



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης επιλεκτικών ρυθμιστών  
του υποδοχέα των οιστρογόνων**

**Evaluation of antitumor activity of selective modulators of  
estrogen receptors**

**Επιμέλεια εργασίας:** Αγγελοπούλου Αγγελική  
**Επιβλέποντες Καθηγητές:** Αλέξης Μιχαήλ  
Λεωνίδας Δημήτρης

**ΑΘΗΝΑ 2013**

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

Υπεύθυνοι Καθηγητές

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

Λεωνίδας Δημήτρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

Τριμελής επιτροπή

Αλέξης Μιχαήλ, Ερευνητής Α΄ στο ΕΙΕ

Λεωνίδας Δημήτρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, ΠΘ

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

Στη μητέρα μου, ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης και αγάπης

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u> .....	6
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u> .....	7
<u>ABSTRACT</u> .....	8
<b>I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	9
1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	9
1.2 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	9
1.3 ΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	11
1.3.1. Η δομή του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου άλφα και οι ισομορφές του...14	
1.3.2. Η δομή του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου βήτα και οι ισομορφές του.....	14
1.4 ΠΡΟΣΔΕΜΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	15
1.5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	19
1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	20
1.7 ΝΕΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΡΑΛΟΞΙΦΑΙΝΗΣ.....	24
2.0 ΣΚΟΠΟΣ.....	26
<b>II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	27
<b>1.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	27
1.1 ΥΛΙΚΑ.....	27
1.1.1 Υλικά.....	27
1.1.2 Πλασμίδια.....	28
1.1.3 Κυτταρικές σειρές.....	28
1.1.4 Αποστείρωση.....	29
<b>1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	29
1.2.1 Χειρισμοί κυττάρων.....	29
<b>1.2.1.1 Διαδικασίες για την καλλιέργεια κυττάρων</b> .....	29
Α. Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με τρυψίνη.....	30
<b>1.2.1.2 Προετοιμασία των ενώσεων</b> .....	30
<b>1.2.1.3 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού</b> .....	31
<b>1.2.1.4 Προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης</b> .....	31
<b>1.2.1.5 Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa</b> .....	32
<b>1.2.1.6 Προσδιορισμός του αριθμού ζώντων και νεκρών κυττάρων με χρώση μικροσκοπίου</b> .....	33

1.2.1.7 Μέτρηση της σχετικής χημικής συγγένειας πρόσδεσης στους ERα και ERβ1 με χρήση πολωσιμετρίας φθορισμού.....	33
1.2.1.8 Στατιστική ανάλυση.....	34
<b>2.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>34</b>
2.1 Σχετική χημική συγγένεια πρόσδεσης στους ERα και ERβ1.....	34
2.2 Επαγωγή ενός ERE-ελεγχόμενου γονιδίου αναφοράς.....	35
2.3 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	41
2.4 Επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa.....	43
<b>3.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>60</b>
<b>4.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>62</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτρη Λεωνίδα, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για την προτροπή, καθοδήγηση και στήριξη καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Θερμά επίσης ευχαριστώ, την επίκουρη καθηγήτρια κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την πολύτιμη συμβολή της στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ τις συνεργάτιδες του ΕΜΕ-ΙΒΦΧΒ, Δρ Μαρία Πούλου και Δρ. Αγγελική Μελίγκοβα για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια τους στην εκπόνηση των πειραμάτων μου. Ήταν πάντα δίπλα μου και με βοήθησαν να εξοικειωθώ με το χώρο και τις τεχνικές του εργαστηρίου και τις ευχαριστώ ιδιαίτερωσ γι'αυτό.

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

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία αυτή αποσκοπεί στο να αξιολογήσει την αντιοιστρογονική-αντικαρκινική δράση σειράς νέων αναλόγων της ραλοξιφαίνης χρησιμοποιώντας τέσσερις κυτταρικές σειρές: 1) MCF-7:D5L, για αξιολόγηση της αντιοιστρογονικής δράσης μέσω του άλφα υποδοχέα οιστρογόνων (ERα), 2) HEK:ERβ1, για αξιολόγηση της αντιοιστρογονικής δράσης μέσω του ERβ, 3) MCF-7, για αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης στα επιθηλιακά κύτταρα μαστού και, 4) Ishikawa, για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης στα επιθηλιακά κύτταρα μήτρας. Αρχικά προσδιορίστηκε η χημική συγγένεια πρόσδεσης των αναλόγων στους απομονωμένους ERα και ERβ, όπου όλες οι προς εξέταση ενώσεις εμφάνισαν ισχυρότερη πρόσδεση στον ERα από ότι στον ERβ. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα (IC50, potency) και η αποτελεσματικότητα (efficacy) των αναλόγων να καταστέλλουν την επαγωγή από την οιστραδιόλη, σε προ- και μετά-εμμηνοπαυσιακή συγκέντρωση, 1 και 0,1 nM, αντίστοιχα, 1) της γονιδιακής έκφρασης μέσω ERα και ERβ, 2) του πολλαπλασιασμού των κυττάρων MCF-7 και, 3) της οιστρογονικής δράσης στα κύτταρα Ishikawa. Βρέθηκε ότι τα ανάλογα GL285 και GL287 λειτουργούν ως πλήρεις ανταγωνιστές με ικανότητα και αποτελεσματικότητα ανάλογη της ραλοξιφαίνης σε όλα τα κύτταρα, ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης, γεγονός που υποδεικνύει ότι θα μπορούσαν να μιμηθούν τη δράση της ραλοξιφαίνης στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού τόσο πριν όσο και μετά την εμμηνόπαυση. Βρέθηκε επίσης ότι τα ανάλογα GL285 και GL287 παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντικαρκινική ικανότητα από τη ραλοξιφαίνη στα κύτταρα MCF-7. Από τις σχέσεις δομής και δράσης φαίνεται ότι η αυξημένη αντικαρκινική ικανότητα των GL285 & GL287 συσχετίζεται με αυξημένη αντιοιστρογονική δράση μέσω του ERα ως αποτέλεσμα της αύξησης του όγκου του τελικού τμήματος της πλευρικής αλυσίδας των αναλόγων.

