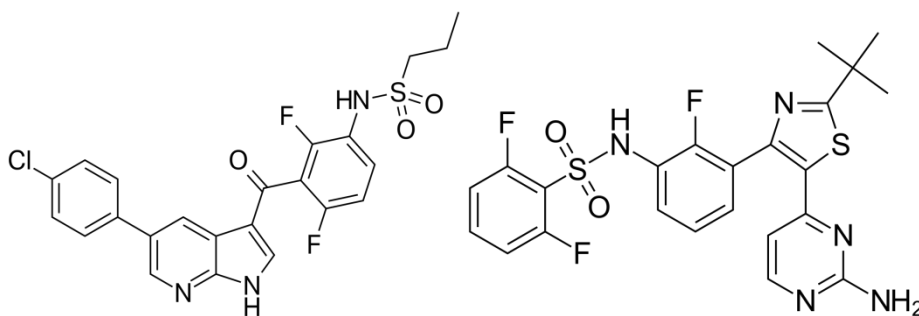
Περισσότερες από 45 ογκογονικές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί για την BRAF, με την σημειακή μετάλλαξη V600E [η βαλίνη (V) αντικαθίσταται από το γλουταμινικό οξύ (E) στο αμινοξύ 600] να αντιπροσωπεύει περίπου το 90% αυτών. Συνολικά, οι μεταλλάξεις της BRAF είναι παρούσες σε περίπου 8% των ανθρώπινων όγκων. Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται σε περισσότερους από το 50% των ασθενών με μελάνωμα, καθώς επίσης στο καρκίνωμα παχέος εντέρου (5-10%), θυρεοειδούς (25-45%), στην τριχοκυτταρική λευχαιμία (~100%) και λιγότερο συχνά στις κακοήθειες ωθηκών και πνεύμονα.

Ο μοναδικός RAF αναστολέας 1^{ης} γενιάς που εγκρίθηκε από τον FDA (Food and Drug Administration) για προχωρημένο καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων και όγκο ηπατοκυττάρων που εκφράζουν την BRAF WT (wild type) είναι το sorafenib (Εικόνα 1.16), ένα βενζοαμιδικό ανάλογο. Προκλινικές μελέτες κατέδειξαν ασθενή συγγένεια για τη μεταλλαγμένη BRAF V600 και ευρεία εξειδίκευση. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι τα κλινικά αποτελέσματα αυτού του αναστολέα προκύπτουν από τη στόχευση πολλαπλών κινασών.



Εικόνα 1.16: Η χημική δομή του RAF αναστολέα 1^{ης} γενιάς, sorafenib.

Η ανάπτυξη εκλεκτικών και ισχυρών αναστολέων 2^{ης} γενιάς με στόχο την BRAF V600E απέδωσε δύο εγκεκριμένα από τον FDA φάρμακα για το μελάνωμα προχωρημένου σταδίου, το vemurafenib (Zelboraf) και το dabrafenib (Tafinlar) (Εικόνα 1.17). Αυτά τα φάρμακα έχουν προκαλέσει αξιόλογες αποκρίσεις και βελτιωμένη επιβίωση ασθενών με μελάνωμα με όγκους με τη μετάλλαξη BRAF V600, αλλά η επίκτητη ανθεκτικότητά τους περιορίζει την αποτελεσματικότητά τους και οι περισσότεροι ασθενείς υποτροπιάζουν μέσα σε ένα χρόνο. Επιπρόσθετα, οι όγκοι παχέος εντέρου και θυρεοειδούς με τη μεταλλαγμένη BRAF V600E είναι ανθεκτικοί σε αυτούς τους αναστολείς, όπως επίσης το 15-30% των καρκινωμάτων μη μικροκυτταρικού πνεύμονα (NSCLC) και περίπου το 85% των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 1.17: Οι χημικές δομές των RAF αναστολέων 2^{ης} γενιάς, vemurafenib (αριστερά) και dabrafenib (δεξιά).

Η θεωρία πως ο διμερισμός RAF παρέχει αντίσταση σε RAF αναστολείς 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς έχει μετατοπίσει πρόσφατα την εστίαση του σχεδιασμού RAF αναστολέα στην ανάπτυξη μικρών μορίων που αναστέλλουν ισοδύναμα τις μονομερείς και διμερείς μορφές των RAF ή δεν επιτρέπουν το διμερισμό. Τέτοια μόρια, οι RAF αναστολείς 3^{ης} γενιάς, θα μπορούσαν να στοχεύσουν όγκους ανθεκτικούς στους αναστολείς 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς (Bogos *et al.*, 2018).

1.5 Επιλογή κυτταρικών σειρών

Αρχικά, εξετάστηκε το σύνολο των ενώσεων στο μελάνωμα, καθώς ο καρκίνος αυτός φέρει τη μετάλλαξη BRAF V600E και οι εξεταζόμενες ενώσεις σχεδιάστηκαν ως δυνητικοί αναστολείς της μεταλλαγμένης αυτής κινάσης. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε ένα ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών προερχόμενων από συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των πιο κοινών αιτιών θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (πνεύμονα, ήπατος, παχέος εντέρου, προστάτη, μαστού). Επίσης, οι ενώσεις δοκιμάστηκαν στο οστεοσάρκωμα. Τέλος, για συγκριτικούς σκοπούς επιλέχθηκε και μία φυσιολογική σειρά από ινοβλάστες πνεύμονα.

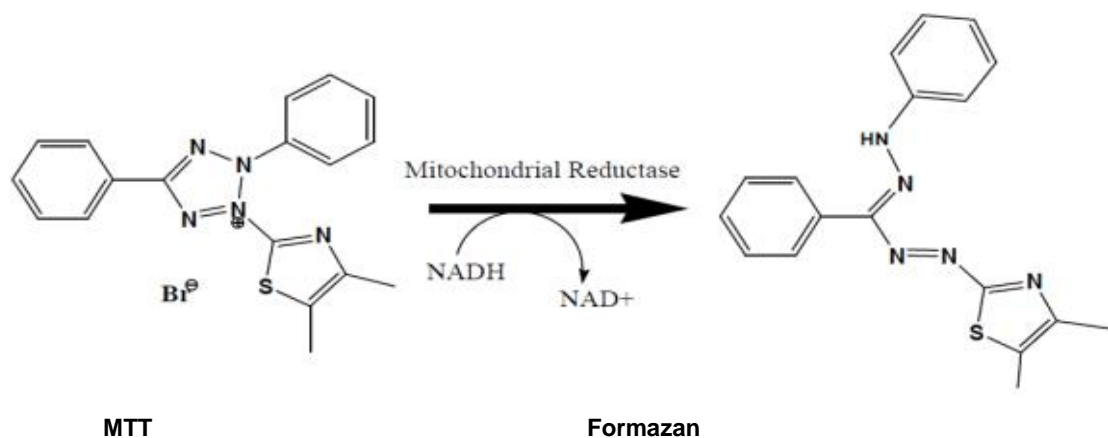
1.6 Μελέτες βιωσιμότητας σε κύτταρα

Οι *in vitro* δοκιμές κυτταροτοξικότητας παρέχουν ένα κρίσιμο μέσο κατάταξης ενώσεων προς εξέταση στην ανακάλυψη φαρμάκων. Για *in vitro* συστήματα κυτταροκαλλιέργειας, μία ένωση ή θεραπεία θεωρείται κυτταροτοξική εάν παρεμποδίζει την κυτταρική προσκόλληση, αλλάζει σημαντικά τη μορφολογία, επηρεάζει δυσμενώς τον ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης ή προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Μία ποικιλία δοκιμών έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της βιωσιμότητας ή κυτταροτοξικότητας *in vitro*. Δυστυχώς, πολλές από αυτές τις μεθόδους είναι επίπονες, χρονοβόρες, μη ευαίσθητες και επομένως ακατάλληλες για σάρωση υψηλής απόδοσης (High-Throughput Screening). Για το σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί πιο αποδοτικές σύγχρονες μέθοδοι διαλογής που εξετάζουν και μετρούν ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων που σχετίζονται με βιοχημικές διεργασίες, απαραίτητες για τη διατήρηση της βιωσιμότητας, ή με αλλαγές στην ακεραιότητα της μεμβράνης, που οδηγούν σε κυτταρική αποσύνθεση (Niles *et al.*, 2008).

Κάποιες από τις πιο κοινές σύγχρονες μεθόδους αποτίμησης της κυτταροτοξικότητας, άμεσης ή έμμεσης, αποτελούν οι MTT, ΧΤΤ και LDH. Οι αρχές των μεθόδων αυτών παρουσιάζονται παρακάτω.

1.6.1 Μέθοδος MTT

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην διάσπαση του κιτρινόχρουν διαλύματος MTT [διάλυμα βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου] προς σχηματισμό μίας αδιάλυτης ιώδους φορμαζάνης σε μεταβολικά ενεργά ζωντανά κύτταρα από μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσες, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.18. Αυτή η αδιάλυτη στο νερό φορμαζάνη, μπορεί να διαλυτοποιηθεί χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ή άλλους οργανικούς διαλύτες και το προϊόν που παράγεται μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη οπτική απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής. Η διάσπαση και μετατροπή του κιτρινωπού MTT σε ιώδες σύμπλοκο φορμαζάνης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μίας μεθόδου προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability). Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι μόνο τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες που μπορούν να κάνουν αυτήν τη μετατροπή, ενώ τα νεκρά κύτταρα όχι. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση κάποιου παράγοντα στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού (growth rate) των κυττάρων και άρα, να αποτιμηθεί η κυτταροτοξικότητά του (cytotoxicity).

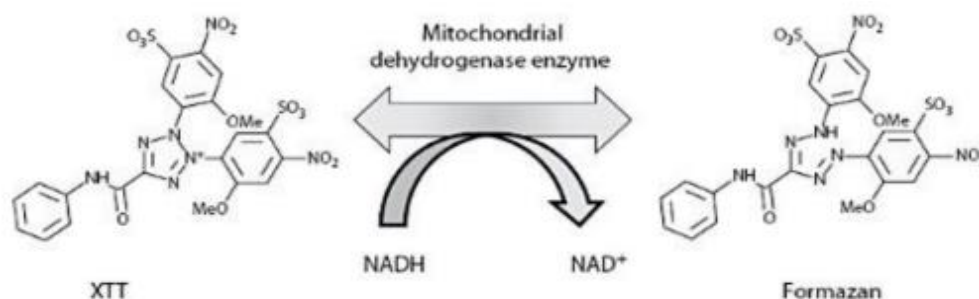


Εικόνα 1.18: Η αντίδραση αναγωγής του υδατοδιαλυτού κιτρινόχρουν άλατος MTT σε αδιάλυτη ιώδη φορμαζάνη με τη βοήθεια μιτοχονδριακών αφυδρογονασών ζωντανού κυττάρου.

1.6.2 Μέθοδος XTT

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην διάσπαση του κίτρινου XTT [άλας της 2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλο)-2H-τετραζολο-5-καρβοξυανιλίνης] προς σχηματισμό μίας πορτοκαλί υδατοδιαλυτής χρωστικής ουσίας φορμαζάνης σε μεταβολικά ενεργά ζωντανά κύτταρα από

μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσες, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.19. Το προϊόν που παράγεται μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η μετρούμενη οπτική απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής. Η διάσπαση και μετατροπή του κίτρινου ΧΤΤ σε πορτοκαλί υδατοδιαλυτή φορμαζάνη έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μίας μεθόδου προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας (cell viability). Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι μόνο τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες που μπορούν να κάνουν αυτήν τη μετατροπή, ενώ τα νεκρά κύτταρα όχι. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση κάποιου παράγοντα στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού (growth rate) των κυττάρων και άρα, να αποτιμηθεί η κυτταροτοξικότητά του (cytotoxicity).



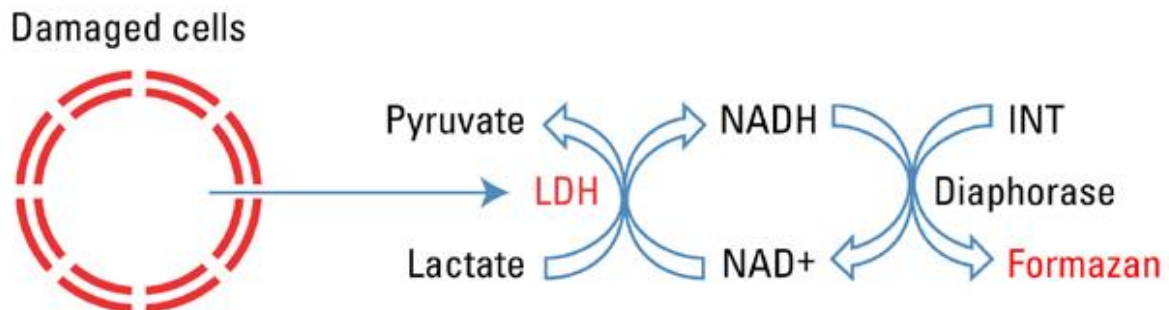
Εικόνα 1.19: Η αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος ΧΤΤ σε πορτοκαλί υδατοδιαλυτή φορμαζάνη με τη βοήθεια μιτοχονδριακών αφυδρογονασών ζωντανού κυττάρου.

1.6.3 Μέθοδος LDH

Για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH χρησιμοποιήθηκε το Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit της Thermo Scientific. Αποτελεί μία χρωματομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από χημικές ενώσεις.

Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) είναι ένα ένζυμο του κυτταροπλάσματος που υπάρχει σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Η καταστροφή της πλασματικής μεμβράνης (λύση) απελευθερώνει LDH στο μέσο της κυτταροκαλλιέργειας (θρεπτικό υλικό). Η εξωκυτταρική LDH στο μέσο ποσοτικοποιείται με την συζευγμένη ενζυματική αντίδραση στην οποία η LDH καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό μέσω της αναγωγής του NAD⁺ σε NADH. Στη συνέχεια, η διαφοράση χρησιμοποιεί το NADH για την αναγωγή ενός άλατος του τετραζολίου (INT) σε κόκκινο προϊόν φορμαζάνης, η οποία μετρείται στα

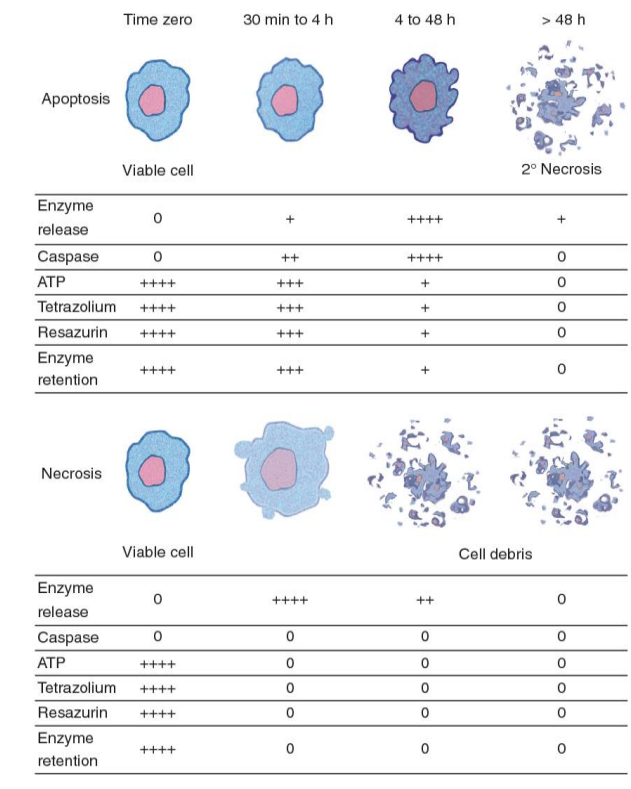
490nm. Το επίπεδο σχηματισμού φορμαζάνης είναι ευθέως ανάλογο με την ποσότητα LDH που απελευθερώνεται στο μέσο, το οποίο είναι ενδεικτικό της κυτταροτοξικότητας.



Εικόνα 1.20: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας LDH.

1.7 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Η διευκρίνηση του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου είναι αρκετά σημαντική για τις νέες χημικές ενώσεις που προορίζονται για θεραπεία του καρκίνου. Οι ενώσεις που προκαλούν πρωτογενή νέκρωση σε κυτταροκαλλιέργεια μπορεί να φέρουν μη αποδεκτές κυτταροτοξικές συνέπειες, ενώ οι ενώσεις που προκαλούν απόπτωση συνήθως είναι προτιμότερες. Η συγκέντρωση της ουσίας και η κινητική του κυτταρικού θανάτου ποικίλουν, αλλά γενικά η πρωτογενής νέκρωση ή η καταστροφική κυτταρική λύση συμβαίνει πολύ γρήγορα μετά την προσθήκη της ένωσης (2 ώρες ή λιγότερο), ενώ η απόπτωση προχωρά με πιο ομαλό τρόπο (4-48 ώρες) (Εικόνα 1.21) (Niles *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.21: Χρονολογική σύγκριση των μετρήσιμων βιοδεικτών βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας κατά τη διάρκεια τυπικών αποπτωτικών ή πρωτογενών νεκρωτικών συμβάντων. Η απόπτωση προκαλεί μία χρονοεξαρτώμενη (τυπικά 4-48 ώρες) μείωση της δραστηριότητας του δείκτη βιωσιμότητας με αντίστοιχη αύξηση της δραστηριότητας του δείκτη κυτταροτοξικότητας. Η πρωτογενής νέκρωση παρουσιάζει παρόμοιο προφίλ, αν και σε πολύ μικρότερο χρονικό πλαίσιο (τυπικά 30 λεπτά έως 4 ώρες). Επομένως, η κινητική της κυτταροτοξικής απόκρισης μπορεί να επηρεάσει ποια χημική δοκιμή είναι πιο κατάλληλη για μία μελέτη.

1.7.1 Απόπτωση

Η απόπτωση ορίζεται ως μία διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που μπορεί να προκληθεί από ποικίλους φυσιολογικούς και φαρμακολογικούς παράγοντες. Χαρακτηρίζεται από ειδικές μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές των κυττάρων που πεθαίνουν. Οι μορφολογικές αλλαγές περιλαμβάνουν διόγκωση της μεμβράνης, συρρίκνωση του κυττάρου, πυρηνική κατάρρευση (πυρηνικός κατακερματισμός, συμπύκνωση της χρωματίνης), το σχηματισμό αποπτωτικού σώματος και τέλος τη λύση του κυττάρου (Kanduc *et al.*, 2002). Οι βιοχημικές αλλαγές περιλαμβάνουν τη διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA σε ενδονουκλεοσωμικά θραύσματα, τη μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια και μία σειρά από διασπάσεις ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων μέσω ειδικής πρωτεόλυσης, χαρακτηριστικότερα των οποίων είναι η πρωτεΐνη PARP-1, ο αναστολέας ICAD, οι πυρηνικές λαμίνες και η πηκτωλυματίνη.

Η απόπτωση είναι ο κύριος τύπος κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει όταν η βλάβη του DNA είναι ανεπανόρθωτη. Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια για την επαγωγή της απόπτωσης: το εξωγενές ή μονοπάτι υποδοχέα θανάτου και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται με δέσμευση του υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης Fas (και άλλων παρόμοιων υποδοχέων όπως του TNFR1 και TRAIL) από τον εξωκυττάριο προσδέτη του, Fas-L. Το σύμπλοκο Fas/Fas-L συνδέεται διαδοχικά με την πρωτεΐνη FADD και την προ-κασπάση-8, έτσι ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο σηματοδότησης DISC. Έπειτα, το σύμπλοκο DISC ενεργοποιεί την προ-κασπάση-8, η οποία με τη σειρά της πρωτεολύει εκλεκτικά την προ-κασπάση-3, το προτελευταίο ένζυμο για την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Το ενδογενές μονοπάτι οδηγεί επίσης σε απόπτωση αλλά υπό τον έλεγχο των μιτοχονδριακών προ-ενζύμων. Και στις δύο περιπτώσεις, οι εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες καθίστανται διαπερατές στο κυτόχρωμα c, το οποίο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και στρατολογεί τις πρωτεΐνες Araf-1 και προ-κασπάση-9 για να συγκροτήσει το αποπτώσωμα. Αυτό ενεργοποιεί τον καταρράκτη σηματοδότησης των κασπασών 9 και 3, καταλήγοντας σε απόπτωση. Η μη φυσιολογική έκφραση βασικών ρυθμιστικών παραγόντων της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο.

1.7.2 Κασπάσες

Στα αποπτωτικά μονοπάτια που προκαλούν “κυτταρική αυτοκτονία”, τα πρώτα μοριακά σήματα είναι ανενεργά προένζυμα που ονομάζονται κασπάσες. Η νέκρωση μερικές φορές χρησιμοποιεί κασπάσες, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό ή καθόλου, καθώς το ίδιο το κύτταρο καταστρέφεται με ανεξέλεγκτο τρόπο κατά τη διάρκεια νεκρωτικών συμβάντων. Έχουν ταυτοποιηθεί έως και 13 κασπάσες, που κατηγοριοποιούνται σε εκκινήτες, τελεστές ή εκτελεστές (αυτοί που προκαλούν άμεσα κυτταρικό θάνατο) και φλεγμονώδεις, οι οποίες αναστέλλουν τη φλεγμονή. Καθώς κατά τη νέκρωση δεν εμπλέκονται φλεγμονώδεις κασπάσες, η φλεγμονή εμφανίζεται πάντα στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

1.7.3 Νέκρωση

Η νέκρωση περιλαμβάνει διάσπαση της μεμβράνης, αναπνευστικά δηλητήρια και υποξία, που προκαλούν εξάντληση του ATP, μεταβολική κατάρρευση, διόγκωση των κυττάρων και ρήξη που οδηγεί σε φλεγμονή. Έτσι, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο κατά τη δια-

τήρηση της ομοιόστασης των ιστών και την απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη, πράγμα που έχει σημαντικές επιπτώσεις στους κακοήθεις ιστούς.

Κατά το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης διαταράσσεται σε τέτοιο βαθμό, ώστε τελικά τα ενδοκυτταρικά υλικά απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, οδηγώντας σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η επακόλουθη τοπική φλεγμονή μπορεί να προάγει την ανάπτυξη όγκου. Ωστόσο, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να αξιοποιηθεί για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων.

1.7.4 Προγραμματισμένη νέκρωση-Νεκρόπτωση

Πριν από δεκαετίες, αναφέρθηκε ένας νέος τύπος κυτταρικού θανάτου, στις περιπτώσεις που αναστελλόταν το αποπτωτικό μονοπάτι, ο οποίος εμφάνισε μορφολογικά χαρακτηριστικά τόσο της απόπτωσης όσο και της νέκρωσης και γι' αυτό ονομάστηκε νεκρόπτωση. Η νεκρόπτωση είναι μία προγραμματισμένη μορφή νέκρωσης, η οποία μεσολαβείται από υποδοχείς θανάτου. Χαρακτηρίζεται μορφολογικά από διόγκωση των κυττάρων ακολουθούμενη από ρήξη της πλασματικής μεμβράνης.

Έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή του μορίου της κασπάσης-8 αλλάζει την εξωγενή απόπτωση σε νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο λόγω της ενεργοποίησης των RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3) και MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase). Συνεπώς, η νεκρόπτωση αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο κυτταρικού θανάτου όταν το αποπτωτικό μονοπάτι, που εξαρτάται από την κασπάση-8, παρεμποδίζεται. Η έναρξη της νεκρόπτωσης μεσολαβείται από προσδέτες του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων των Fas, TNF και LPS (λιποπολυσακχαρίτη), οι οποίοι οδηγούν σε ενεργοποίηση της RIPK3, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την MLKL με φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλιωμένη MLKL μεταφέρεται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και διαταράσσει την ακεραιότητα του κυττάρου (Dhuriya *et al.*, 2018).

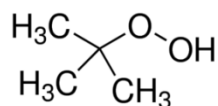
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χημικά αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων/PBS 10X (σε pH 7,2) (GIBCO, 70013-016), θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium/DMEM (GIBCO, 41966), RPMI 1640 (GIBCO, 21875), ορός εμβρύου βοός/FBS (GIBCO, 10270), L-γλουταμίνη 200mM (GIBCO, 25030081), μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (GIBCO, 15140-122), διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων 100X (GIBCO, 11140050), θρυψίνη 2,5%-10X (GIBCO, 15090-046), διάλυμα βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου/MTT (Sigma-Aldrich, M5655), sodium dodecyl sulphate/SDS (Biochemical, 44244), άλας της 2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλο)-2H-τετραζολο-5-καρβοξυανιλίνης/XTT (BIOTIUM, 10060 και PanReac AppliChem, A2240), phenazine methosulfate/PMS (Sigma-Aldrich, P9625), Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific, 88953), tert-Butyl hydroperoxide solution 5-6M in decane/TBHP (Sigma-Aldrich, 416665), διμεθυλοσουλφοξείδιο/DMSO (PanReac AppliChem, A3672), Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD, 161-0406), αλβουμίνη ορού βοός/BSA (Sigma-Aldrich, 1076192), διάλυμα λύσης RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay buffer) (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), φαινυλο-μεθανοσουλφονυλοφθοριδίο/PMSF (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), ορθοβαναδικό νάτριο (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Santa Cruz Biotechnology, sc24948), ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο 30% (Sigma-Aldrich, A3699), υπερθειικό αμμώνιο/APS 10% (SIGMA, A9164-100G), τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη/TEMED (MP Bio-medicals, LLC, 805615), Prestained Protein Marker (New England BioLabs, P7708S), χρωστική Ponceau (Sigma-Aldrich, P7170), σκόνη γάλακτος (Regilait, CS 2030971009), Tween 20 (AppliChem, A1389), διαλύματα εμφάνισης ECL (enhanced luminol reagent, oxidizing reagent) (PerkinElmer, NEL120001EA), Apoptosis/Necroptosis Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology, 92570), Human/Mouse/Rat beta-Actin Antibody (R&D Systems, MAB8929), PARP-1 mouse IgG (BD Pharmingen™, 552933), Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako, PO260), Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (R&D Systems, HAF008).

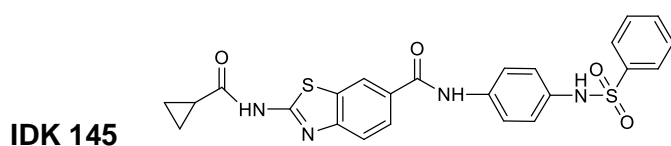
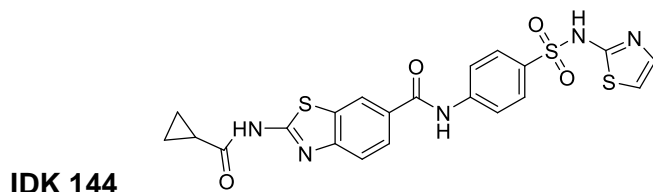
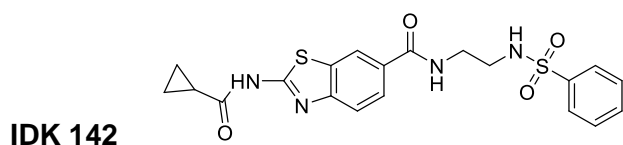
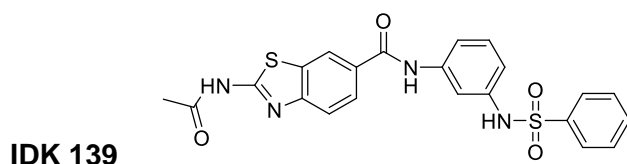
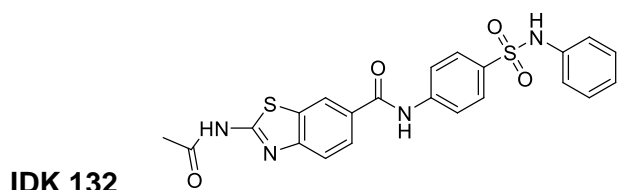
Όλα τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια γενικής και καθημερινής χρήσης προέρχονταν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Το διπλά απεσταγμένο νερό υψηλής καθαρότητας ελήφθη από το σύστημα καθαρισμού ύδατος Millipore Milli Q Plus.

2.2 Χημικές ενώσεις

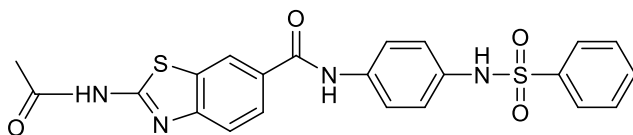


Εικόνα 2.1: Η χημική δομή του βουτυλοξειδίου.

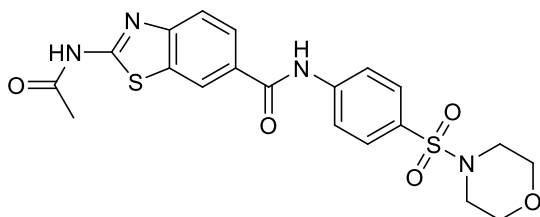
Οι χημικές ενώσεις που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Ι. Δ. Κώστα στο Εργαστήριο Οργανικής/Οργανομεταλλικής Χημείας και Κατάλυσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Εικόνα 2.2).



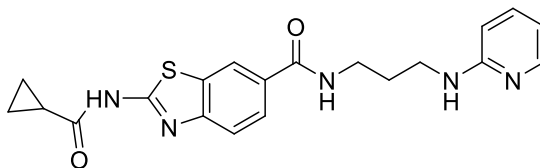
YYM 212



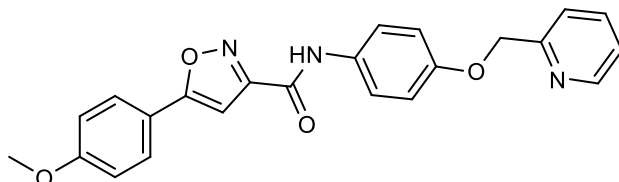
YYM 257



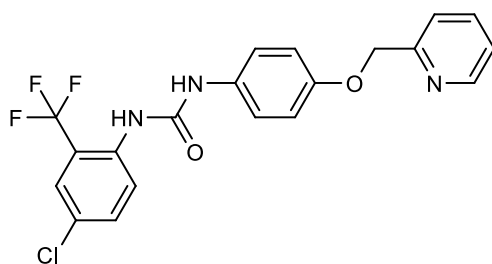
YYM 303



IDK 104



IDK 117



Εικόνα 2.2: Οι χημικές δομές των εξεταζόμενων βενζοθειαζολικών και αμιδικών παραγώγων.

2.3 Μοριακή πρόσδεση (*In silico* docking)

Για το σχεδιασμό των βενζοθειαζολικών και αμιδικών παραγώγων σε δισδιάστατη (2D) μορφή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **ChemDraw** και οι ενώσεις αποθηκεύτηκαν με τη μορφή αρχείου κειμένου smiles (.smi).

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης είναι το **MAESTRO** της εταιρείας *Schrödinger*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του αρχείου με τις δομές που σχεδιάστηκαν και στη συνέχεια, οι εξεταζόμενες ενώσεις ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά (*Energy Minimization*) και μετατράπηκαν στην τρισδιάστατη (3D)

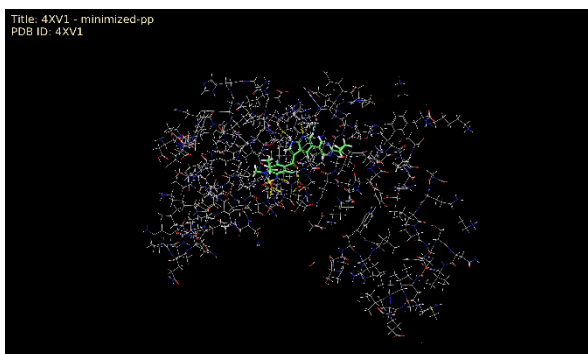
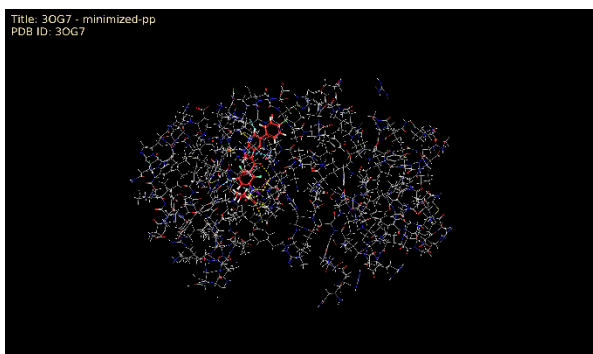
μορφή τους, δηλαδή έλαβαν μία διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας. Ως μέθοδος χρησιμοποιήθηκε η PRCG (Polak-Ribier Conjugate Gradient), ο μέγιστος αριθμός επαναλήψεων ορίστηκε ίσος με 10.000 και το κατώφλι σύγκλισης ίσο με 0.001. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των εξεταζόμενων προσδετών (*Ligand Preparation-LigPrep*) στο βέλτιστο pH της εξεταζόμενης πρωτεΐνης (pH: $7,0 \pm 0,5$), προκειμένου να παραχθούν όλες οι καταστάσεις ιονισμού τους, χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS3. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υπό εξέταση ενώσεων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *QikProp*.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση συμπλόκου της πρωτεΐνης-στόχου κρυσταλλωμένης με έναν προσδέτη-αναστολέα μέσω της βάσης κρυσταλλικών συμπλόκων **PDB** (Protein Data Bank). Στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε το κρυσταλλικό σύμπλοκο της BRAF V600E πρωτεΐνης με τον γνωστό αναστολέα PLX4032/Vemurafenib (Κωδικός PDB: **3OG7**, Ανάλυση: 2.45 Å) και το σύμπλοκο της εξεταζόμενης πρωτεΐνης με το PLX7904 (Κωδικός PDB: **4XV1**, Ανάλυση: 2.47 Å).

Ακολούθησε η εισαγωγή των αρχείων PDB στην πλατφόρμα MAESTRO, τα οποία προετοιμάστηκαν μέσω του προγράμματος Protein Preparation Wizard (Εικόνα 2.3), ώστε να διορθωθούν τυχόν λάθη κατά την αποθήκευση των αρχείων. Συγκεκριμένα, στα αρχεία PDB οι χημικοί δεσμοί είναι συχνά σε λάθος σειρά και παρουσιάζονται πάντα ως μονοί δεσμοί. Επίσης, στα αρχεία PDB απουσιάζουν τα υδρογόνα.

Η προετοιμασία της πρωτεΐνης (*Protein Preparation*) ακολουθεί τρία στάδια:

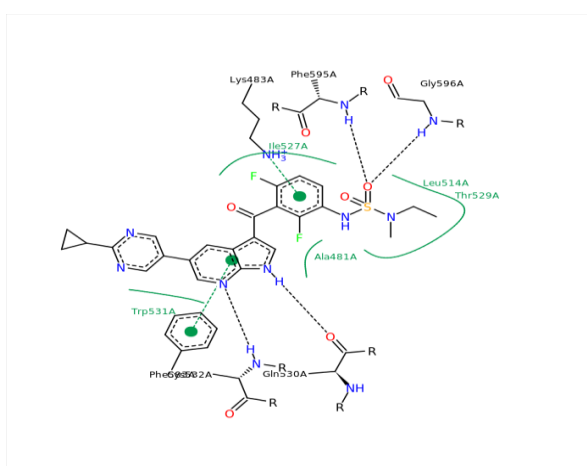
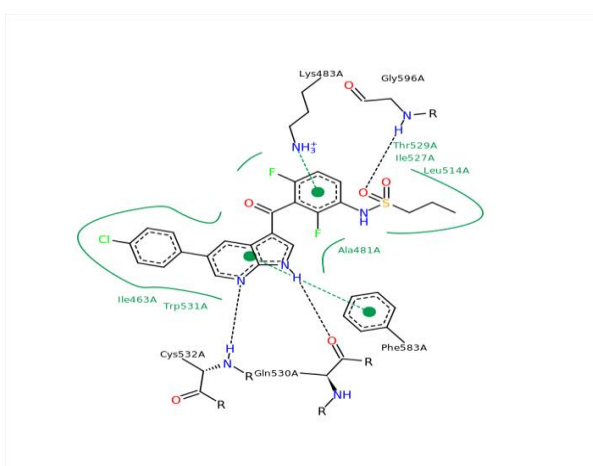
1. Προεπεξεργασία (*Preprocess*): προσθήκη υδρογόνων, διόρθωση σειράς δεσμών, δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών και δεσμών με μέταλλα.
2. Βελτιστοποίηση (*Optimization*): διόρθωση δεσμών υδρογόνου.
3. Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (*Minimization*).



Εικόνα 2.3: Συμπλοκοποιημένες πρωτεΐνες, οι οποίες προετοιμάστηκαν μέσω του προγράμματος Protein Preparation Wizard και προέρχονται από αρχεία με κωδικό PDB: 3OG7 (αριστερά) και με κωδικό PDB: 4XV1 (δεξιά).

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, καθώς και από τη μελέτη των κρυσταλλικών συμπλόκων της ογκοπρωτεΐνης BRAF V600E, συμπεραίνεται ότι κρίσιμες για την πρόσδεση αλληλεπιδράσεις αναπτύσσονται με τα παρακάτω αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη (Εικόνα 2.4):

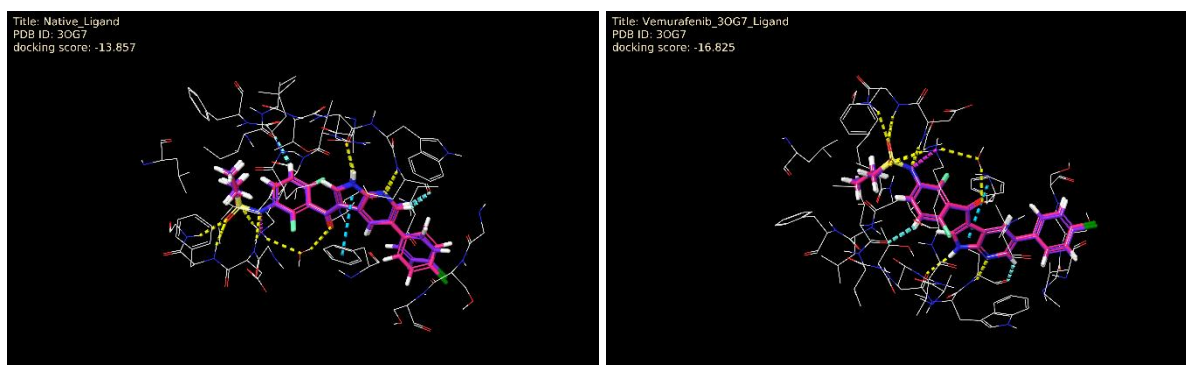
- Lys 483
- Gln 530
- Cys 532
- Asp 594
- Phe 595
- Gly 596



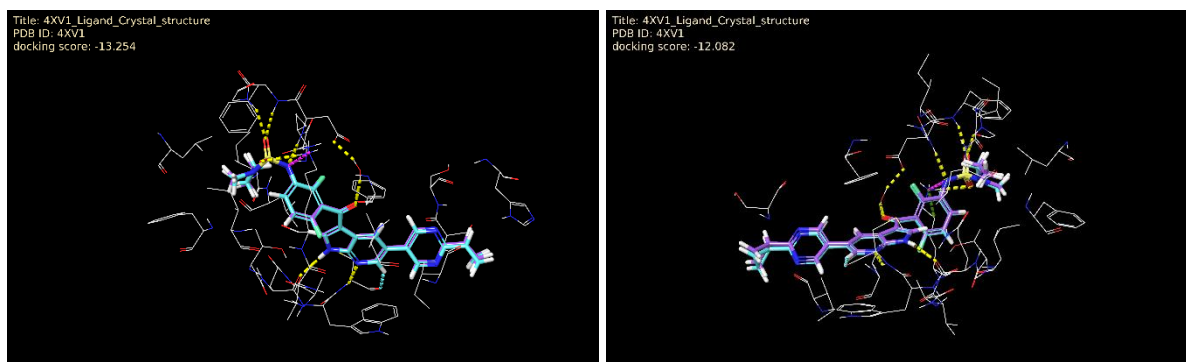
Εικόνα 2.4: Οι κρίσιμες για την πρόσδεση αλληλεπιδράσεις των κρυσταλλικών συμπλόκων της ογκοπρωτεΐνης BRAF V600E που προέρχονται από αρχεία με κωδικό PDB: 3OG7 (αριστερά) και με κωδικό PDB: 4XV1 (δεξιά) σε 2D διαμόρφωση.

2.3.1 Επικύρωση μεθόδου μοριακής πρόσδεσης

Επόμενο στάδιο της μελέτης ήταν η επικύρωση της μεθόδου Μοριακής Πρόσδεσης που θα χρησιμοποιηθεί, δηλαδή η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών και παραμέτρων, ώστε να αναπαραχθεί η κρυσταλλική διαμόρφωση. Η πορεία που χρησιμοποιείται για την επικύρωση αναλύεται παρακάτω (βλ. Ligand docking). Όπως παρουσιάζεται στις Εικόνες 2.5 και 2.6, οι διαμορφώσεις των προσδετών και οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη συμπίπτουν και στα δύο σύμπλοκα με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP (standard precision) και XP (extra precision). Επομένως, η μέθοδος είναι επικυρωμένη.



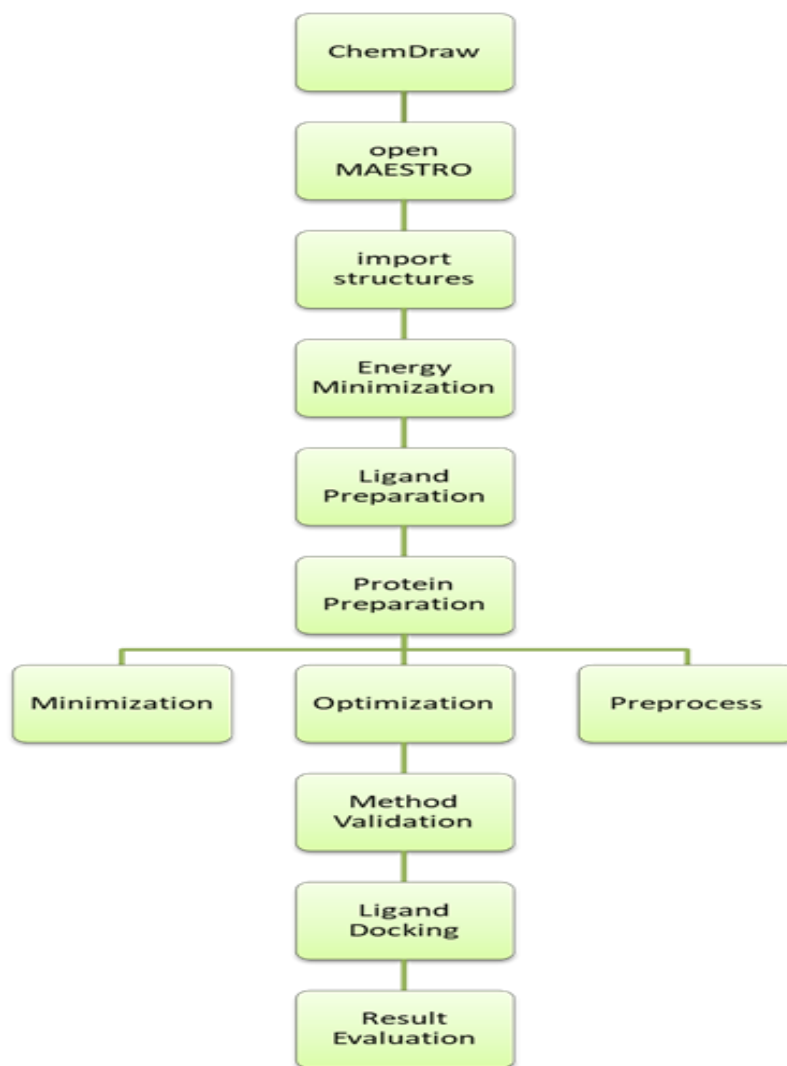
Εικόνα 2.5: Οι διαμορφώσεις των προσδετών και οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη συμπίπτουν στο κρυσταλλικό σύμπλοκο που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP (αριστερά) και XP (δεξιά).



Εικόνα 2.6: Οι διαμορφώσεις των προσδετών και οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη συμπίπτουν στο κρυσταλλικό σύμπλοκο που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP (αριστερά) και XP (δεξιά).

Μοριακή πρόσδεση είναι η πρόβλεψη της θέσης πρόσδεσης ενός προσδέτη σε μία πρωτεΐνη. Προβλέπει τη 3D διαμόρφωση του προσδέτη και όλες τις δυνατές αλληλεπιδράσεις του με την πρωτεΐνη. Συνήθως, δημιουργούνται αρκετές διαφορετικές “πόζες” (διαμορφώσεις), οι οποίες αξιολογούνται από διαφορετικά αποτελέσματα (*docking scores*), τα οποία δείχνουν πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση προσδέτη-πρωτεΐνης σε κάθε πόζα κι εάν υιοθετούν ευνοϊκές διαμορφώσεις.

Στην παρούσα μελέτη, το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης είναι το **Glide**. Αρχικά, δημιουργείται ένα πλέγμα-κουτί (*grid box*), το οποίο υποδεικνύει το μέρος της πρωτεΐνης όπου θα προσδεθεί ο *ligand*. Το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία του πλέγματος (*Receptor Grid Generation*) επιλέγοντας σαν μόριο το *ligand*, οπότε αυτόματα αποθηκεύεται σαν αρχείο *zip*, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης (*Ligand Docking*) με τις εξεταζόμενες ενώσεις, αφού αυτές έχουν προετοιμαστεί (*ligprep*). Ως μέθοδος επιλέγεται η SP (*standard precision*), η XP (*extra precision*) ή η IFD (*induced fit docking*) και τίθεται ως περιορισμός το μέγιστο των 10 διαμορφώσεων για τον κάθε προσδέτη. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, εμφανίζονται οι προτεινόμενες πόζες συνοδευόμενες από το *docking score* τους, όπου μπορούν να προσδιοριστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης σε κάθε πόζα. Το *docking score* είναι ένας πρόχειρος υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης του προσδέτη στον υποδοχέα, όσο πιο αρνητικό είναι, τόσο πιο ισχυρή η δέσμευση της πόζας.



Εικόνα 2.7: Μεθοδολογία πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.