## ABSTRACT

This study aims at evaluating the antioestrogenic-antitumor activity of a series of new analogues of raloxifene using four cell lines: 1) MCF-7:D5L, for evaluating antiestrogenic activity through the alpha subtype of estrogen receptor (ER $\alpha$ ), 2) HEK:ER $\beta$ 1, for evaluating antiestrogenic activity through ER $\beta$ , 3) MCF-7, for evaluating anticancer activity against mammary epithelial cells and, 4) Ishikawa, for evaluating anticancer activity against uterine epithelial cells. Initially, we evaluated the affinity of analogues for binding to isolated ER $\alpha$  and ER $\beta$ , where all the tested compounds displayed higher affinity of binding to ER $\alpha$  compared to ER $\beta$ . Next, we examined the potency (IC<sub>50</sub>) and efficacy of the analogues to suppress the induction by estradiol at pro- and post-menopausal concentration, 1 and 0,1 nM, respectively of, 1) gene expression via ER $\alpha$  and ER $\beta$ , 2) proliferation of MCF-7 cells and, 3) alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells. We found that analogues GL285 and GL287 act as full antagonists in all cell lines with efficacy and potency analogous to raloxifene, independently of estradiol concentration, indicating that they could emulate the actions of raloxifene to prevent breast cancer before and after menopause. We also found that GL285 and GL287 display higher anticancer activity than raloxifene in MCF-7 cells. From structure activity relationships it appears that the higher anticancer activity of GL285 and GL287 relates to their higher antiestrogenic activity through ER $\alpha$  as the result of an increase in the bulkiness at the end of the side chain of the analogues.



## I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο σποραδικός καρκίνος του μαστού είναι μία από τις συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο στο Δυτικό κόσμο. Παρά τα θεαματικά επιτεύγματα των επιστημών της Βιολογίας και της Ιατρικής, ο κίνδυνος να νοσήσει κάποιος από καρκίνο του μαστού συνεχίζει να αυξάνεται με ρυθμό 1% κάθε χρόνο, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό του ετήσιου ρυθμού κρουσμάτων τα τελευταία 50 χρόνια και την αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας που σχετίζονται με τη νόσο. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και διαιτητικές συνθήκες αποδεδειγμένα έχουν έντονη επίδραση στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού (Hanf, 2005 – Jaga, 2005 – Tsubura, 2005) όμως ελάχιστα είναι γνωστά σε σχέση με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου.