2.4 Κυτταρικές σειρές

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν εννέα καρκινικές κυτταρικές σειρές, η HCT 116 για καρκίνωμα παχέος εντέρου, η Hep G2 για καρκίνωμα ηπατοκυττάρων, η WM 164 για δερματικό μελάνωμα, η PC-3 για αδενοκαρκίνωμα προστάτη, η MDA-MB 231 για αδενοκαρκίνωμα μαστού, η U2-OS για οστεοσάρκωμα, η A 549 για καρκίνωμα πνεύμονα, η Caco-2 για επιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και η U-937 για ενήλικη οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία, ενώ επίσης χρησιμοποιήθηκε μία φυσιολογική κυτταρική σειρά, η HLF-1 (Human Lung Fibroblasts) για ινοβλάστες πνεύμονα εμβρύου, οι οποίες είναι όλες ανθρώπινης προέλευσης. Η κυτταρική σειρά HCT 116 φέρει μεταλλάξεις στα γονίδια CDKN2A, CTNNB1, PIC3CA, KRAS, ACVR2A, BRCA2, EP300 και TGFBR2, η

Hep G2 στο NRAS, η WM 164 στο BRAF, η PC-3 στο TP53, η MDA-MB 231 στα BRAF, CDKN2A, KRAS και TP53, η A 549 στα KRAS και STK11, η Caco-2 στα TP53, APC, CTNNB1 και SMAD4 και η U-937 στο PTEN, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1.

<u>Είδος κυττάρων</u>	<u>Τύπος καρκίνου</u>	<u>Γονίδια με μεταλλάξεις</u>
HCT 116	colorectal carcinoma	CDKN2A, CTNNB1, PIC3CA, KRAS, ACVR2A, BRCA2, EP300 TGFBR2
Hep G2	hepatocyte carcinoma	NRAS
WM 164	cutaneous melanoma	BRAF V600E
PC-3	prostate adenocarcinoma	TP53
MDA MB-231	breast adenocarcinoma	BRAF G464V, CDKN2A, KRAS, TP53
U2-OS	osteosarcoma	
A 549	lung carcinoma	KRAS, STK11
Caco-2	epithelial colorectal adenocarcinoma	TP53, APC, CTNNB1, SMAD4
U-937	adult acute monocytic leukemia	PTEN
HLF-1	fetal normal lung	

Πίνακας 2.1: Ταξινόμηση των κυτταρικών σειρών ανά τύπο καρκίνου και αναφορά στα γονίδια των κυττάρων αυτών, όπου εμφανίζονται οι πιο συχνές μεταλλάξεις (Cellosaurus-ExPASy).

2.4.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα των σειρών HCT 116, Hep G2, WM 164, U2-OS, A 549, Caco-2 και HLF-1 αναπτύσσονται σε καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό DMEM 1X, το οποίο περιείχε 4,5g/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη και πυροσταφυλικό, συμπληρωμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 1% από το μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Για τα κύτταρα WM 164 και Caco-2 προστέθηκε επίσης 1% μη-απαραίτητων αμινοξέων. Τα κύτταρα των σειρών PC-3, MDA-MB 231 και U-937 αναπτύσσονται σε καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό RPMI 1X, το οποίο περιείχε L-γλουταμίνη, συμπληρωμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 1% από το μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όλες οι κυτταρικές σειρές εκτός από τα U-937 προσκολλώνται στην επιφάνεια καλλιέργειας, ενώ τα U-937 αιωρούνται στο θρεπτικό υλικό. Η επώαση των κυττάρων γινόταν σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH.

2.5 Μεθοδολογία MTT

2.5.1 Δοκιμασία MTT για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας πραγματοποιείται με την προσθήκη θρυψίνης 0.25%, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται θρυψινοποίηση. Αρχικά τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με κατάλληλο όγκο διαλύματος PBS 1X για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και στη συνέχεια προστίθενται 3mL διαλύματος θρυψίνης (0.25% σε PBS 1X). Η θρυψίνη έχει την ιδιότητα να υδρολύει τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων στην εκάστοτε επιφάνεια σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης. Ο χρόνος της θρυψινοποίησης εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και διαρκεί συνήθως 5-10 λεπτά, μετά το πέρας των οποίων προστίθεται όγκος θρεπτικού υλικού διπλάσιος από τον όγκο της θρυψίνης (6mL) για να διακοπεί η δράση της.

Τα αποκολλημένα κύτταρα στο διάλυμα θρυψίνης συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αναρροφάται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1mL θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια πιπέτας και προστίθενται άλλα 9mL θρεπτικού υλικού. Από το διάλυμα των 10mL που προκύπτει λαμβάνεται μικρή ποσότητα, περίπου 10μL, η οποία μεταφέρεται σε ειδική πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο), προκειμένου να γίνει η μέτρηση των κυττάρων. Έπειτα, με αναγωγή στον αρχικό όγκο υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που υπήρχαν στην επιφάνεια καλλιέργειας. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης (96-well plate) εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προστίθενται 100μL (περίπου 100.000 κύτταρα) θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι μίας πλάκας μικροπιλοδότησης σε τετραπλές επαναλήψεις.
- 2) Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προστίθεται 1μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM.

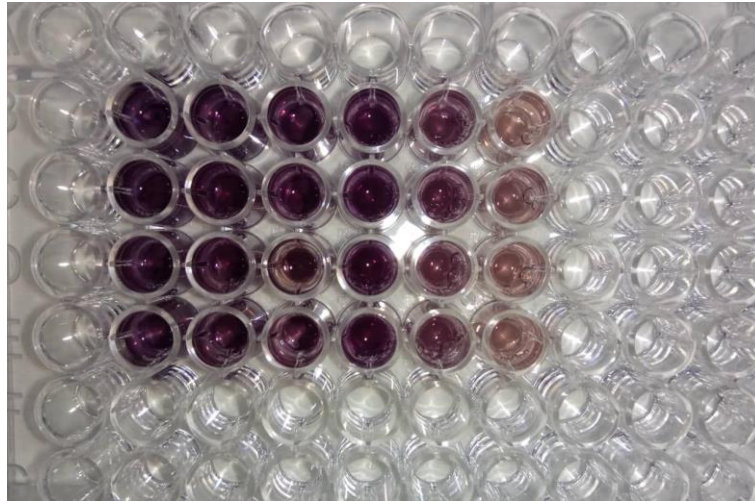
- 4) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξειδίο.
- 5) Προστίθενται 10μL πυκνού διαλύματος MTT (5mg/ml) σε κάθε πηγαδάκι με πολυπτετα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το MTT είναι φωτοευαίσθητο. Η πλάκα μικροπιτλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 6) Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 7) Προστίθενται 110μL SDS (10%) σε κάθε πηγαδάκι για να διαλυτοποιηθεί η αδιάλυτη στο νερό φορμαζάνη.
- 8) Η πλάκα μικροπιτλοδότησης αναδεύεται για 3 ώρες με ταχύτητα 100revs/min για να σπάσουν οι φυσαλίδες που έχουν δημιουργηθεί και να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.
- 9) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 550nm και στα 690nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 690nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 550nm.

Στην περίπτωση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων, η ποσότητα των κυττάρων που απαιτείται ανά πηγαδάκι είναι για τα HCT 116 5.000, για τα Hep G2 2.000, για τα WM 164 5.000, για τα PC-3 5.000, για τα MDA MB-231 10.000, για τα U2-OS 5.000, για τα A 549 2.000 και για τα HLF-1 5.000 κύτταρα. Μετά την ανάπτυξη των κυττάρων, αναρροφάται το θρεπτικό υλικό από την πλάκα μικροπιτλοδότησης και προστίθενται 100μL της ένωσης διαλυμένης σε DMSO και αραιωμένης στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 1,5625μM, 3,125μM, 6,25μM, 10μM, 12,5μM, 20μM, 25μM, 50μM, 100μM. Ο οργανικός διαλύτης DMSO αποτελεί τον πιο κοινό διαλύτη για τη χορήγηση ουσιών σε κυτταροκαλλιέργειες, η περιεκτικότητά του οποίου στο θρεπτικό μέσο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1% v/v. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες για να δράσει η χημική ένωση. Όταν το θρεπτικό υλικό είναι DMEM, στο τέλος αφαιρείται η τιμή απορρόφησης του θετικού control (θρεπτικό υλικό, MTT και SDS) στα 550nm από τη διαφορά μεταξύ της τιμής απορρόφησης στα 690nm και της τιμής απορρόφησης στα 550nm. Τα υπόλοιπα στάδια παραμένουν ίδια.

2.5.2 Δοκιμασία MTT για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα

Αρχικά πραγματοποιείται αναρρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του θρεπτικού υλικού για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά αιωρούμενα κύτταρα, που βρίσκονται στο κάτω μέρος της φλάσκας, συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προστίθενται από 500μL (περίπου 500.000 κύτταρα) θρεπτικού υλικού σε 6 erpendorfs.
- 2) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προστίθενται 5μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM.
- 4) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξειδίο.
- 5) Προστίθενται 100μL από κάθε erpendorf σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης σε τετραπλές επαναλήψεις.
- 6) Προστίθενται 10μL πυκνού διαλύματος MTT (5mg/ml) σε κάθε πηγαδάκι με πολυπιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το MTT είναι φωτοευαίσθητο. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 7) Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 8) Προστίθενται 110μL SDS (10%) σε κάθε πηγαδάκι για να διαλυτοποιηθεί η αδιάλυτη στο νερό φορμαζάνη.
- 9) Η πλάκα μικροπιλοδότησης αναδεύεται για 3 ώρες με ταχύτητα 100revs/min για να σπάσουν οι φυσαλίδες που έχουν δημιουργηθεί και να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.
- 10) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 550nm και στα 690nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 690nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 550nm.



Εικόνα 2.8: Η απεικόνιση της πλάκας μικροπιλοδότησης κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με χρήση μεθοδολογίας MTT.

2.6 Μεθοδολογία ΧΤΤ

2.6.1 Προετοιμασία του αντιδραστηρίου

Προετοιμάζεται διάλυμα 10mM PMS (Phenazine Methosulfate) σε PBS (Phosphate Buffered Saline) (3mg PMS σε 1mL PBS). Διαλύονται 4mg ΧΤΤ σε 4mL θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας. Το διάλυμα αντίδρασης ΧΤΤ φτιάχνεται αμέσως πριν τη χρήση προσθέτοντας 10μL διαλύματος PMS σε 4mL διαλύματος ΧΤΤ.

2.6.2 Δοκιμασία ΧΤΤ για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας πραγματοποιείται με την διαδικασία της θρυψινοποίησης που αναλύθηκε παραπάνω. Τα αποκολλημένα κύτταρα στο διάλυμα θρυψίνης συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

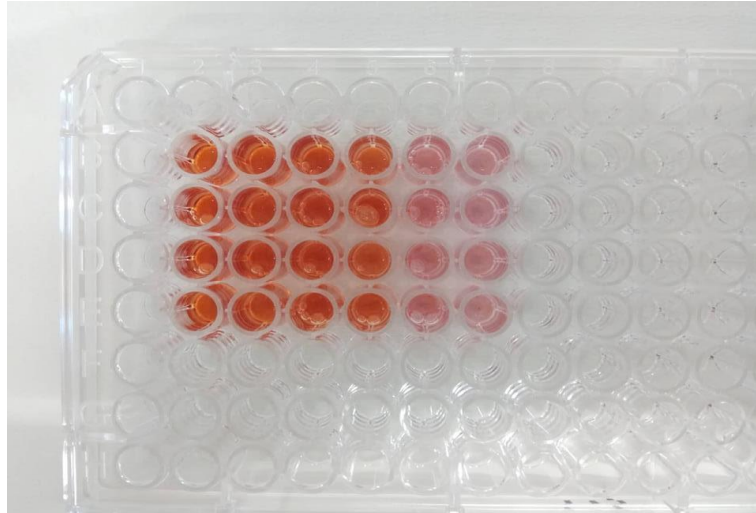
- 1) Προστίθενται 100μL (περίπου 100.000 κύτταρα) θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι μίας πλάκας μικροπιλοδότησης (96-well plate) σε τετραπλές επαναλήψεις.
- 2) Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προστίθεται 1μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM.
- 4) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξειδίο.
- 5) Προστίθενται 25μL διαλύματος ΧΤΤ/PMS σε κάθε πηγαδάκι με πολυπιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το ΧΤΤ και το PMS είναι φωτοευαίσθητα. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 6) Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 7) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 470nm και στα 650nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 650nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 470nm.

Στην περίπτωση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων, η ποσότητα των κυττάρων που απαιτείται ανά πηγαδάκι είναι για τα HCT 116 5.000, για τα Hep G2 2.000, για τα WM 164 5.000, για τα PC-3 5.000, για τα MDA MB-231 10.000, για τα U2-OS 5.000, για τα A 549 2.000 και για τα HLF-1 5.000 κύτταρα. Μετά την ανάπτυξη των κυττάρων, αναρροφάται το θρεπτικό υλικό από την πλάκα μικροπιλοδότησης και προστίθενται 100μL της ένωσης διαλυμένης σε DMSO και αραιωμένης στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 1,5625μM, 3,125μM, 6,25μM, 10μM, 12,5μM, 20μM, 25μM, 50μM, 100μM ή στην περίπτωση του τελευταίου πειράματος στις συγκεντρώσεις 0μM, 0,5μM, 1μM, 2μM, 4μM, 8μM, 12μM, 16μM, 20μM, 25μM. Ο οργανικός διαλύτης DMSO αποτελεί τον πιο κοινό διαλύτη για τη χορήγηση ουσιών σε κυτταροκαλλιέργειες, η περιεκτικότητά του οποίου στο θρεπτικό μέσο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1% v/v. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες για να δράσει η χημική ένωση. Στο τέλος αφαιρείται η τιμή απορρόφησης του θετικού control (θρεπτικό υλικό και ΧΤΤ) στα 470nm από τη διαφορά μεταξύ της τιμής απορρόφησης στα 650nm και της τιμής απορρόφησης στα 470nm. Τα υπόλοιπα στάδια παραμένουν ίδια.

2.6.3 Δοκιμασία ΧΤΤ για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα

Αρχικά πραγματοποιείται αναρρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του θρεπτικού υλικού για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και τα ζωντανά αιωρούμενα κύτταρα, που βρίσκονται στο κάτω μέρος της φλάσκας, συλλέγονται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων ανά πηγαδάκι σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων. Εν συνεχεία, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προστίθενται από 500μL (περίπου 500.000 κύτταρα) θρεπτικού υλικού σε 6 erpendorfs.
- 2) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προστίθενται 5μL βουτυλοξειδίου αραιωμένο σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM.
- 4) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα για να δράσει το βουτυλοξείδιο.
- 5) Προστίθενται 100μL από κάθε erpendorf σε μία πλάκα μικροπιλοδότησης (96-well plate) σε τετραπλές επαναλήψεις.
- 6) Προστίθενται 25μL διαλύματος ΧΤΤ/PMS σε κάθε πηγαδάκι με πολυπιπέτα με κλειστό το φως του θαλάμου επίπεδης ροής αέρος (laminar air flow hood), καθώς το ΧΤΤ και το PMS είναι φωτοευαίσθητα. Η πλάκα μικροπιλοδότησης τυλίγεται με αλουμινόχαρτο.
- 7) Τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο.
- 8) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 470nm και στα 650nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 650nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 470nm.

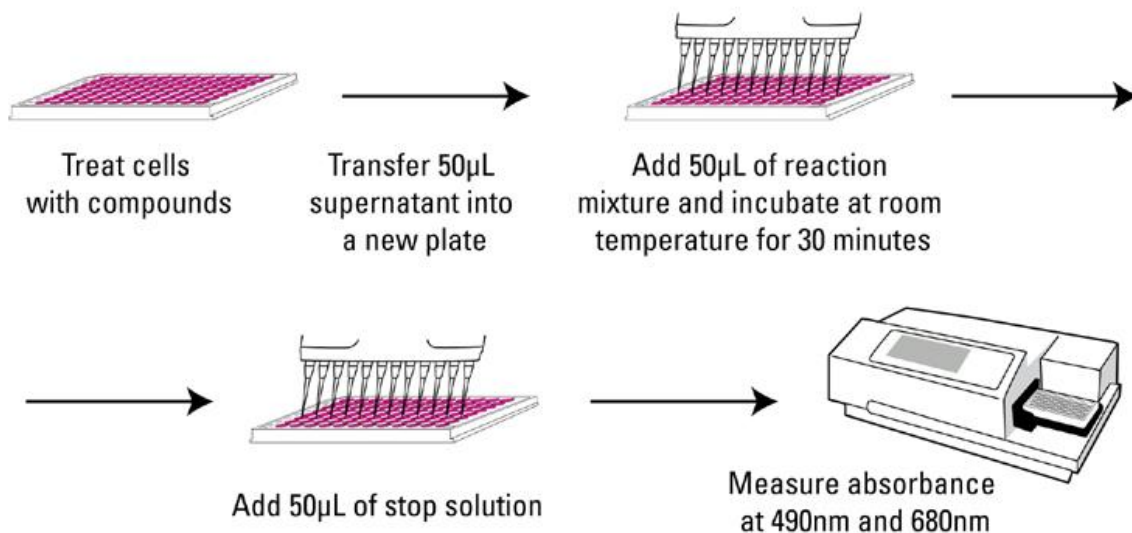


Εικόνα 2.9: Η απεικόνιση της πλάκας μικροτιτλοδότησης κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ.

2.7 Μεθοδολογία LDH

2.7.1 Σύνοψη διαδικασίας

Τα καλλιεργημένα κύτταρα επώάζονται με χημικές ενώσεις, οι οποίες επάγουν κυτταροτοξικότητα (λύση κυττάρων) και ακολούθως, απελευθερώνουν το ένζυμο LDH στο μέσο. Το υπερκείμενο, που περιέχει την απελευθερούμενη ποσότητα LDH, μεταφέρεται σε νέα πλάκα και αναμιγνύεται με το Reaction Mixture. Μετά από 30 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, οι αντιδράσεις σταματούν με την προσθήκη του Stop Solution. Μετράται η απορρόφηση στα 490nm και στα 680nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης πλάκας για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της μεθόδου.



Εικόνα 2.10: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH.

2.7.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων

- 1) Reaction Mixture: Διαλύεται ένα φιαλίδιο του Substrate Mix (λυοφιλοποιημένο) σε 11,4mL απεσταγμένου νερού. Αναμειγνύεται απαλά προς πλήρη διάλυση. Γίνεται απόψυξη ενός φιαλιδίου του Assay Buffer (0,6mL) σε θερμοκρασία δωματίου (προστασία από το φως). Το Reaction Mixture προκύπτει από την ανάμιξη του Assay Buffer (0,6mL) με 11,4mL του Substrate Mix. Απαλή ανάδευση και προστασία από το φως μέχρι τη χρήση. Όσο μίγμα περισσέψει από το πείραμα φυλάσσεται στην κατάψυξη (-20°C) προστατευμένο από το φως για 3-4 εβδομάδες.
- 2) 1X LDH Positive Control: Αραίωση 1µL από LDH Positive Control σε 10mL από 1% BSA (Bovine Serum Albumin) σε PBS (Phosphate Buffered Saline).

2.7.3 Προσδιορισμός του βέλτιστου αριθμού κυττάρων για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας LDH

Διαφορετικοί τύποι κυττάρων έχουν διαφορετικά επίπεδα δραστικότητας LDH. Για την εξαγωγή βέλτιστων αποτελεσμάτων είναι επιθυμητή η διεξαγωγή ενός προκαταρκτικού πειράματος, ώστε να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός κυττάρων, για να διασφαλιστεί ότι το σή-

μα LDH βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής. Δοκιμάστηκαν οι κυτταρικές σειρές Caco-2 (προσκολλημένα) και U-937 (αιωρούμενα) και χρησιμοποιήθηκαν από 20.000 έως 200.000 κύτταρα (ανά 20.000) στο κάθε πηγαδάκι στην πλάκα μικροπιλοδότησης.

Για τη διαδικασία στα προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προετοιμάστηκε μία σειρά αραιώσεων από κύτταρα (0-200.000 κύτταρα/100μL θρεπτικού υλικού: DMEM) σε δύο σετ πλακών μικροπιλοδότησης τετραπλών επαναλήψεων. (Συμπεριλαμβάνεται κι ένα control μόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα για τον προσδιορισμό της γραμμής βάσης της LDH).
- 2) Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προστέθηκαν 10μL αποστειρωμένου νερού στη μία πλάκα (**Spontaneous LDH Activity Control**).
- 4) Προστέθηκαν 10μL Lysis Buffer (10X) στην άλλη πλάκα με ήπια ανάμιξη (**Maximum LDH Activity Control**).
- 5) Τα κύτταρα επωάστηκαν για 45 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂.
- 6) Μεταφέρθηκαν 50μL υπερκείμενου υγρού από όλα τα δείγματα σε νέες πλάκες μικροπιλοδότησης. (Προστέθηκαν προαιρετικά σε άλλο πηγαδάκι 50μL 1X LDH Positive Control σε τετραπλές επαναλήψεις).
- 7) Προστέθηκαν 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη.
- 8) Τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως.
- 9) Προστέθηκαν 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη. (Διασπώνται τυχόν φυσαλίδες με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 10) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 490nm και στα 680nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm.
- 11) Σχηματίζεται η καμπύλη της τιμής απορρόφησης του Maximum LDH Activity Control και της τιμής απορρόφησης του Spontaneous LDH Activity Control προς τον αριθμό κυττάρων για να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός κυττάρων για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας LDH.

Για τη διαδικασία στα αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προετοιμάστηκε μία σειρά αραιώσεων από κύτταρα (0-200.000 κύτταρα/100μL θρεπτικού υλικού: RPMI 1640) σε δύο σετ erpendorfs. (Συμπεριλαμβάνεται κι ένα control μόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα για τον προσδιορισμό της γραμμής βάσης της LDH).
- 2) Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προστέθηκαν 10μL αποστειρωμένου νερού στο ένα σετ erpendorfs (**Spontaneous LDH Activity Control**).
- 4) Προστέθηκαν 10μL Lysis Buffer (10X) στην άλλο σετ erpendorfs με ήπια ανάμιξη (**Maximum LDH Activity Control**).
- 5) Τα κύτταρα επωάστηκαν για 45 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂.
- 6) Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1.000 στροφές για μισό λεπτό.
- 7) Μεταφέρθηκαν 50μL υπερκείμενου υγρού από όλα τα δείγματα σε δύο πλάκες μικροπιτλοδότησης. (Προστέθηκαν προαιρετικά σε άλλο πηγαδάκι 50μL 1X LDH Positive Control σε τετραπλές επαναλήψεις).
- 8) Προστέθηκαν 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη.
- 9) Τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως.
- 10) Προστέθηκαν 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη. (Διασπώνται τυχόν φυσαλίδες με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 11) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 490nm και στα 680nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm.
- 12) Σχηματίζεται η καμπύλη της τιμής απορρόφησης του Maximum LDH Activity Control και της τιμής απορρόφησης του Spontaneous LDH Activity Control προς τον αριθμό κυττάρων για να προσδιοριστεί ο βέλτιστος αριθμός κυττάρων για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας LDH.

2.7.4 Δοκιμασία LDH για προσκολλημένα στην επιφάνεια καλλιέργειας κύτταρα

- 1) Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας με την διαδικασία της θρυψινοποίησης που αναλύθηκε παραπάνω, τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και την κατάλληλη αραιώση του δείγματος στη βέλτιστη συγκέντρωση, μεταφέρονται 100.000 κύτταρα ανά 100μL θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι σε πλάκα μικροπιλοδότησης σε τετραπλές επαναλήψεις. (Συμπεριλαμβάνεται κι ένα control μόνο με θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα για τον προσδιορισμό της γραμμής βάσης της LDH). Πραγματοποιείται μεταφορά επιπλέον κυττάρων σε τετραπλές επαναλήψεις για τον προσδιορισμό του **Spontaneous LDH Activity Control** (με νερό) και του **Maximum LDH Activity Control** (με 10X Lysis Buffer).
- 2) Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να προσκολληθούν στην επιφάνεια καλλιέργειας.
- 3) Προετοιμάζονται τα εξής δείγματα:
- 4) **Spontaneous LDH Activity Control**: Προσθήκη 10μL αποστειρωμένου νερού σε τέσσερα πηγαδάκια.
- 5) **Maximum LDH Activity Control**: Καμία προσθήκη ακόμα σε τέσσερα πηγαδάκια.
- 6) **Βουτυλοξειδίο**: Προσθήκη 1μL διαλύματος βουτυλοξειδίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM, που προκύπτουν από κατάλληλες αραιώσεις σε DMSO) ανά τετραπλές επαναλήψεις.
- 7) Προστίθενται 10μL Lysis Buffer (10X) σε τέσσερα πηγαδάκια για τον προσδιορισμό του **Maximum LDH Activity Control** σε 10-15 λεπτά περίπου (χρειάζεται 45 λεπτά για να δράσει) και ακολουθεί ήπια ανάμιξη.
- 8) Τα κύτταρα επωάζονται για 45 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂. (Σύνολο 1 ώρα από την προσθήκη βουτυλοξειδίου.)
- 9) Μεταφέρονται 50μL του υπερκείμενου υγρού από κάθε δείγμα σε νέα πλάκα μικροπιλοδότησης.
- 10) Προστίθενται 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα και αναμιγνύονται χρησιμοποιώντας μία πολυπιπέτα.
- 11) Τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως.
- 12) Προστίθενται 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη. (Διασπώνται τυχόν φυσαλίδες με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 13) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 490nm και στα 680nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH, αφαι-

ρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm πριν τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας.

- 14) Για τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας, αφαιρείται η ελάχιστη (αυθόρμητη) δραστηριότητα LDH από τη δραστηριότητα LDH του βουτυλοξειδίου, διαιρείται με τη συνολική δραστηριότητα LDH (μέγιστη-ελάχιστη) και πολλαπλασιάζεται με 100, όπως προκύπτει από τον τύπο:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Compound - treated LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}} \times 100$$

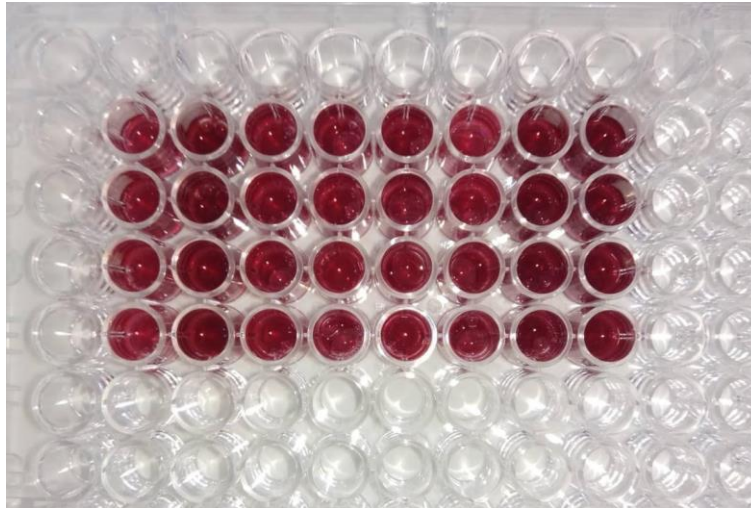
Στην περίπτωση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων, η ποσότητα των κυτάρων που απαιτείται ανά πηγαδάκι είναι για τα Hep G2 2.000, για τα WM 164 5.000 και για τα PC-3 5.000 κύτταρα. Μετά την ανάπτυξη των κυτάρων, αναρροφάται το θρεπτικό υλικό από την πλάκα μικροπιλοδότησης και προστίθενται 100μL της ένωσης διαλυμένης σε DMSO και αραιωμένης στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό στις εξής συγκεντρώσεις: 0μM, 0,5μM, 1μM, 2μM, 4μM, 8μM, 12μM, 16μM, 20μM, 25μM. Ο οργανικός διαλύτης DMSO αποτελεί τον πιο κοινό διαλύτη για τη χορήγηση ουσιών σε κυτταροκαλλιέργειες, η περιεκτικότητά του οποίου στο θρεπτικό μέσο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1% v/v. Τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες για να δράσει η χημική ένωση. Τα υπόλοιπα στάδια παραμένουν ίδια.

2.7.5 Δοκιμασία LDH για αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα

- 1) Μετά τη μέτρηση του αριθμού των κυτάρων σε πλάκα Neubauer και την κατάλληλη αραιώση του δείγματος στη βέλτιστη συγκέντρωση, μεταφέρονται 500.000 κύτταρα ανά 500μL θρεπτικού υλικού σε 8 eppendorfs.
- 2) Τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH, για να ηρεμήσουν.
- 3) Προετοιμάζονται τα εξής δείγματα:
- 4) **Spontaneous LDH Activity Control:** Προσθήκη 50μL αποστειρωμένου νερού σε ένα eppendorf.
- 5) **Maximum LDH Activity Control:** Καμία προσθήκη ακόμα σε eppendorf.
- 6) **Βουτυλοξείδιο:** Προσθήκη 5μL διαλύματος βουτυλοξειδίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 250μM, 500μM, που προκύπτουν από κατάλληλες αραιώσεις σε DMSO) σε 6 eppendorfs αντίστοιχα.

- 7) Προστίθενται 50μL Lysis Buffer (10X) σε ένα eppendorf για τον προσδιορισμό του **Maximum LDH Activity Control** σε 10-15 λεπτά περίπου (χρειάζεται 45 λεπτά για να δράσει) και ακολουθεί ήπια ανάμιξη.
- 8) Τα κύτταρα επωάζονται για 45 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO₂. (Σύνολο 1 ώρα από την προσθήκη βουτυλοξειδίου.)
- 9) Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση όλων των eppendorfs στις 1.800 στροφές για 5 λεπτά και μεταφέρονται 50μL του υπερκείμενου υγρού από κάθε δείγμα σε πλάκα μικροπιλοδότησης ανά τετραπλές επαναλήψεις.
- 10) Προστίθενται 50μL Reaction Mixture σε κάθε δείγμα και αναμιγνύονται χρησιμοποιώντας μία πολυπιπέτα.
- 11) Τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως.
- 12) Προστίθενται 50μL Stop Solution σε κάθε δείγμα με ήπια ανάμιξη. (Διασπώνται τυχόν φυσαλίδες με βελόνα, καθώς εμποδίζουν τις μετρήσεις απορρόφησης.)
- 13) Μετράται η οπτική απορρόφηση στα 490nm και στα 680nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Tecan. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH, αφαιρείται η τιμή απορρόφησης στα 680nm (σήμα υποβάθρου από το όργανο) από την τιμή απορρόφησης στα 490nm πριν τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας.
- 14) Για τον υπολογισμό της % κυτταροτοξικότητας, αφαιρείται η ελάχιστη (αυθόρμητη) δραστηριότητα LDH από τη δραστηριότητα LDH του βουτυλοξειδίου, διαιρείται με τη συνολική δραστηριότητα LDH (μέγιστη-ελάχιστη) και πολλαπλασιάζεται με 100, όπως προκύπτει από τον τύπο:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Compound - treated LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}} \times 100$$



Εικόνα 2.11: Η απεικόνιση της πλάκας μικροπιλοδότησης κατά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης με χρήση μεθοδολογίας LDH.



Εικόνα 2.12: Χρήση πολυπιπέτας για την προσθήκη MTT, ΧΤΤ/PMS και LDH.

2.8 Ανίχνευση πρωτεϊνών-δεικτών κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση κατά Western

2.8.1 Παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών

Η παρασκευή ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών από ίζημα κυττάρων έγινε με χρήση του Radioimmunoprecipitation Assay buffer (RIPA buffer), το οποίο είναι ένα ισχυρό διάλυμα λύσης κυττάρων και ιστών. Στην αρχή γίνεται έκπλυση και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττά-

ρων με κρύο διάλυμα PBS 1X και μετά φυγοκέντρωση στις 2.000 στροφές/λεπτό στους 4°C για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 100μl RIPA buffer, 1μl ορθοβαναδικό νάτριο (1mM), 1μl PMSF (2mM) και 1μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitor cocktail) για κάθε 1×10^6 κύτταρα. Ακολουθεί επώαση στον πάγο και φυγοκέντρωση στις 10.400στροφές/λεπτό στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο περιέχει το ολικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών.

2.8.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Η μέθοδος Bradford είναι μία γρήγορη και ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικροποσοτήτων πρωτεΐνης. Στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 μπορεί να βρεθεί σε δύο χρωματικές καταστάσεις, την ερυθρή και την κυανή. Η ερυθρή μορφή μετατρέπεται στην κυανή όταν η χρωστική αντιδράσει με πρωτεΐνη σε όξινο υδατικό διάλυμα. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο χρωστικής και πρωτεΐνης έχει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm.

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA). Από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης, σε συνάρτηση με τη πρωτεϊνική συγκέντρωση (μg/μl) του κάθε δείγματος. Έπειτα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των άγνωστων πρωτεϊνικών δειγμάτων, προστίθενται 4μl δείγματος σε 796μl ddH₂O και 200μl από το αντιδραστήριο Bradford και στη συνέχεια φωτομετρούνται στα 595nm. Από την εξίσωση ευθείας της πρότυπης καμπύλης, υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιέχεται στα άγνωστα δείγματα.

2.8.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος, εφόσον γίνεται χρήση SDS (sodium dodecyl sulfate), το οποίο είναι ένα αρνητικά φορτισμένο ιονικό απορρυπαντικό. Το SDS δεσμεύεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνικών μορίων και προκαλεί τη μετουσίωσή τους. Έτσι τα πρωτεϊνικά μόρια αποσυνδέονται από άλλες πρωτεΐνες ή λιπίδια και γίνονται υδατοδιαλυ-

τά. Οι πρωτεΐνες, με τη διαδικασία αυτή, φορτίζονται αρνητικά και η κινητικότητα τους είναι ανάλογη μόνο του μοριακού τους βάρους. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναδιαλύονται σε αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (SDS sample buffer) το οποίο περιέχει 50μM Tris-HCl pH 6,8, 5M β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS, 0,1% κυανού της βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη. Ακολουθεί ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε κάθετο ασυνεχές πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου, το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα διαφορετικού pH και συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου: το πήκτωμα επιστοιβαξης (επάνω τμήμα) και το πήκτωμα διαχωρισμού (κάτω τμήμα).

Στο πήκτωμα επιστοιβαξης επιτυγχάνεται η συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μία λεπτή στοιβάδα, ώστε να έχουν όλες το ίδιο σημείο εκκίνησης και αυτό περιέχει απεσταγμένο νερό, 0,5M Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% w/v, ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο 30%, υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) 10% και τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'- tetramethylethylenediamine, TEMED). Από την άλλη, το πήκτωμα διαχωρισμού βοηθά ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Αυτό περιλαμβάνει απεσταγμένο νερό, 1,5M Tris-HCl pH 8,8, SDS 10% w/v, ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο 30%, υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) 10% και τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'- tetramethylethylenediamine, TEMED). Η περιεκτικότητά του όμως σε ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο διαφέρει, καθώς αυτή καθορίζει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος και επομένως, ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε, επιλέγουμε την κατάλληλη περιεκτικότητα.

Τα διαλύματα των πηκτωμάτων επιστοιβαξης και διαχωρισμού στοιβάζονται σε κατάλληλη διάταξη και αφήνονται να πήξουν και να στερεοποιηθούν. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου γίνεται η προσθήκη των πρωτεϊνικών δειγμάτων που περιέχουν όλα την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης (40μg). Επίσης, προστίθενται και 15μl δείκτη μεγέθους μοριακών βαρών (Prestained Protein Marker). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 200mM γλυκίνη, 25mM Tris-HCl pH 8,7 και 0,1% SDS), υπό σταθερή τάση 160V και ένταση ρεύματος 25mA. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο λόγω του αρνητικού φορτίου που τους έχει προσδώσει η δέσμευση του SDS.

2.8.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωρισθεί μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (πόρων 0,2μm), μέσω ειδικής συσκευής υγρής μεταφοράς. Το πήκτωμα τοποθετείται προς την κάθοδο και η νιτροκυτταρίνη προς την άνοδο. Οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες (λόγω της δράσης του SDS), κατευθύνονται προς τον θετικό πόλο. Το διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) περιέχει 100ml 10X Running buffer, 200ml μεθανόλη και 700ml κρύο απιονισμένο νερό, ενώ η μεταφορά πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ρεύματος 250mA και τάση περίπου 100V.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται σε μικρή ποσότητα διαλύματος της χρωστικής Ponceau 0,1% w/v (0,1g Ponceau σε 5ml οξικό οξύ 5% και 95ml απεσταγμένο νερό), ώστε να ελεγχθεί η σωστή και πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών. Έπειτα, ξεπλένεται με διάλυμα TBS (10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl) τρεις φορές. Ύστερα γίνεται επώαση της μεμβράνης με διάλυμα επικάλυψης των μη ειδικών θέσεων (Blocking buffer: TBS buffer 1X, 5% σκόνη γάλακτος Regilait με χαμηλά λιπαρά, 0,1% Tween 20). Έτσι, θα καταληφθούν οι μη ειδικές για τα πρωτογενή αντισώματα θέσεις και θα αυξηθεί η ειδικότητα πρόσδεσης.

Ακολούθως, η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο επιλέγεται ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, μέσα σε μικρά σακουλάκια ζελατίνης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBS-Tween (TBS 1X, 0,1% Tween 20) πολλαπλές φορές. Ύστερα, πραγματοποιείται η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο επιλέγεται ανάλογα με τον οργανισμό στον οποίο έχει γίνει η ανοσοποίηση για να παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα, σε συνθήκες σκότους. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται αρχικά με διάλυμα TBS-Tween πολλαπλές φορές και μετά μία φορά με TBS 1X.

2.8.5 Εμφάνιση συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανοσοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με χρήση συστήματος ECL (Enhanced Chemiluminescent Substrate), το οποίο βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Στη χημειοφωταύγεια, αυτή η διέγερση προκαλείται από

μία χημική αντίδραση. Στην προκειμένη περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου (Horse Radish Peroxidase HRP), το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης. Η λουμινόλη (diacylhydrazide) οξειδώνεται παρουσία HRP παρουσία χημικών ενισχυτών (φαινόλες) σε αλκαλικές συνθήκες και διεγείρεται. Επιστρέφοντας στην κατάσταση ηρεμίας, παράγει φως (μήκος κύματος 428nm), το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί. Με τη βοήθεια των φωτονίων που παράγονται, είναι δυνατός ο εντοπισμός της θέσης του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.

Το διάλυμα εμφάνισης ECL προκύπτει από την ανάμιξη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια λουμινόλης (Enhanced Luminol reagent) και υπεροξειδίου (Oxidizing reagent). Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυταρίνης τοποθετείται στην πλάκα εμφάνισης του μηχανήματος UVP ChemiDoc-It² Imager. Το διάλυμα εμφάνισης ECL προστίθεται στη μεμβράνη, ώστε να καλύπτει όλη την επιφάνειά της. Ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης και καταγραφή των απεικονίσεων σε χρόνους έκθεσης 1, 5 και 10 λεπτά. Έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ζωνών που εμφανίζονται με τον προσδιορισμό του μεγέθους τους, μετά από αντιστοίχιση τους με τις ζώνες του πρωτεϊνικού μάρτυρα.

2.8.6 Αντισώματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πρωτογενή αντισώματα:

- 1) Το μονοκλωνικό mouse της β-ακτίνης (43kDa), πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, αραιωμένο 1:1.000 σε blocking buffer, ως εσωτερικός ποσοτικός μάρτυρας
- 2) Το πολυκλωνικό mouse της PARP-1 (116, 89kDa), αραιωμένο 1:500 σε blocking buffer, ως αποπτωτικός δείκτης
- 3) Το μονοκλωνικό rabbit της phospho-MLKL (54kDa), αραιωμένο 1:500 σε blocking buffer, ως δείκτης νεκρόπτωσης

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δευτερογενή αντισώματα:

- 1) Το πολυκλωνικό rabbit IgG-HRP anti-mouse, αραιωμένο 1:1.000 σε blocking buffer, ώστε να προσδεθεί στα αντισώματα ποντικού
- 2) Το πολυκλωνικό goat IgG-HRP anti-rabbit, αραιωμένο 1:1.000 σε blocking buffer, ώστε να προσδεθεί στα αντισώματα κουνελιού

2.9 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για τη σύγκριση των διαφόρων χημικών ενώσεων ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών που εξετάζονται, προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} για κάθε ένωση. Η τιμή IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) αποτελεί μέτρο της δραστηριότητας μίας ουσίας στην αναστολή μίας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Αυτή η ποσοτική μέτρηση υποδεικνύει την ποσότητα ενός συγκεκριμένου φαρμάκου ή άλλης ουσίας (αναστολέα) που χρειάζεται για να ανασταλεί κατά το ήμισυ μία δεδομένη βιολογική διεργασία (ή συστατικό μίας διεργασίας, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέας κυττάρου ή μικροοργανισμός). Σύμφωνα με τον FDA (Food and Drug Administration), η τιμή IC_{50} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου η οποία απαιτείται για 50% αναστολή *in vitro*. Στην περίπτωση της LDH, προσδιορίζεται η τιμή της LC_{50} (lethal concentration, 50%), η οποία αποτελεί ένδειξη της θνησιμότητας μίας δεδομένης τοξικής ουσίας ή παθογόνου ή τύπου ακτινοβολίας. Στην προκειμένη περίπτωση αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου η οποία απαιτείται για 50% κυτταρικό θάνατο *in vitro*.

Για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} και LC_{50} χρησιμοποιήθηκαν δύο τρόποι:

- 1) Το μοντέλο λογαριθμομονάδας logit. Στην στατιστική, η συνάρτηση logit είναι ο λογάριθμος των πιθανοτήτων $p/(1-p)$, όπου ως p ορίζεται η πιθανότητα. Είναι ένας τύπος συνάρτησης που δημιουργεί έναν χάρτη τιμών πιθανοτήτων από $[0, 1]$ έως $[-\infty, +\infty]$. Στην πράξη, υπολογίζεται η συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε $\ln(\text{ζωντανά/πεθαμένα κύτταρα})=0$, δηλαδή όταν έχει ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός του 50% των ζωντανών κυττάρων οπότε η συγκέντρωση των ζωντανών κυττάρων είναι ίση με των πεθαμένων [$\ln(1)=0$], από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει από το διάγραμμα $\ln(\text{ζωντανά/πεθαμένα κύτταρα})$ σε σχέση με τη συγκέντρωση της υπό εξέταση ουσίας.
- 2) Το μοντέλο πιθανομονάδας probit. Στην στατιστική, το μοντέλο probit είναι ένα είδος παλινδρόμησης, όπου η εξαρτημένη μεταβλητή μπορεί να πάρει μόνο δύο τιμές, π.χ. ναι ή όχι. Η ταξινόμηση των παρατηρήσεων με βάση τις προβλεπόμενες πιθανότητες είναι ένας τύπος δυαδικής ταξινόμησης μοντέλου. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιεί πιο συχνά το πρότυπο υπολογισμού μέγιστης πιθανότητας και η διαδικασία εκτίμησης ονομάζεται παλινδρόμηση πιθανομονάδας. Αν η μεταβλητή απόκρισης Y είναι δυαδική, τότε μπορεί να έχει μόνο δύο πιθανά αποτελέσματα που θα δηλωθούν ως 1 και 0. Το Y στην προκειμένη περίπτωση εκπροσωπεί την πιθανότητα να εμφανιστεί κυτ-

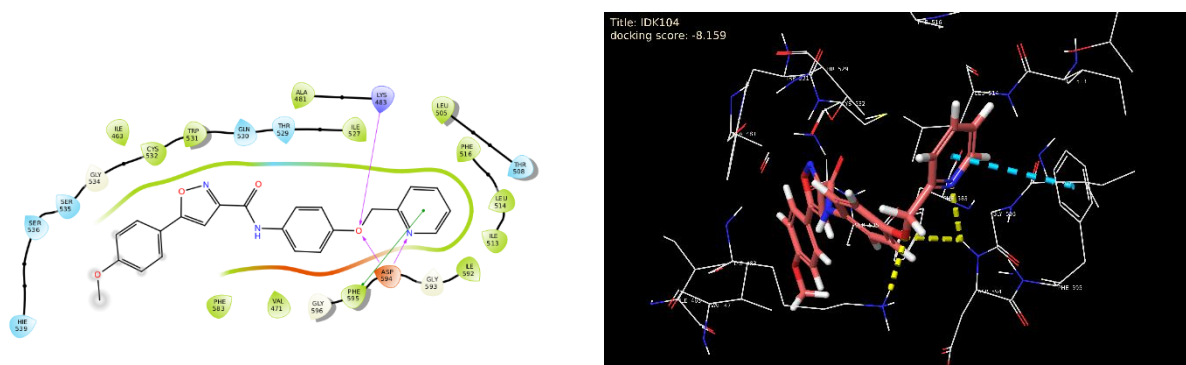
ταροτοξικότητα σε μία δεδομένη συγκέντρωση ουσίας κι εκφράζεται ως υψηλή πιθανότητα ή χαμηλή. Στην πράξη, υπολογίζεται η IC_{50} ή η LC_{50} από το διάγραμμα της % κυτταρικής θνησιμότητας σε πιθανομονάδες σε σχέση με το \log_{10} (συγκέντρωση ουσίας).

Στις περιπτώσεις που υπάρχουν μόνον υψηλές και χαμηλές τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας, η τιμή IC_{50} προσδιορίζεται γραφικά από το διάγραμμα της σιγμοειδούς καμπύλης της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό εξέταση ουσίας. Αντίστοιχα, στις περιπτώσεις που υπάρχουν μόνο χαμηλές και υψηλές τιμές κυτταροτοξικότητας, η τιμή LC_{50} προσδιορίζεται γραφικά από το διάγραμμα της σιγμοειδούς καμπύλης της % κυτταροτοξικότητας σε σχέση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης της υπό εξέταση ουσίας. Στις περιπτώσεις που δεν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα μέχρι τα 100μM, δεν παρουσιάζεται κάποια τιμή IC_{50} . Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις, η τιμή προσδιορίζεται μόνον από 2 σημεία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (50μM και 100μM).

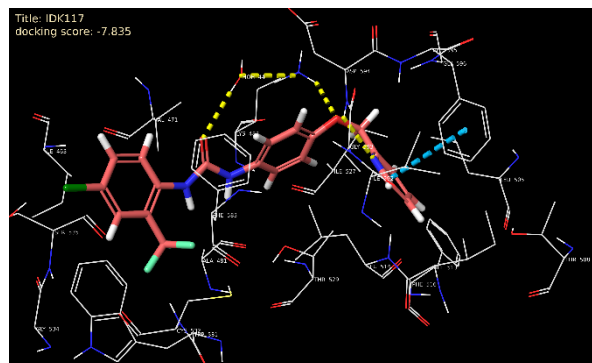
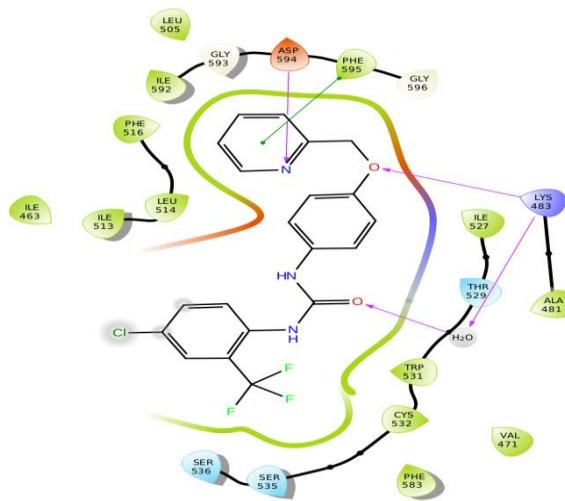
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μοριακή πρόσδεση (*In silico docking*)

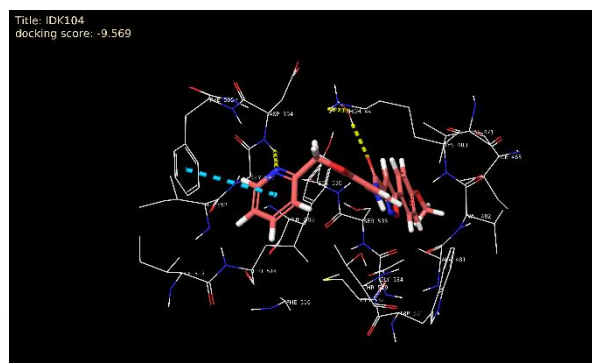
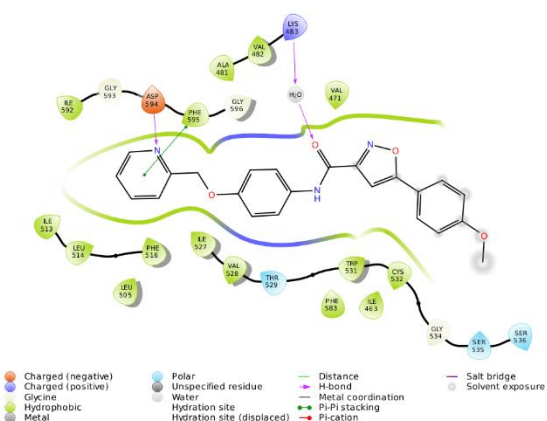
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης, καθώς και οι τιμές Docking Score των βενζοαμιδικών παραγώγων IDK 104 και IDK 117 και των βενζοθειαζολικών παραγώγων ΥΥΜ 212, ΥΥΜ 257, ΥΥΜ 303, IDK 132, IDK 139, IDK 142, IDK 144 και IDK 145 στα κρυσταλλικά σύμπλοκα που προέρχονται από την PDB με κωδικό: 3OG7 και με κωδικό: 4XV1 παριστάνονται στις Εικόνες 3.1-3.16 και στους Πίνακες 3.1 και 3.2 που ακολουθούν. Στο τέλος, παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των παραγώγων αυτών με τα κρίσιμα αμινοξέα αυτών των κρυσταλλικών συμπλόκων και το είδος των χημικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ τους (Πίνακας 3.3).



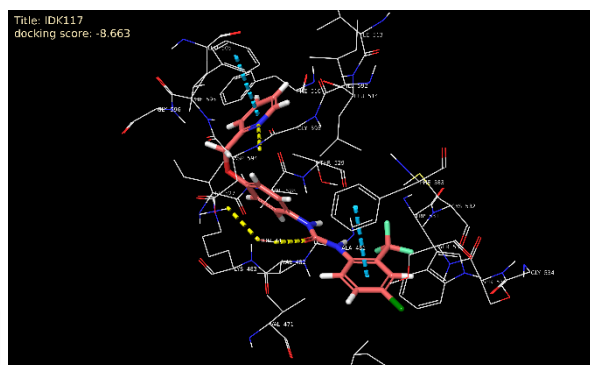
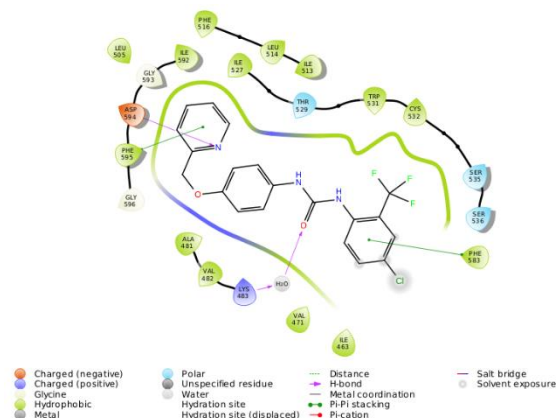
Εικόνα 3.1: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 104 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



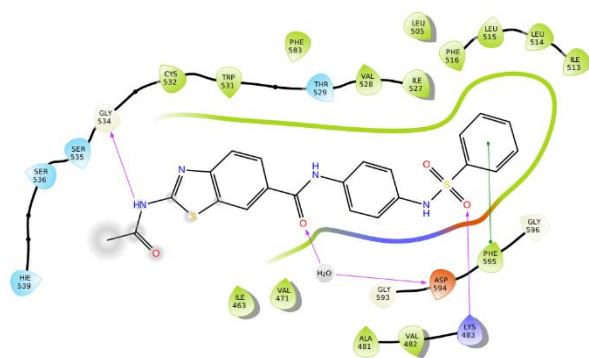
Εικόνα 3.2: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγωγού IDK 117 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



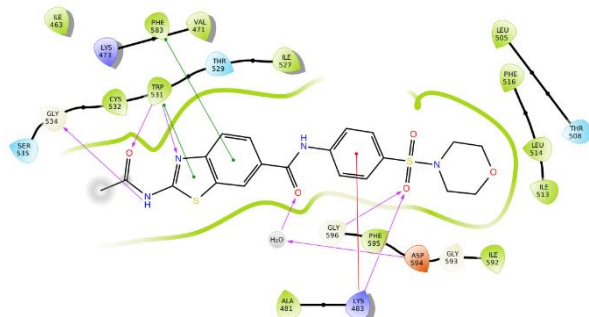
Εικόνα 3.3: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγωγού IDK 104 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης XP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



Εικόνα 3.4: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 117 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης XP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



Εικόνα 3.5: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου GYM 212 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης IFD σε 2D διαμόρφωση.

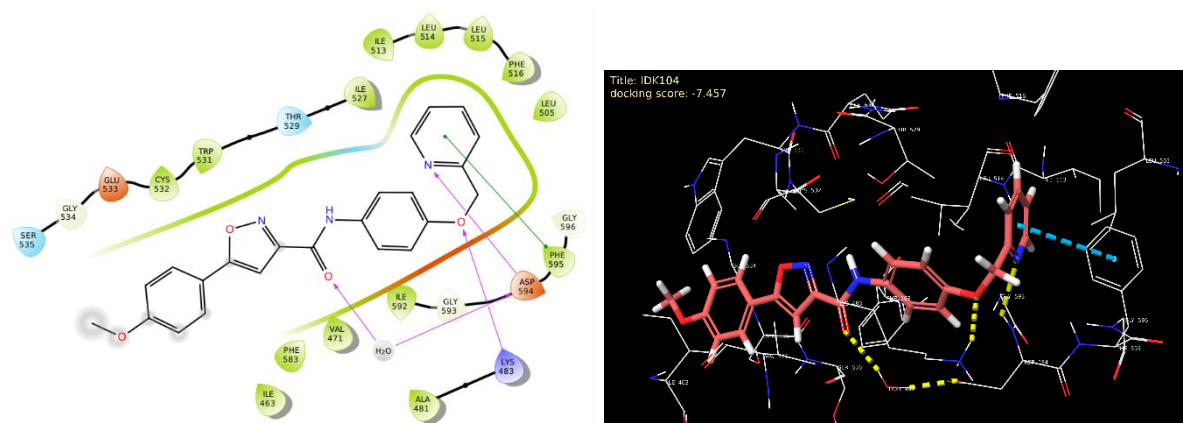


Εικόνα 3.6: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου GYM 257 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης IFD σε 2D διαμόρφωση.

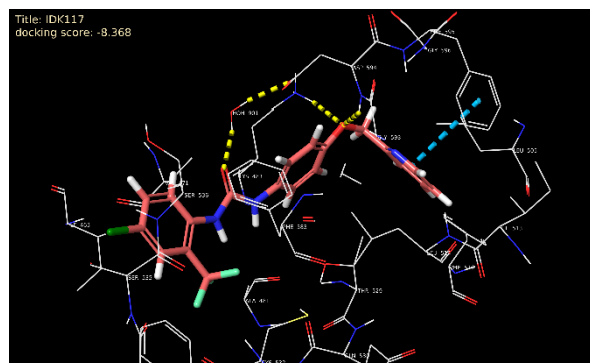
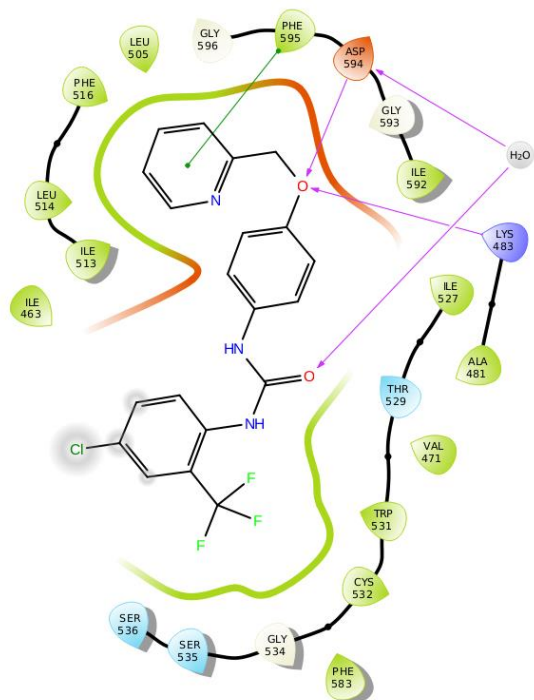
Docking Score	SP	XP	IFD
IDK 104	-8,159	-9,569	
IDK 117	-7,835	-8,663	
YYM 212			-10,603
YYM 257			-10,869

Πίνακας 3.1: Οι τιμές Docking Score των βενζοαμιδικών παραγώγων IDK 104 και IDK 117 και των βενζοθειαζολικών παραγώγων YYM 212 και YYM 257 στο κρυσταλλικό σύμπλοκο που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP, XP και IFD.

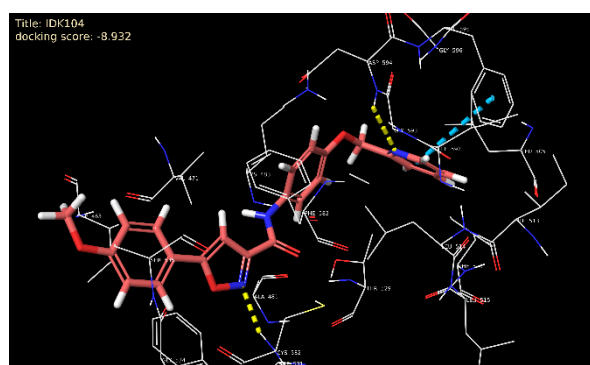
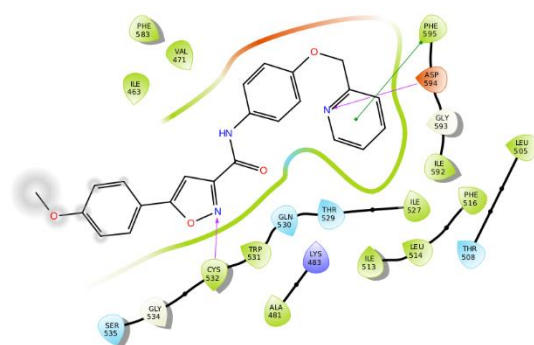
Από τις τιμές αυτές, προβλέπεται να έχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με την ογκοπρωτεΐνη BRAF V600E η ένωση YYM 257 κι έπειτα η YYM 212, ενώ ακολουθούν η IDK 104 και η IDK 117 με χαμηλότερες τιμές.



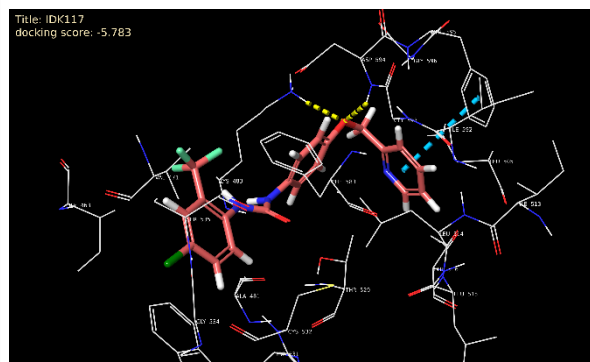
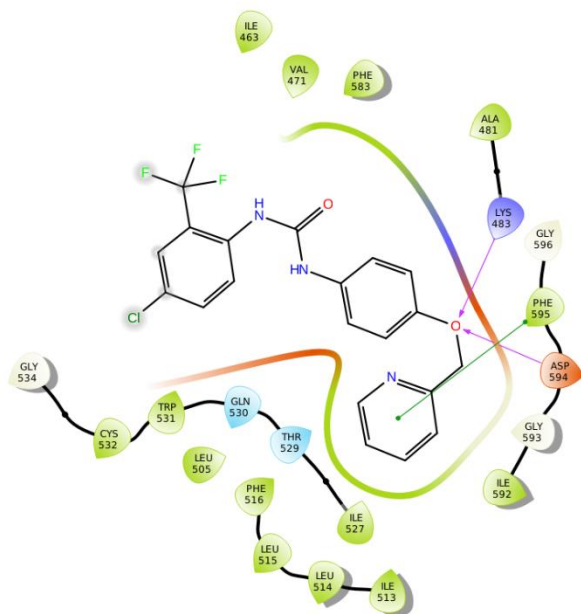
Εικόνα 3.7: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 104 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



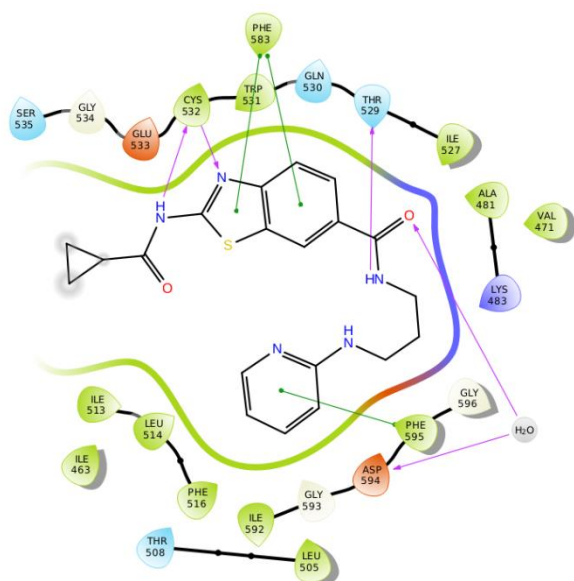
Εικόνα 3.8: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 117 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



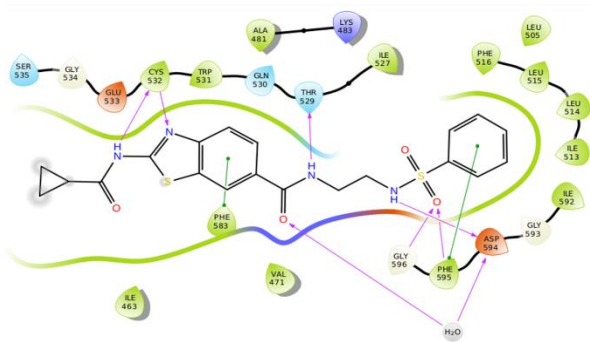
Εικόνα 3.9: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 104 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης XP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



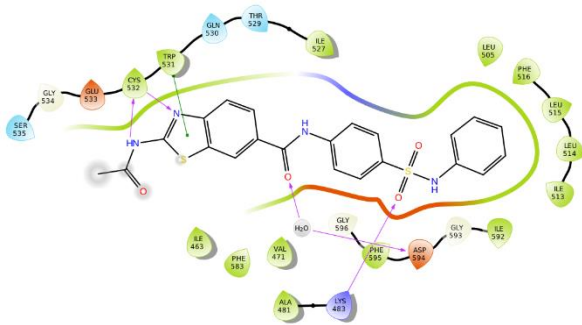
Εικόνα 3.10: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 117 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης XP σε 2D (αριστερά) και σε 3D (δεξιά) διαμόρφωση.



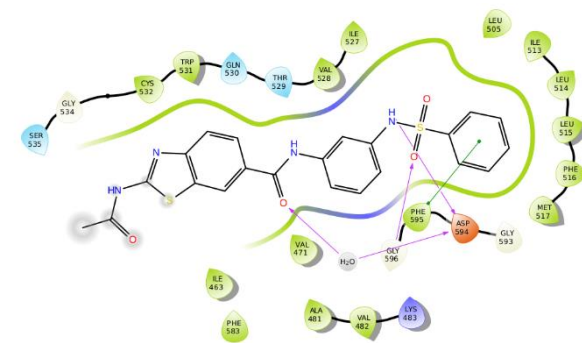
Εικόνα 3.11: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου YGM 303 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης XP σε 2D διαμόρφωση.



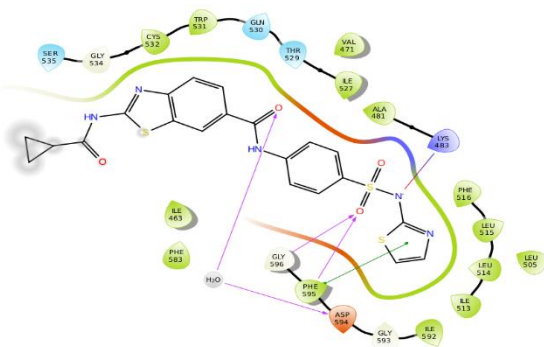
Εικόνα 3.12: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου IDK 142 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης XP σε 2D διαμόρφωση.



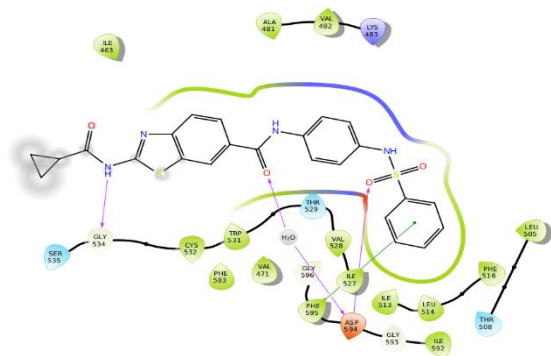
Εικόνα 3.13: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου IDK 132 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης IFD σε 2D διαμόρφωση.



Εικόνα 3.14: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου IDK 139 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης IFD σε 2D διαμόρφωση.



Εικόνα 3.15: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου IDK 144 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης IFD σε 2D διαμόρφωση.



Εικόνα 3.16: Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοθειαζολικού παραγώγου IDK 145 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης IFD σε 2D διαμόρφωση.

Docking Score	SP	XP	IFD
IDK 104	-7,457	-8,932	
IDK 117	-8,368	-5,783	
YYM 303		-10,461	
IDK 142		-12,01	
IDK 132			-11,49
IDK 139			-11,5
IDK 144			-7,018
IDK 145			-8,702

Πίνακας 3.2: Οι τιμές Docking Score των βενζοαμιδικών παραγώγων IDK 104 και IDK 117 και των βενζοθειαζολικών παραγώγων YYM 303, IDK 142, IDK 132, IDK 139, IDK 144 και IDK 145 στο κρυσταλλικό σύμπλοκο που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση των αλγορίθμων Μοριακής Πρόσδεσης SP, XP και IFD.

Από τις τιμές αυτές, προβλέπεται να έχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με την ογκοπρωτεΐνη BRAF V600E η ένωση IDK 142, στη συνέχεια η IDK 139 και η IDK 132 κι έπειτα η YYM 303, ενώ ακολουθούν η IDK 145, η IDK 104, η IDK 117 και η IDK 144 με χαμηλότερες τιμές.

ΔΕΣΜΟΙ	Lys 483	Gln 530	Cys 532	Asp 594	Phe 595	Gly 596
IDK 104*	H-bond			H-bond	Pi-pi stacking	
IDK 117	H-bond			H-bond	Pi-pi stacking	
YYM 212	H-bond			H-bond	Pi-pi stacking	
YYM 257	H-bond			H-bond		H-bond
YYM 303			H-bond	H-bond	Pi-pi stacking	
IDK 132	H-bond		H-bond	H-bond		
IDK 139				H-bond	Pi-pi stacking	H-bond
IDK 142			H-bond	H-bond	H-bond	H-bond
IDK 144	Salt bridge			H-bond	H-bond	H-bond
IDK 145				H-bond	Pi-pi stacking	

Πίνακας 3.3: Οι αλληλεπιδράσεις των βενζοαμιδικών και βενζοθειαζολικών παραγώγων με τα κρίσιμα αμινοξέα των κρυσταλλικών συμπλόκων που προέρχονται από την PDB με κωδικό: 3OG7 και με κωδικό: 4XV1 και το είδος των χημικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ τους.

* Οι αλληλεπιδράσεις του βενζοαμιδικού παραγώγου IDK 104 με τα κρίσιμα αμινοξέα του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 3OG7 με χρήση του αλγορίθμου Μοριακής Πρόσδεσης SP και XP και του συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου SP φαίνονται στον Πίνακα. Στην περίπτωση του κρυσταλλικού συμπλόκου που προέρχεται από την PDB με κωδικό: 4XV1 με χρήση του αλγορίθμου XP, οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται είναι: H-bond με το Cys 532 και το Asp 594, pi-pi stacking με το Phe 595.

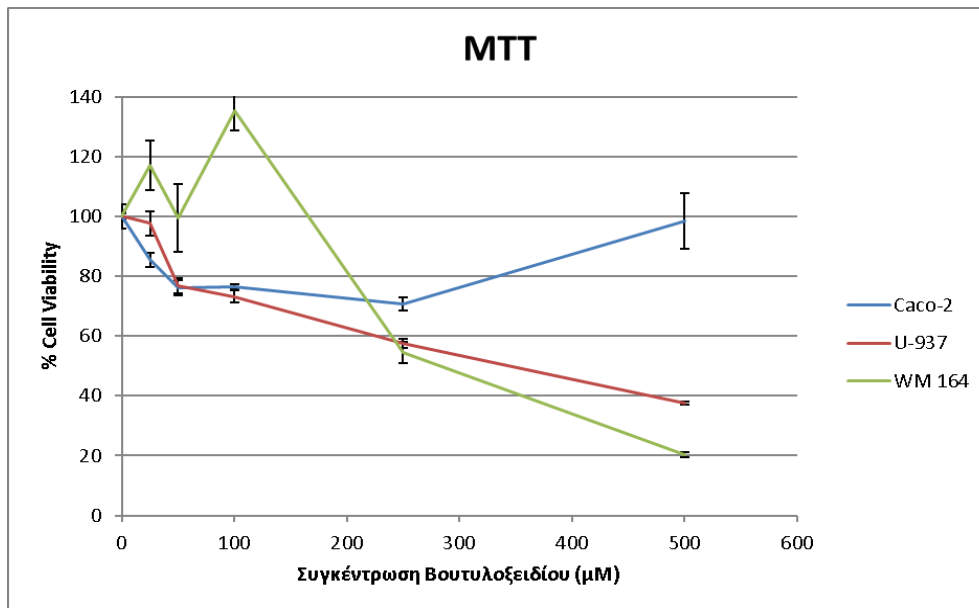
Από αυτές τις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με τα κρίσιμα αμινοξέα και γνωρίζοντας ότι ο δεσμός υδρογόνου είναι πιο ισχυρός από τη γέφυρα άλατος και την π-π στοίβαξη, προβλέπεται να έχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με την ογκοπρωτεΐνη BRAF V600E η ένωση IDK 142, στη συνέχεια η IDK 144 κι έπειτα η IDK 132 και η YYM 257, ενώ ακολουθούν η IDK 104, η IDK 117, η YYM 212, η YYM 303, η IDK 139 και τέλος η IDK 145 με ασθενέστερες

αλληλεπιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο βενζοθειαζολικός δακτύλιος προσδίδει συχνά μία αλληλεπίδραση κάνοντας δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Cys 532.

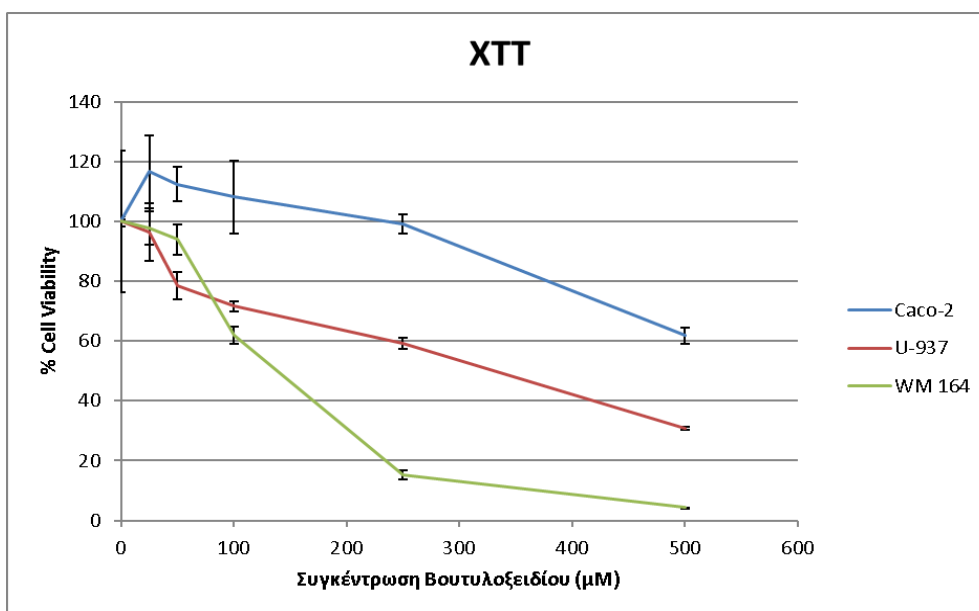
Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα των τιμών docking score και των αλληλεπιδράσεων με τα κρίσιμα αμινοξέα, αναμένεται η ένωση IDK 142 (DS: -12,01 και αλληλεπιδράσεις με 4 κρίσιμα αμινοξέα) και η IDK 132 (DS: -11,49 και αλληλεπιδράσεις με 3 κρίσιμα αμινοξέα) να έχουν καλύτερη ικανότητα αναστολής της κινάσης BRAF V600E και επομένως, στα *in vitro* βιολογικά πειράματα να είναι περισσότερο κυτταροτοξικές στα κύτταρα μελανώματος WM 164.

3.2 Σύγκριση *in vitro* μεθοδολογιών κυτταρικής βιωσιμότητας με πρότυπη ουσία

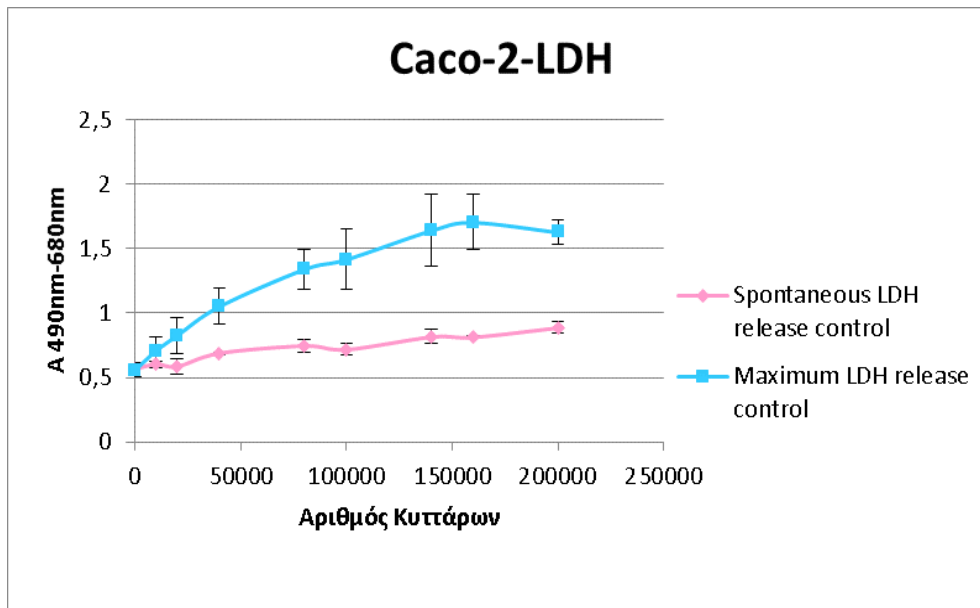
Παρακάτω συγκρίνονται οι μεθοδολογίες κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας με πρότυπη κυτταροτοξική ουσία το βουτυλοξείδιο, που είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό (Διαγράμματα 3.1-3.5).



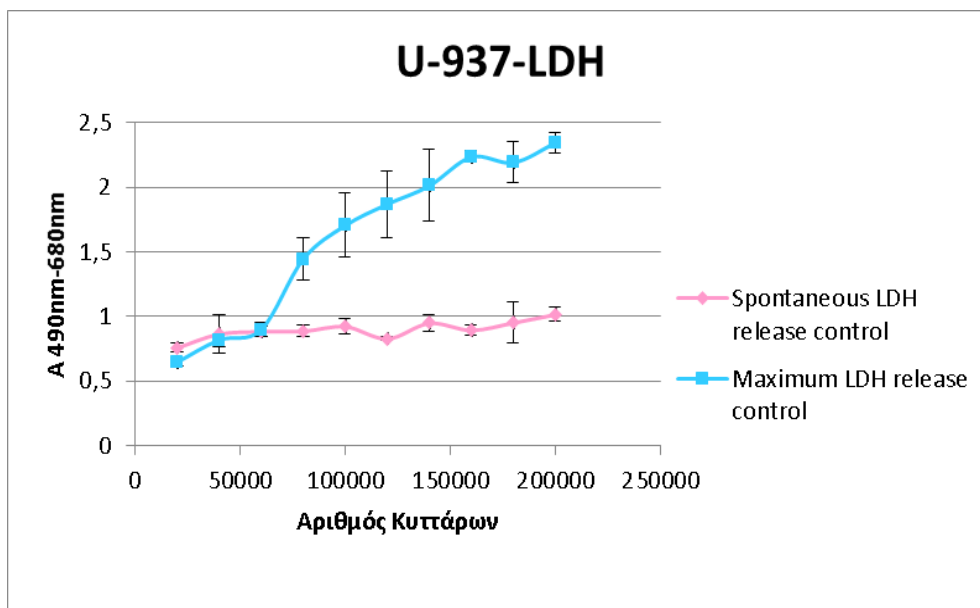
Διάγραμμα 3.1: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 500μΜ βουτυλοξειδίου με χρήση μεθοδολογίας MTT στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2, U-937 και WM 164 (Errorbars \pm SD).



Διάγραμμα 3.2: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 500μΜ βουτυλοξειδίου με χρήση μεθοδολογίας XTT στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2, U-937 και WM 164 (Errorbars \pm SD).

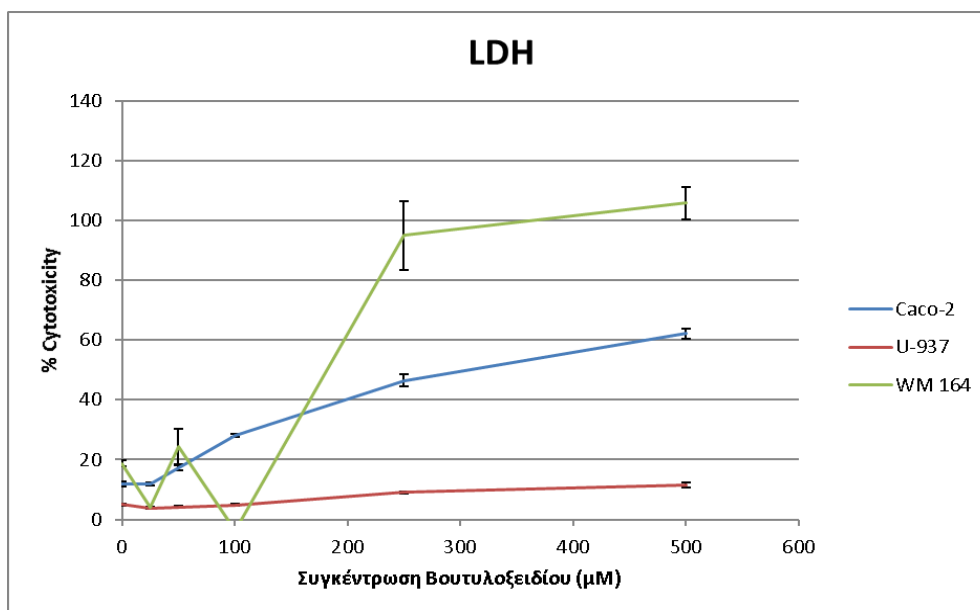


Διάγραμμα 3.3: Οι καμπύλες της LDH δραστικότητας της κυτταρικής σειράς Caco-2 προς τον αριθμό των κυττάρων (Errorbars \pm SD).



Διάγραμμα 3.4: Οι καμπύλες της LDH δραστικότητας της κυτταρικής σειράς U-937 προς τον αριθμό των κυττάρων (Errorbars \pm SD).

Από τις δύο καμπύλες προκύπτει ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές ο βέλτιστος αριθμός κυττάρων είναι γύρω στα 100.000 κύτταρα ανά 100μL θρεπτικού υλικού (περίπου στο 1,5 η τιμή της απορρόφησης).



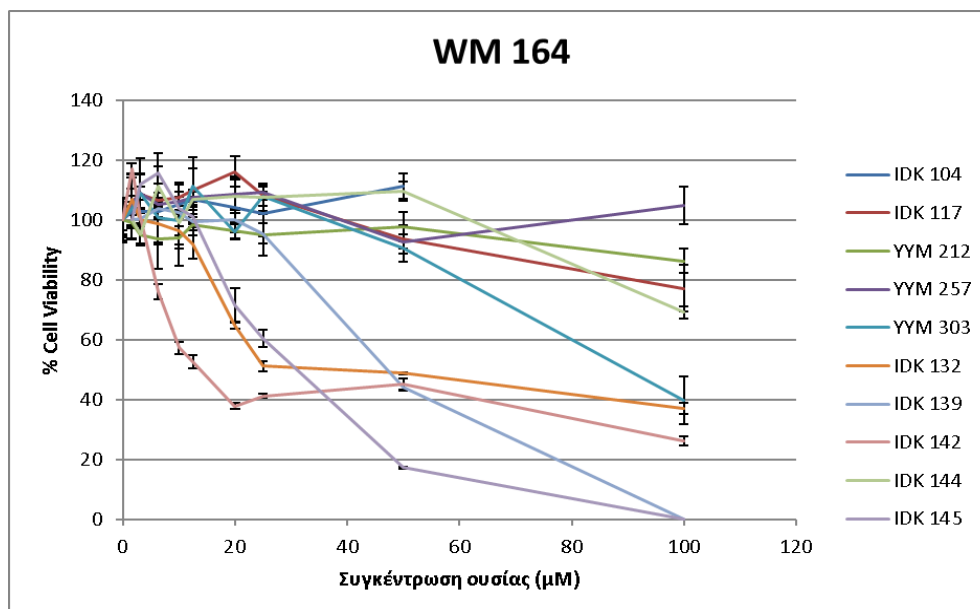
Διάγραμμα 3.5: Οι καμπύλες της % κυτταροτοξικότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 500μΜ βουτυλοξειδίου με χρήση μεθοδολογίας LDH στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2, U-937 και WM 164 (Errorbars \pm SD).

Από τις δοκιμασίες κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας προκύπτει ότι η μέθοδος ΧΤΤ είναι πιο ευαίσθητη και γρήγορη από την ΜΤΤ, ωστόσο η ΜΤΤ είναι πιο οικονομική. Και οι δύο μετράνε τη μεταβολική ενεργότητα των ζωντανών κυττάρων, οπότε δίνουν μία εικόνα για την κυτταρική βιωσιμότητα. Αντίθετα, η μέθοδος LDH μετράει την ποσότητα των κυττάρων που έχουν λυθεί εξαιτίας της χημικής ένωσης, το οποίο είναι ενδεικτικό της κυτταροτοξικότητάς της. Είναι, επίσης, αρκετά ευαίσθητη μέθοδος. Αποφασίστηκε στο υπόλοιπο της διπλωματικής να υιοθετηθεί κυρίως η μέθοδος ΧΤΤ ως πιο ευαίσθητη και γρήγορη σε σύγκριση με την ΜΤΤ. Η μέθοδος LDH θα χρησιμοποιηθεί μόνο στην τελικά επιλεγείσα ένωση για να δώσει περισσότερα στοιχεία ως προς το είδος της αναστολής βιωσιμότητας που αυτή προκαλεί.

3.3 Βιολογική αποτίμηση των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων *in vitro*

Για την *in vitro* βιολογική αποτίμηση κυτταροτοξικότητας των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν οι μεθοδολογίες ΜΤΤ ή ΧΤΤ, καθώς θεωρούνται ισοδύναμες, αφού βασίζονται στην ίδια αρχή και μετράνε και οι δύο τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων. Παρακάτω, παρατίθεται το συγκριτικό ως προς τις χημικές ενώσεις διάγραμμα στην καρκινική κυτταρική σειρά WM 164 (δερματικό μελάνωμα), η οποία φέρει τη μετάλλαξη BRAF

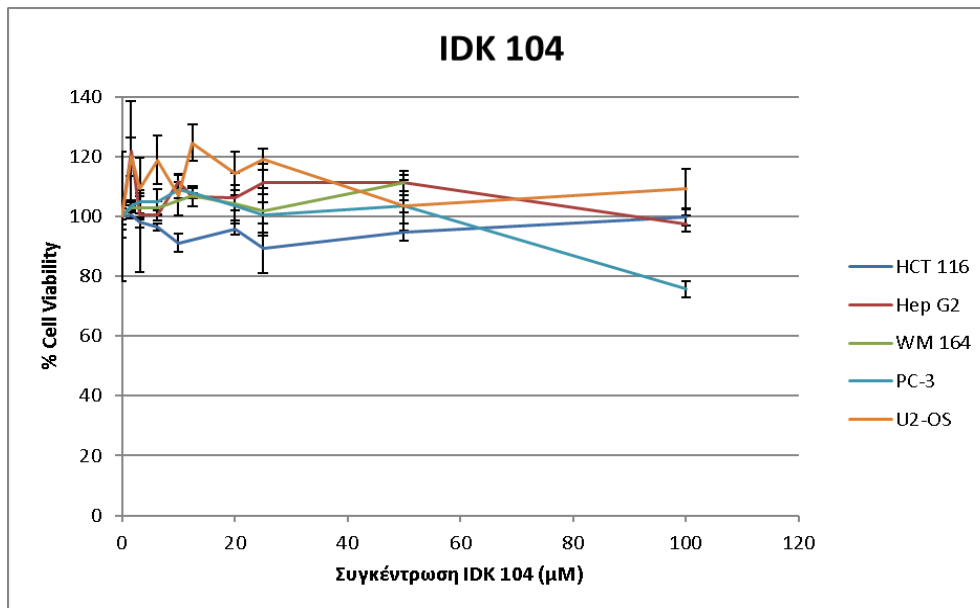
V600E και οι εξεταζόμενες ενώσεις σχεδιάστηκαν ως δυνητικοί αναστολείς της μεταλλαγμένης αυτής κινάσης (Διάγραμμα 3.6).



Διάγραμμα 3.6: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων με χρήση μεθοδολογίας MTT ή XTT στην καρκινική κυτταρική σειρά **WM 164** (Errorbars \pm SD).

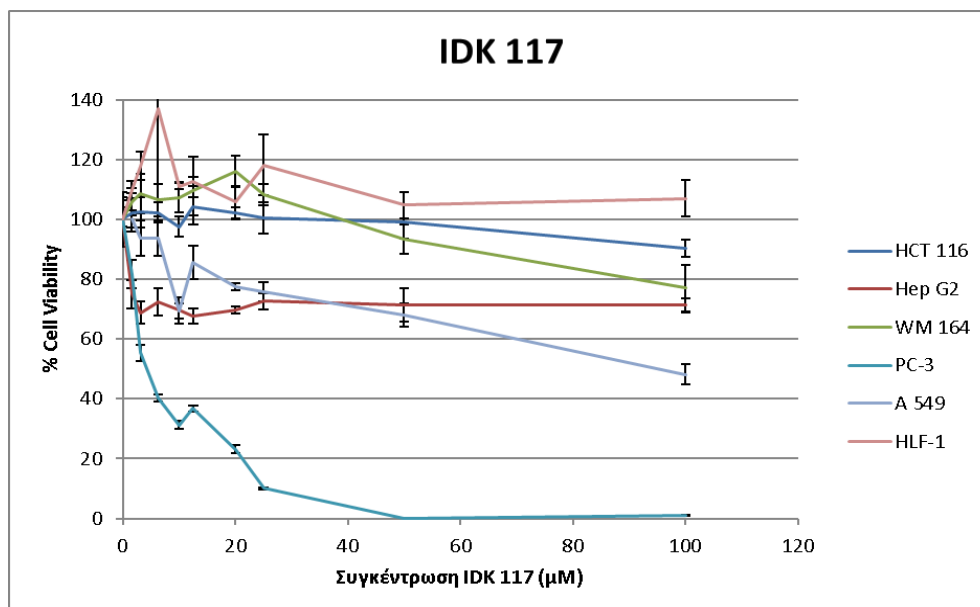
Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, η ένωση IDK 142 κι έπειτα η IDK 132 προκαλούν σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στην κυτταρική σειρά WM 164 (μελάνωμα) σε χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που επιβεβαιώνει τις προβλέψεις των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης. Στη συνέχεια ακολουθούν οι ενώσεις IDK 145, IDK 139 και YYM 303, που προκαλούν σημαντική μείωση αλλά σε μεγαλύτερες μόνο συγκεντρώσεις, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις δεν εμφανίζουν καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέχρι τα 100μM. Οι προβλέψεις των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης για τις υπόλοιπες ενώσεις (δηλαδή εκτός της IDK 142 και της IDK 132) δε συνάδουν με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το διάγραμμα.

Στη συνέχεια, δίνονται τα συγκριτικά ως προς τις κυτταρικές σειρές διαγράμματα ανά χημική ένωση (Διαγράμματα 3.7-3.16).



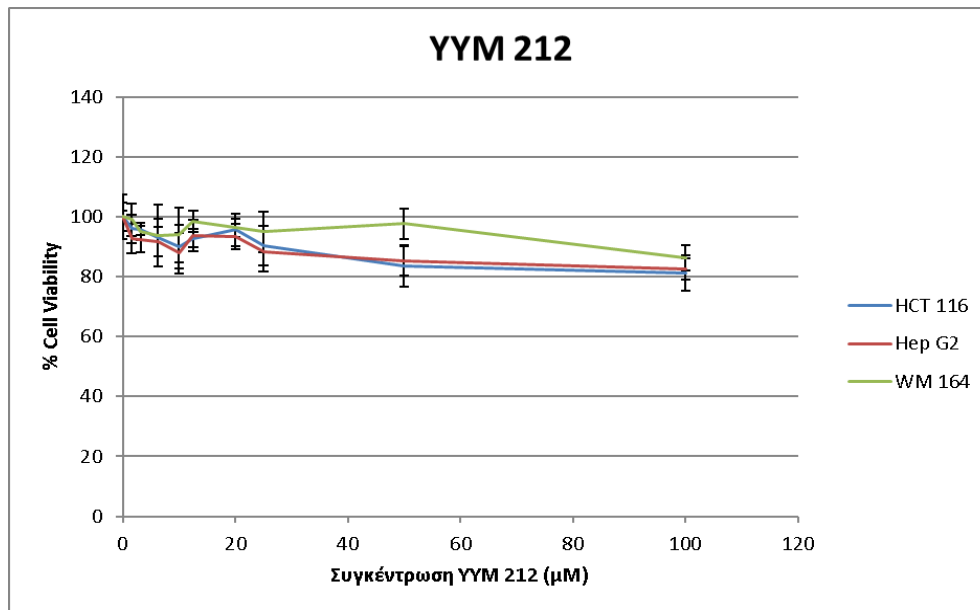
Διάγραμμα 3.7: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ένωσης **IDK 104** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Η ένωση IDK 104 δεν εμφανίζει μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε κανέναν τύπο κυττάρων.



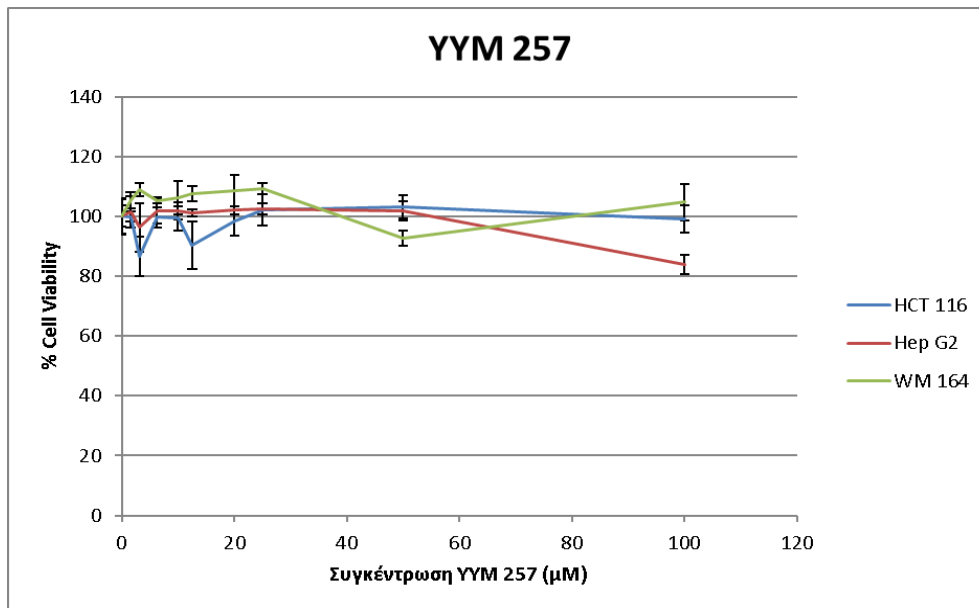
Διάγραμμα 3.8: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ένωσης **IDK 117** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Η ένωση IDK 117 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς προκαλεί σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα του προστάτη ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ στους υπόλοιπους τύπους κυττάρων δεν παρατηρείται καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν εμφανίζει καμία τοξικότητα ούτε στα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα.



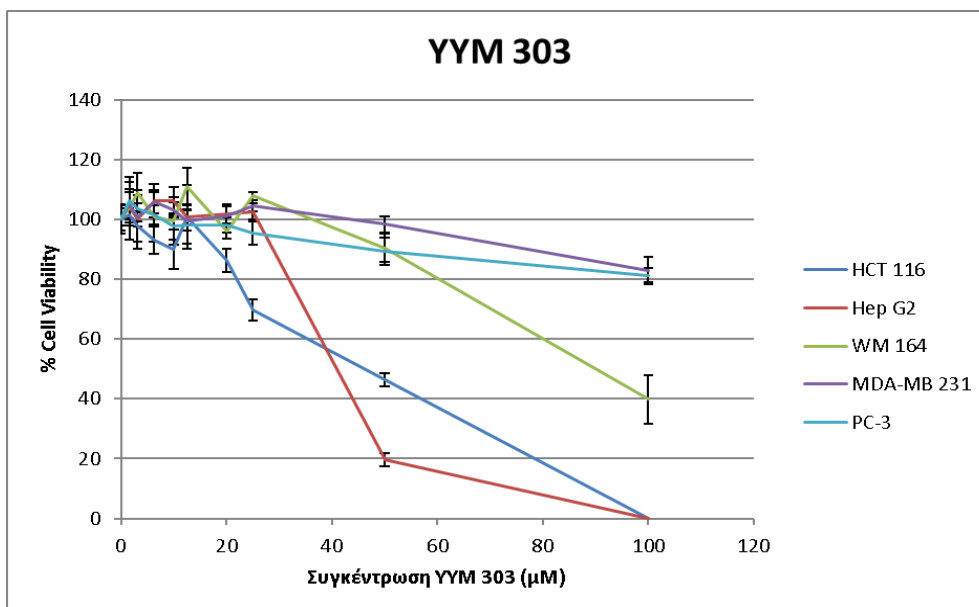
Διάγραμμα 3.9: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ένωσης ΥΥΜ 212 με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Η ένωση ΥΥΜ 212 φαίνεται να είναι μη κυτταροτοξική σε όλους τους τύπους κυττάρων.



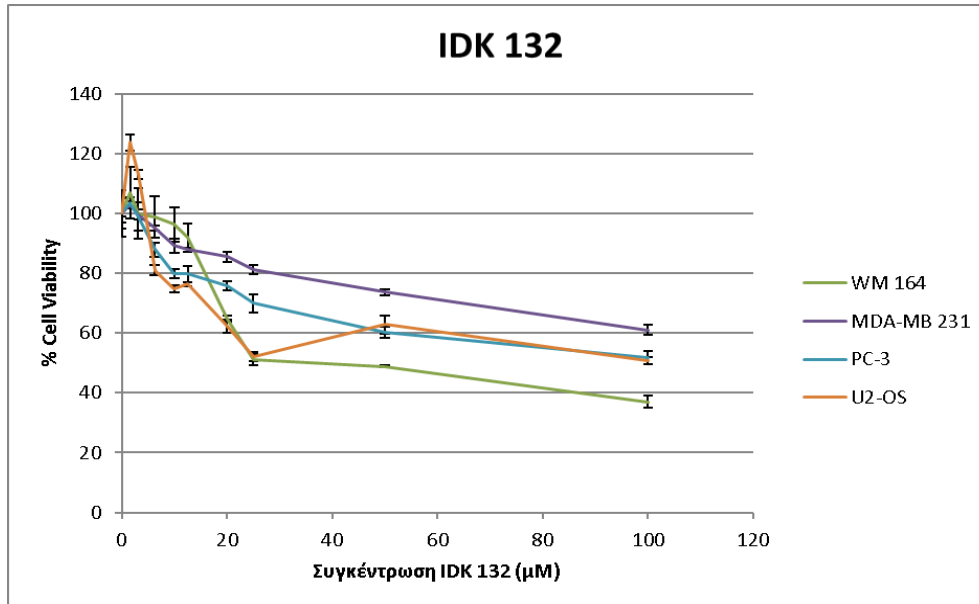
Διάγραμμα 3.10: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ένωσης **ΥΥΜ 257** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή XTT σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars \pm SD).

Η ένωση **ΥΥΜ 257** δεν επηρεάζει καθόλου τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κανέναν τύπο κυττάρων.



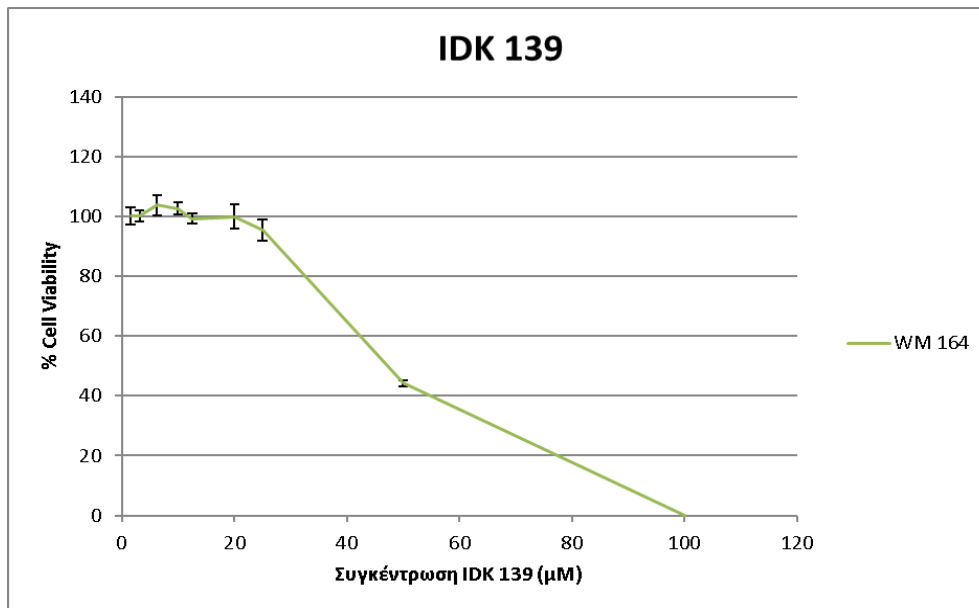
Διάγραμμα 3.11: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ένωσης **ΥΥΜ 303** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή XTT σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars \pm SD).

Η ένωση ΥΥΜ 303 προκαλεί σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα του ήπατος και του παχέος εντέρου σε αρκετά μεγάλες όμως συγκεντρώσεις, μικρότερη μείωση της βιωσιμότητας στα κύτταρα του μελανώματος, ενώ στους υπόλοιπους τύπους κυττάρων δεν παρατηρείται καμία επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



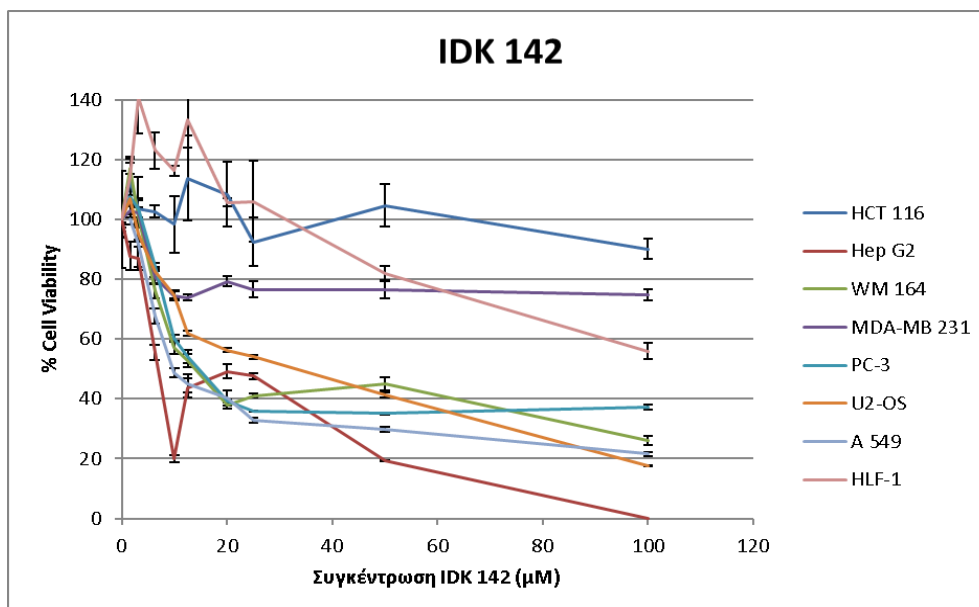
Διάγραμμα 3.12: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ένωσης **IDK 132** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars \pm SD).

Η ένωση IDK 132 προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα του μελανώματος σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



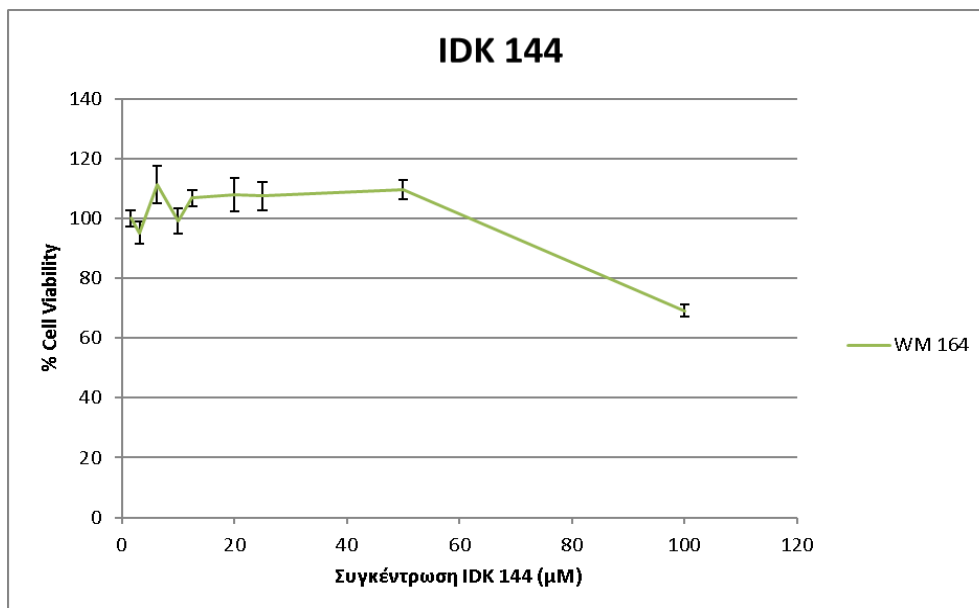
Διάγραμμα 3.13: Η καμπύλη της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ένωσης **IDK 139** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε μία καρκινική κυτταρική σειρά (Errorbars ±SD).

Η ένωση IDK 139 προκαλεί σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα του μελανώματος σε αρκετά μεγάλες όμως συγκεντρώσεις.



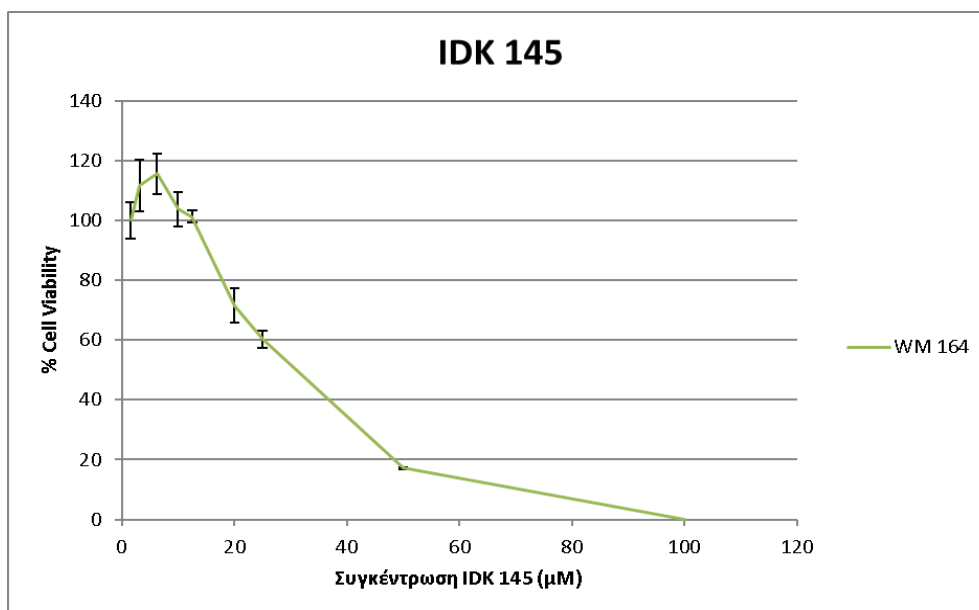
Διάγραμμα 3.14: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μΜ της ένωσης **IDK 142** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών (Errorbars ±SD).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, η ένωση IDK 142 εμφανίζει ένα ενδιαφέρον προφίλ κυτταροτοξικότητας σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ παράλληλα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων του πνεύμονα είναι πολύ μικρός. Πιο ευαίσθητη στην ένωση κυτταρική σειρά είναι η Hep G2, μετά η WM 164, η A 549 και η PC-3, όπου παρατηρείται κυτταροτοξική δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην κυτταρική σειρά U2-OS η ένωση προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ στις MDA-MB 231 και HCT 116 φαίνεται να είναι μη κυτταροτοξική.



Διάγραμμα 3.15: Η καμπύλη της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ένωσης **IDK 144** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε μία καρκινική κυτταρική σειρά (Errorbars \pm SD).

Η ένωση IDK 144 δε μειώνει καθόλου τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα του μελανώματος.



Διάγραμμα 3.16: Η καμπύλη της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100μM της ένωσης **IDK 145** με χρήση μεθοδολογίας MTT ή ΧΤΤ σε μία καρκινική κυτταρική σειρά (Errorbars \pm SD).

Η ένωση IDK 145 προκαλεί μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα κύτταρα του μελανώματος σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις.

Ύστερα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις που προκαλούν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50% (IC_{50}) και παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.4-3.5.

IC ₅₀ (μM)	HCT 116	Hep G2	WM 164	PC-3	MDA-MB 231	U2-OS	A 549	HLF-1
IDK 104	X	X	X	X		X		
IDK 117	X	X	~195,3	5,1			102,6	X
YYM 212	X	X	X					
YYM 257	X	X	X					
YYM 303	44,6	*38,0	~89,2	X	X			
IDK 132			24,9	103,5	213,0	86,2		
IDK 139			47,3					
IDK 142	X	6,0	14,2	15,3	X	26,9	12,6	~114,522
IDK 144			X					
IDK 145			28,6					

Πίνακας 3.4: Οι τιμές IC₅₀ σε μM που αντιστοιχούν σε κάθε χημική ένωση και κυτταρική σειρά, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **probit**. (Όπου X: δεν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα μέχρι τα 100μM, ~: η τιμή προσδιορίστηκε μόνο με 2 σημεία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις και *: η τιμή προσδιορίστηκε γραφικά.)

IC ₅₀ (μM)	HCT 116	Hep G2	WM 164	PC-3	MDA-MB 231	U2-OS	A 549	HLF-1
IDK 104	X	X	X	X		X		
IDK 117	X	X	~141,9	7,2			93,1	X
YYM 212	X	X	X					
YYM 257	X	X	X					
YYM 303	46,3	*38,0	~92,3	X	X			
IDK 132			24,4	91,7	118,7	90,6		
IDK 139			48,2					
IDK 142	X	6,8	11,4	17,1	X	40,2	15,4	~109,2
IDK 144			X					
IDK 145			30,7					

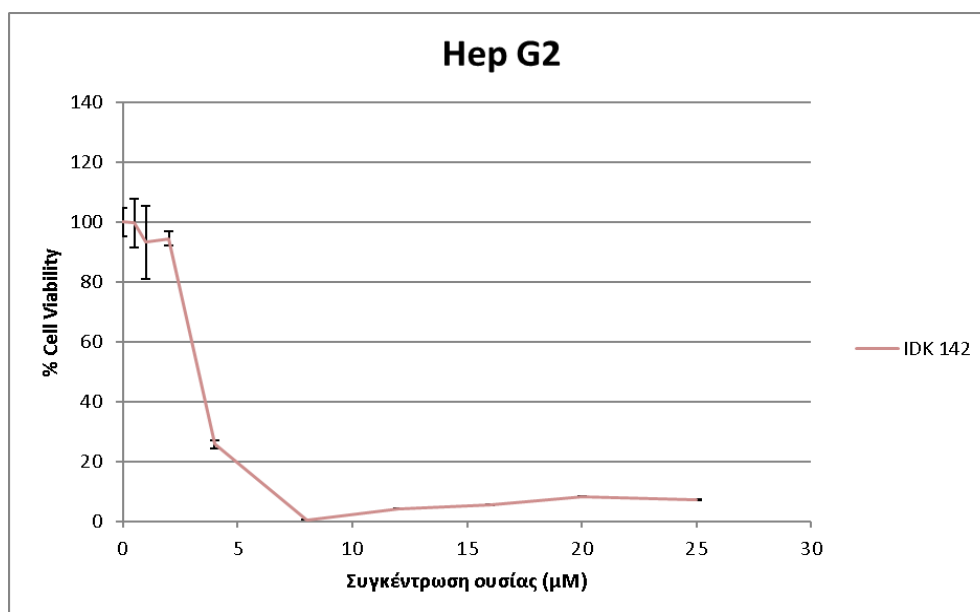
Πίνακας 3.5: Οι τιμές IC₅₀ σε μM που αντιστοιχούν σε κάθε χημική ένωση και κυτταρική σειρά, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **logit**. (Όπου X: δεν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα μέχρι τα 100μM, ~: η τιμή προσδιορίστηκε μόνο με 2 σημεία στις υψηλότερες συγκεντρώσεις και *: η τιμή προσδιορίστηκε γραφικά.)

Όπως προκύπτει από τους Πίνακες 3.4 και 3.5, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βενζοθειαζολικές ενώσεις IDK 142 και IDK 132 αναφορικά με την καρκινική κυτταρική σειρά WM 164, η οποία φέρει τη μετάλλαξη BRAF V600E. Σύμφωνα με τα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης, η IDK 142 έχει λίγο χαμηλότερο docking score και αλληλεπιδρά με ένα κρίσιμο αμινοξύ παραπάνω σε σχέση με την IDK 132. Στα *in vitro* βιολογικά πειράματα, η σύγκριση αυτή αντικατοπτρίζεται με τη μείωση της τιμής IC₅₀ της τάξης του 43-53% της IDK 142 από την IDK 132. Ιδιαίτερη σημασία έχει η σύγκριση των δομών των δύο ενώσεων. Όπως φαίνεται στην ενότητα 2.2, οι δύο ενώσεις έχουν τρεις δομικές διαφορές: την αντιμετάθεση

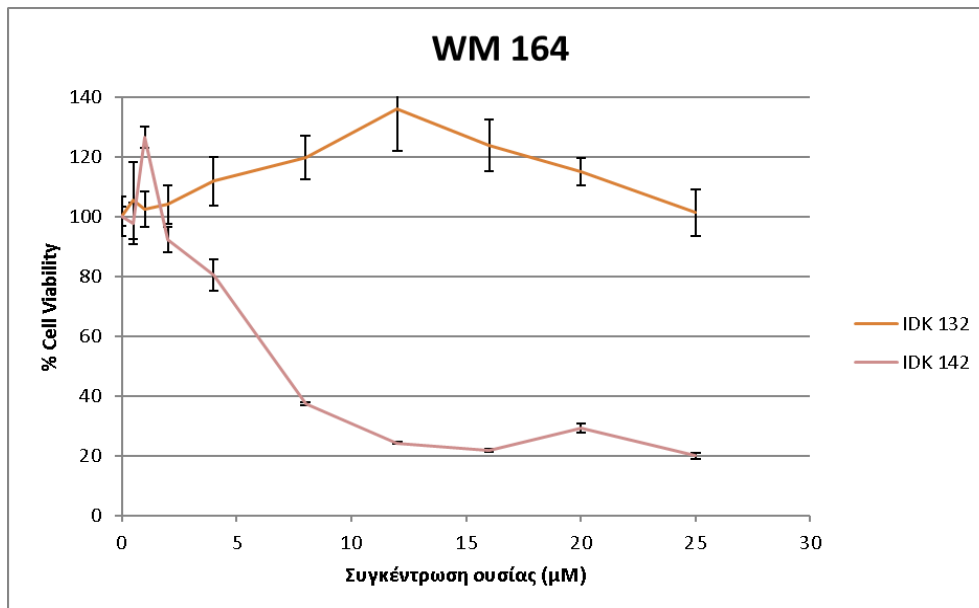
της σουλφοναμιδικής ομάδας, την αντικατάσταση της φαινυλικής από μία αυθυλική ομάδα και την προσθήκη μίας κυκλοπρόπυλο-ομάδας στην άκρη του μορίου της IDK 142.

Επιπρόσθετα, εντύπωση προκαλεί η βενζοαμιδική ένωση IDK 117, η οποία δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα σε κανέναν τύπο κυττάρων, ούτε στα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα, εκτός από τα κύτταρα του προστάτη και μάλιστα με ιδιαίτερα χαμηλή τιμή IC_{50} . Στην κυτταρική σειρά PC-3 χαμηλή τιμή παρουσίασε επίσης η βενζοθειαζολική ένωση IDK 142, η οποία δεν έχει καμία δομική ομοιότητα με την IDK 117.

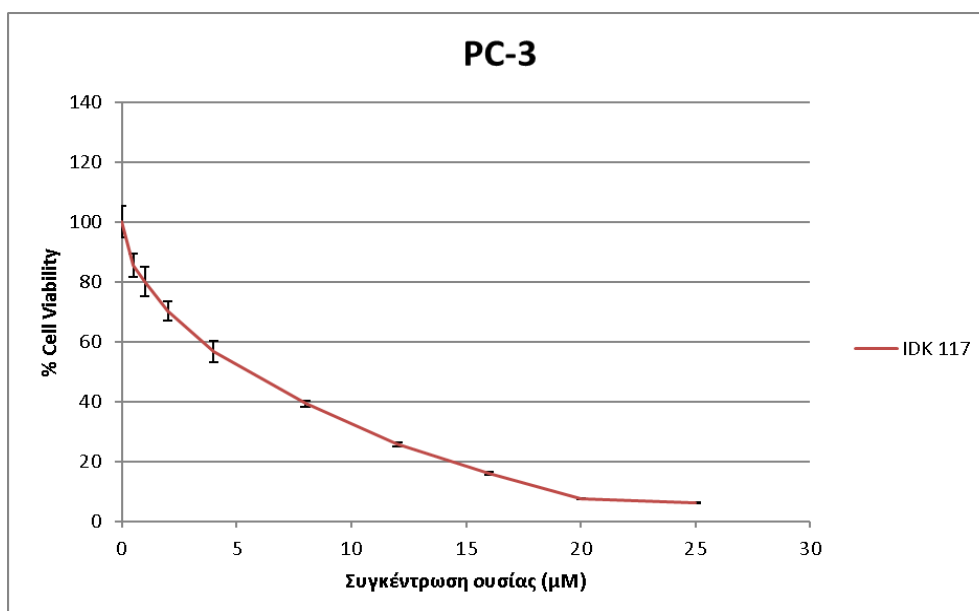
Στο τέλος, επιλέχθηκαν οι ενώσεις και οι κυτταρικές σειρές όπου παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση της % κυτταρικής βιωσιμότητας και δοκιμάστηκαν με τις μεθόδους ΧΤΤ και LDH σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις με σκοπό τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} με μεγαλύτερη ακρίβεια, καθώς και της τιμής LC_{50} . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3.17-3.20 και τους Πίνακες 3.6-3.7.



Διάγραμμα 3.17: Η καμπύλη της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25μM της χημικής ένωσης IDK 142 με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ στην καρκινική κυτταρική σειρά **Hep G2** (Errorbars \pm SD).



Διάγραμμα 3.18: Οι καμπύλες της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25μM των χημικών ενώσεων IDK 132 και IDK 142 με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ στην καρκινική κυτταρική σειρά **WM 164** (Errorbars \pm SD).



Διάγραμμα 3.19: Η καμπύλη της % κυτταρικής βιωσιμότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 25μM της χημικής ένωσης IDK 117 με χρήση μεθοδολογίας ΧΤΤ στην καρκινική κυτταρική σειρά **PC-3** (Errorbars \pm SD).

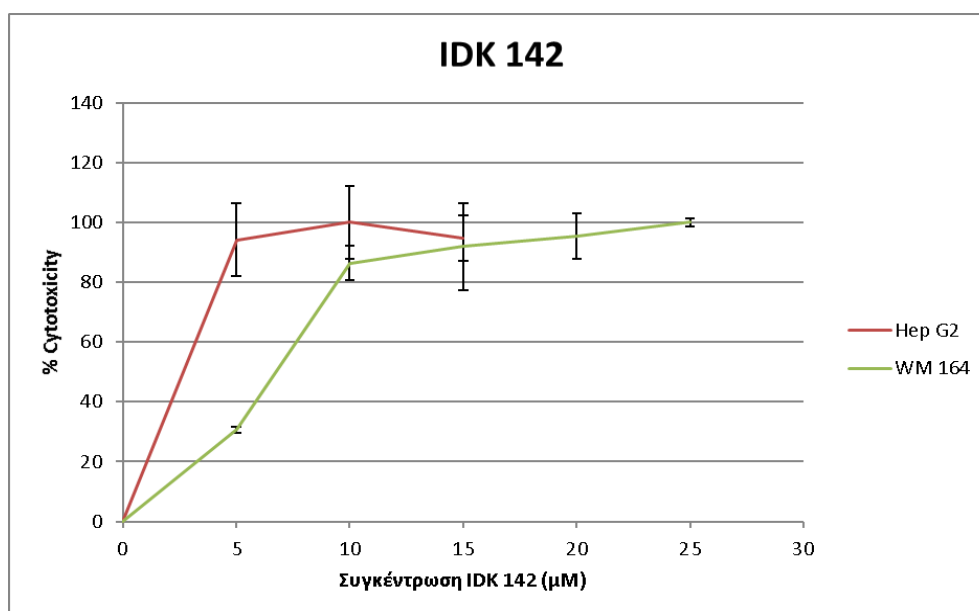
Όπως προκύπτει από τα διαγράμματα, η ένωση IDK 142 εμφανίζει κυτταροτοξική δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις τόσο στην κυτταρική σειρά Hep G2, όσο και στην WM 164,

όπως επίσης η IDK 117 στην PC-3. Η ένωση IDK 132 δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, για το λόγο αυτό χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, καθώς οι μετρήσεις δεν ήταν επαναλήψιμες.

IC ₅₀ (μM)	Hep G2	WM 164	PC-3	IC ₅₀ (μM)	Hep G2	WM 164	PC-3
IDK 117			3,8 (5,1)	IDK 117			7,1 (7,2)
IDK 132		X (24,9)		IDK 132		X (24,4)	
IDK 142	3,3 (6,0)	6,8 (14,2)		IDK 142	3,8 (6,8)	8,0 (11,4)	

Πίνακας 3.6 και 3.7: Οι τιμές IC₅₀ σε μM που αντιστοιχούν σε κάθε χημική ένωση και κυτταρική σειρά, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **probit** (αριστερά) και **logit** (δεξιά) με τη μέθοδο ΧΤΤ. Στις παρενθέσεις παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές από τους Πίνακες 3.4 και 3.5 για λόγους σύγκρισης. (Όπου X: δεν εμφανίζεται κυτταροτοξικότητα μέχρι τα 25μM.)

Στους Πίνακες 3.6 και 3.7 παρουσιάζονται οι ακριβείς τιμές IC₅₀, όπως προέκυψαν από την επανάληψη του πειράματος σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι τιμές των ενώσεων IDK 117 και IDK 142 εμφανίζονται ελαφρώς χαμηλότερες, ενώ της IDK 132 δεν προσδιορίστηκε.



Διάγραμμα 3.20: Η καμπύλη της % κυτταροτοξικότητας σε συγκεντρώσεις από 0 έως 15μM και από 0 έως 25μM της χημικής ένωσης **IDK 142** με χρήση μεθοδολογίας LDH στις καρκινικές κυτταρικές σειρές **Hep G2** και **WM 164**, αντίστοιχα (Errorbars ±SD).

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι η ένωση IDK 142 αυξάνει την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα του ήπατος σε λίγο χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα κύτταρα του μελανώματος. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται παραπλήσια με το ίδιο πείραμα που διεξήχθη με τη μέθοδο ΧΤΤ, όπως φαίνεται στους Πίνακες 3.6, 3.7, 3.8 και 3.9, παρ' όλο που οι μετρούμενες παράμετροι διαφοροποιούνται στις δύο μεθόδους. Αυτό δείχνει πως η ένωση δρα κυτταροτοξικά στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές και όχι αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

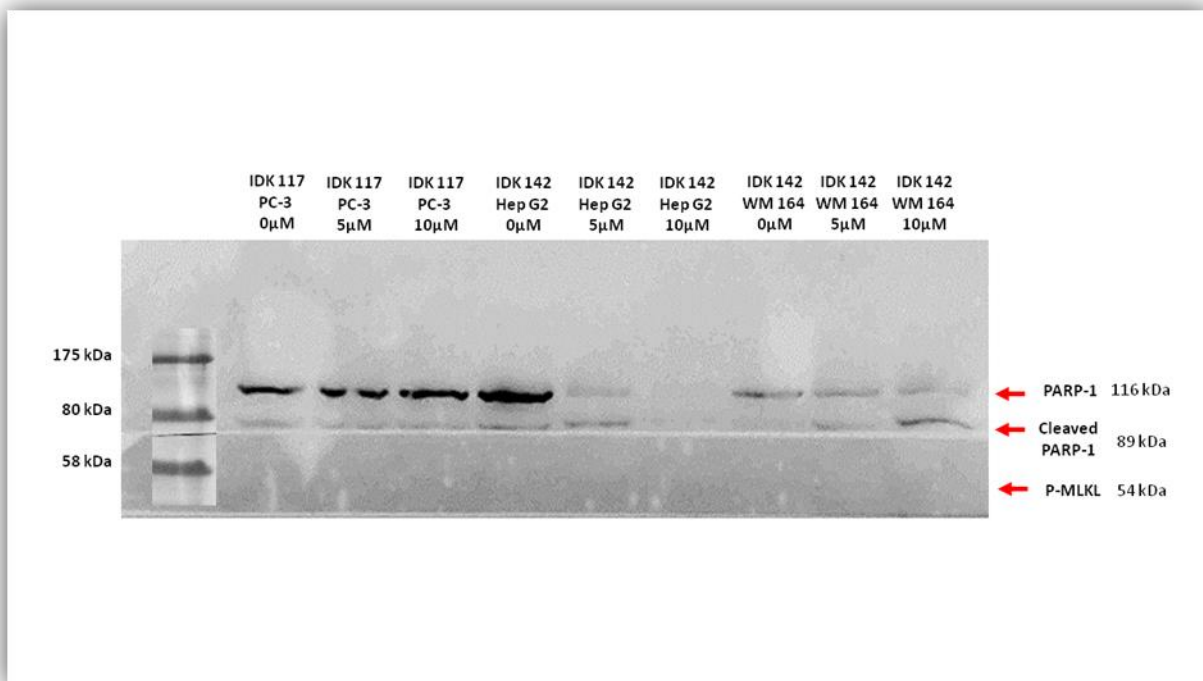
LC ₅₀ (μΜ)	Hep G2	WM 164	LC ₅₀ (μΜ)	Hep G2	WM 164
IDK 142	*2,8	6,2	IDK 142	*2,8	6,5

Πίνακας 3.8 και 3.9: Οι τιμές LC₅₀ σε μΜ που αντιστοιχούν στην χημική ένωση IDK 142 και στις κυτταρικές σειρές Hep G2 και WM 164, που υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο **probit** (αριστερά) και **logit** (δεξιά) με τη μέθοδο LDH. (Όπου *: η τιμή προσδιορίστηκε γραφικά.)

3.4 Προσδιορισμός μηχανισμού κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά WESTERN

Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος σε επίπεδο πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ώστε να διερευνηθεί ο μηχανισμός που εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο που προκαλεί η ένωση IDK 117 στην κυτταρική σειρά PC-3 και η IDK 142 στις κυτταρικές σειρές Hep G2 και WM 164.

Η πυρηνική πρωτεΐνη πολυμεράση της πολυ(ADP-ριβόζης) 1 (PARP-1, 116kDa) εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες, με κυριότερη την επιδιόρθωση του DNA και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα. Η ειδική πρωτεόλυση της PARP-1 προς ένα θραύσμα 89kDa μέσω ενεργότητας κασπάσης σχετίζεται με την ενεργοποίηση του αποπτωτικού θανάτου και έτσι αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη απόπτωσης. Η κινάση MLKL ενεργοποιείται (φωσφορυλιώνεται) από την ενεργή κινάση RIPK3 κατά τη διαδικασία της νεκρόπτωσης. Επομένως, η φωσφορυλιωμένη MLKL αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη νεκρόπτωσης. Η β-ακτίνη έδωσε σήμα σε όλα τα δείγματα, που υποδηλώνει την ύπαρξη πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα.



Εικόνα 3.17: Ανοσοαποτύπωση σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων PC-3 με τα αντισώματα anti-PARP-1 και anti-P-MLKL ύστερα από αγωγή με την ένωση IDK 117 και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων Hep G2 και WM 164 με τα ίδια αντισώματα ύστερα από αγωγή με την ένωση IDK 142 σε συγκεντρώσεις 0μM, 5μM και 10μM για 72 ώρες.

Στην ανοσοαποτύπωση φαίνεται ότι η ένωση IDK 117 και η IDK 142 δεν επάγουν ούτε αποπτωτικό, ούτε νεκροπρωτικό κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα του προστάτη και του ήπατος αντίστοιχα, αφού η PARP-1 παραμένει ακέραιη (116kDa) και δεν εμφανίζεται καθόλου η P-MLKL. Συγκεκριμένα, η IDK 142 στα κύτταρα του ήπατος σε συγκέντρωση 10μM έχει προκαλέσει ολική απώλεια της πρωτεΐνης, συνεπώς επάγει νέκρωση.

Ωστόσο, στην ένωση IDK 142 στα κύτταρα του μελανώματος σε συγκέντρωση 5μM και 10μM εμφανίζεται το θραύσμα της PARP-1 (89kDa), που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη έχει πρωτεολυθεί από τις ενεργοποιημένες κασπάσες κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι σε συγκέντρωση 5μM της ένωσης η ακέραιη PARP-1 και το θραύσμα της είναι σχεδόν ισόποσα, ενώ σε συγκέντρωση 10μM το ποσοστό του θραύσματος είναι μεγαλύτερο. Συμπερασματικά, ο κυτταρικός τύπος καθορίζει σε σημαντικό βαθμό το μηχανισμό κυτταρικού θανάτου που επάγεται από μία δραστική χημική ένωση.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

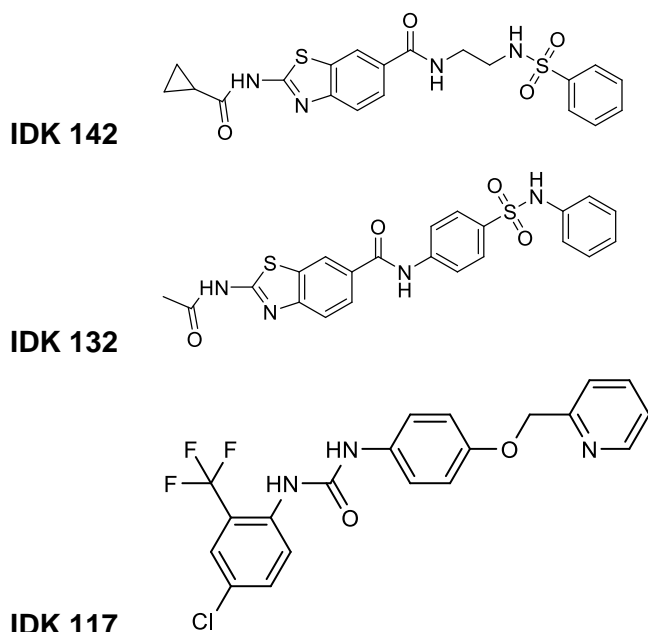
Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του αναπτυξιακού ερευνητικού έργου ΣΘΕΝΟΣ-β (2017-2020), Στοχευμένες Θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά εκφυλιστικών ΝΟ-Σημάτων, με έμφαση τον καρκίνο και τη γήρανση-Βελτιστοποίηση των στοχοθετημένων βιοδραστικών ενώσεων, που υλοποιεί το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Στόχος του προγράμματος είναι ο ορθολογικός σχεδιασμός, η σύνθεση και η αποτίμηση νέων βιοδραστικών ενώσεων με αντικαρκινικές και αντιγηραντικές ιδιότητες. Για την ανάπτυξη των νέων ενώσεων εφαρμόζεται μία ολοκληρωμένη προσέγγιση και ένας συνεργιστικός συνδυασμός υπολογιστικής χημείας, συνθετικής φαρμακευτικής χημείας, πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ και βιολογικής αποτίμησης σε πρότυπες κυτταρικές σειρές και ζωικά μοντέλα καρκίνου και γήρανσης. Ο μακροπρόθεσμος σκοπός του έργου είναι η ανάπτυξη εξειδικευμένων θεραπευτικών και χημειοπροστατευτικών προσεγγίσεων κατά εκφυλιστικών νοσημάτων.

Η παραδοσιακή χημειοθεραπεία προσπαθεί να θανατώσει τα καρκινικά κύτταρα βασιζόμενη στην ιδιότητά τους να πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό. Η προσέγγιση αυτή έχει πολλές παρενέργειες, επειδή βλάπτει εξίσου τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα φυσιολογικά κύτταρα. Η τοξικότητα και η ανθεκτικότητα στα παραδοσιακά χημειοθεραπευτικά φάρμακα καθιστά επείγουσα την ανάπτυξη νέων στόχων και νέων φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Η στοχευμένη θεραπεία αποσκοπεί στη χορήγηση παραγόντων (κυρίως μικρών μορίων και κυκλικών πεπτιδίων) που παρεμποδίζουν τη δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη όγκων. Επίσης, η στοχευμένη θεραπεία προσφέρει μεγάλη αποτελεσματικότητα και μείωση του κόστους εισαγωγής των φαρμάκων στην αγορά.

Τα βενζοθειαζολικά και αμιδικά παράγωγα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εμφανίζουν ένα εύρος φαρμακολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντι-υπερτασικές και αντιοξειδωτικές δράσεις. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία σχεδιάστηκαν ως δυνητικοί αναστολείς της κινάσης BRAF V600E και συντέθηκαν έπειτα από μελέτες μοριακής πρόσδεσης μέσω προγραμμάτων υπολογιστικής χημείας. Η *in vitro* βιολογική αποτίμηση των εξεταζόμενων ενώσεων στο μελάνωμα επιβεβαίωσε εν μέρει τις προβλέψεις των πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης, καθώς οι ενώσεις IDK 142 και IDK 132 (Εικόνα 4.1) διαπιστώθηκε πως έχουν μεγαλύτερη ικανότητα αναστο-

λής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τις υπόλοιπες και μάλιστα σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Οι ενώσεις με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, δηλαδή αυτές που ανέστειλαν την κυτταρική βιωσιμότητα στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ήταν η IDK 142 στα κύτταρα του ήπατος (Hep G2) και του μελανώματος (WM 164) και η IDK 117 στα κύτταρα του προστάτη (PC-3) (Εικόνα 4.1). Στο τέλος αυτές εξετάστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις τόσο με τη μέθοδο ΧΤΤ, που μετρά μεταβολική ενεργότητα, όσο και με τη μέθοδο LDH, που μετρά απ' ευθείας κυτταροτοξικότητα. Τα αποτελέσματα και από τις δύο μεθόδους είναι σε συμφωνία. Παράλληλα, δεν έδειξαν καμία τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα, που αποτελεί μία ένδειξη εκλεκτικότητας των ενώσεων έναντι καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, εντύπωση προκαλεί η ένωση IDK 117, η οποία δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα σε κανέναν τύπο κυττάρων, εκτός από τα κύτταρα του προστάτη και μάλιστα με ιδιαίτερα χαμηλή τιμή IC₅₀, γεγονός που δείχνει μία εξειδίκευση στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Αυτό σημαίνει πως η επίδραση ορισμένων ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα εξαρτάται από το γονότυπο του κυτταρικού τύπου και υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού δράσης ανά κυτταρικό τύπο.



Εικόνα 4.1: Οι χημικές δομές των εξεταζόμενων βενζοθειαζολικών και αμιδικών παραγώγων.


Τα αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης αυτών των ενώσεων θα δώσουν χρήσιμες πληροφορίες στους χημικούς, ώστε να κάνουν μία σειρά δομικών τροποποιήσεων, με στόχο τη βελτίωση της ισχύος/δραστικότητας του εν δυνάμει φαρμάκου και τη βελτιστοποίηση των «drug-like» ιδιοτήτων, διατηρώντας παράλληλα την «on target» αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. Σκοπός είναι η σύνθεση αναλόγων με βελτιωμένες φαρμακολογικές ιδιότητες, που θα οδηγήσει σε μικρό αριθμό επιλεγμένων ενώσεων-οδηγών (nM δραστικότητα), οι οποίες θα αξιολογηθούν περαιτέρω *in vivo* σε κατάλληλα ζωικά μοντέλα.

Τέλος, θα είχε ενδιαφέρον να διευκρινιστεί ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο δρουν οι εξεταζόμενες ενώσεις και τα κρίσιμα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτόν, τα οποία είναι διαφορετικά σε κάθε κυτταρικό τύπο. Έγιναν προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου των ενώσεων IDK 117 και IDK 142 και βρέθηκε ότι η τελευταία στα κύτταρα WM 164 επάγει αποπτωτικό θάνατο. Σε επόμενο βήμα, θα μπορούσε να επαναληφθεί η ανοσοαποτύπωση κατά Western με πιο προσεκτικούς χειρισμούς, σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων της ουσίας και σε διαφορετικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και αργότερα, να διερευνηθεί περαιτέρω ο μοριακός μηχανισμός δράσης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η χρήση ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάπτυξη ενός *in vitro* αντικαρκινικού μοντέλου διαλογής, που στοχεύει στη μελέτη της δράσης διαφόρων κυτταροτοξικών και πιθανά αντικαρκινικών παραγόντων και των μοριακών μονοπατιών που επηρεάζονται από ένα πιθανό νέο φάρμακο. Επίσης, οι *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές είναι ένα σημαντικό εργαλείο για το σχεδιασμό μελλοντικών *in vivo* μελετών, καθώς και για την πρόβλεψη του κλινικού αποτελέσματος στον άνθρωπο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✚ John Double, Neal D Barnard, (2002) Toxicity testing in the development of anti-cancer drugs. *The Lancet Oncology*, 3, 438-442.
- ✚ Abdul Rouf, Cihangir Tanyeli, (2015) Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 911-927.
- ✚ Bhattacharya S1, Chatterjee S, Manna P, Das J, Ghosh J, Gachhui R, Sil PC, (2011) Prophylactic role of D-Saccharic acid-1,4-lactone in tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death of murine hepatocytes via mitochondria-dependent pathways. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25, 341-354.
- ✚ Mohammad Asif, (2016) Pharmacological Potential of Benzamide Analogues and their Uses in Medicinal Chemistry. *Modern Chemistry & Applications*, 4: 194.
- ✚ Overview on the Chemistry of Benzamide and its derivatives.
https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/101063/10/10_chapter%201.pdf
- ✚ Jamshed Iqbal, Syeda Abida Ejaza, Aamer Saeed, Mariya al-Rashida, (2018) Detailed investigation of anticancer activity of sulfamoyl benz(sulfon) amides and 1H-pyrazol-4-yl benzamides: An experimental and computational study. *European Journal of Pharmacology*, 832, 11-24.
- ✚ Bogos Agianian, Evripidis Gavathiotis, (2018) Current Insights of BRAF Inhibitors in Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 5775-5793.
- ✚ Niles AL1, Moravec RA, Riss TL, (2008) Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3, 655-69.
- ✚ Kanduc D1, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E, (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, 21, 165-70.
- ✚ Yogesh K. Dhuriya, Divakar Sharma, (2018) Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15:199.
- ✚ Διπλωματική Εργασία, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Νικόλαος Γεωργακόπουλος, (2018) “Νανοδιασπορές ως μέσα μεταφοράς βιοδραστικών ενώσεων. Εφαρμογές στην αντικαρκινική θεραπεία”.
- ✚ Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ευτυχία Κρίση, (2017) “Υπολογιστικά εργαλεία για την αναζήτηση νέων βιοδραστικών ενώσεων σε επιλεγμένους πρωτεϊνικούς στόχους”.

 Ιστοσελίδες:

https://www.diffen.com/difference/Apoptosis_vs_Necrosis

<https://web.expasy.org/cellosaurus/>

<https://en.wikipedia.org/wiki/IC50>

https://en.wikipedia.org/wiki/Median_lethal_dose

<https://en.wikipedia.org/wiki/Logit>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Probit>

[https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%AD%CE%BB%CE%BF_%CE%A0%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1%CF%82_\(Probit\)](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%AD%CE%BB%CE%BF_%CE%A0%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%AC%CE%B4%CE%B1%CF%82_(Probit))