#### 1.2 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

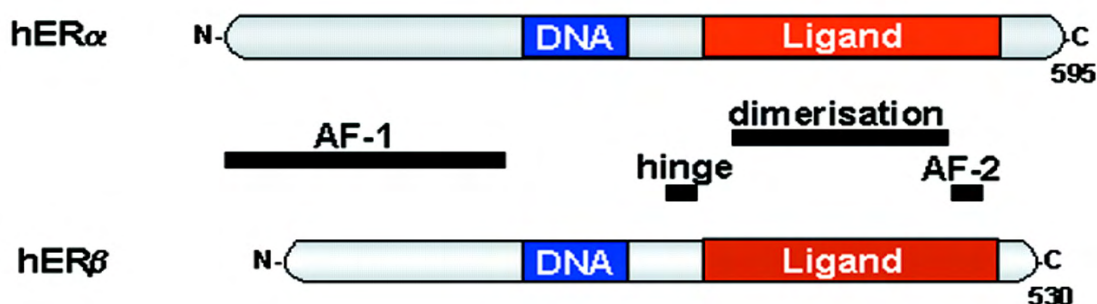
Τα οιστρογόνα είναι μια ομάδα στεροειδών ενώσεων οι οποίες λειτουργούν ως πρωτογενείς ορμόνες καθορισμού του φύλου στο θήλυ. Τα οιστρογόνα είναι παρόντα σε άνδρες και γυναίκες, τα επίπεδά τους όμως είναι σημαντικά υψηλότερα στις γυναίκες όταν βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία. Παράγονται κυρίως στις ωοθήκες και επίσης μετά από μεταβολισμό στεροειδών που παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων. Η 17β-οιστραδιόλη (οιστραδιόλη, E2) είναι το κύριο οιστρογόνο και παράγεται από τεστοστερόνη με τη βοήθεια του ενζυμικού συστήματος του κυτοχρώματος P450. Η οιστραδιόλη συντίθεται κυρίως στις ωοθήκες των γυναικών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αλλά και στο λιπώδη ιστό, εγκέφαλο, οστικά κύτταρα, μαστικό ιστό και κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου στις μετα-εμμηνόπαυσιακές γυναίκες. Στις γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση, τα επίπεδα της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία κυμαίνονται από 40 έως 200-400 pg/ml (από 0,1 έως 0,7-1,5 nM) κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Μετά την εμμηνόπαυση, τα επίπεδα της οιστραδιόλης πέφτουν σε επίπεδα χαμηλότερα από 20 pg/ml.

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

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

### 1.3 ΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

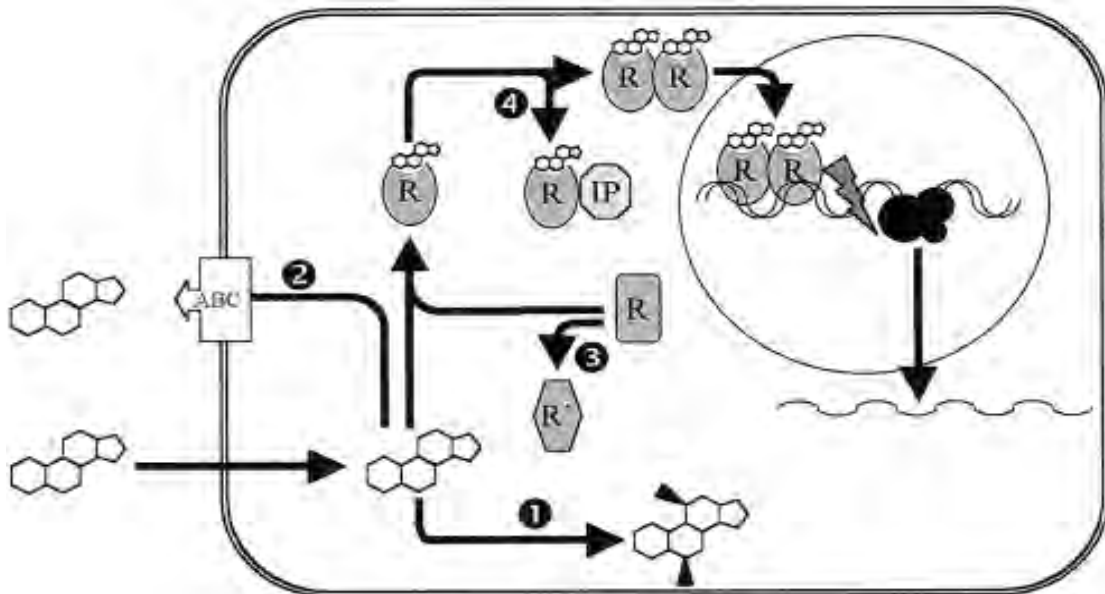
Η βιολογική δράση των οιστρογόνων διαμεσολαβείται μέσω της πρόσδεσης σε έναν από τους δύο οιστρογονικούς υποδοχείς (estrogen receptors, ERs), ERα ή ERβ, οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, η δράση πολλών από τους οποίους ρυθμίζεται από πρόσδεμα. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς δρουν κυρίως ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Συγκροτούνται από διακριτές περιοχές με εξειδικευμένες λειτουργίες, στις οποίες συγκαταλέγονται η πρόσδεση DNA και προσδέματος (Εικόνα 1). Το κεντρικό μέρος της πρωτεΐνης είναι η περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Οι αμινο-τελικές (N-τελικές) περιοχές των υποδοχέων είναι οι λιγότερο συντηρημένες και περιλαμβάνουν τμήματα που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (Activation Function 1, AF-1). Οι καρβοξυ-τελικές (C-τελικές) περιοχές εκφράζουν ειδικότητα για συγκεκριμένα προσδέματα. Περιέχουν επίσης τμήματα που είναι υπεύθυνα για το διμερισμό καθώς και ένα τμήμα που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Activation Function 2, AF-2), (Mangelsdorf, 1995).



Εικόνα 1: Δομή των δύο υποτύπων του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), ERα και ERβ. Και οι δύο τύποι του οιστρογονικού υποδοχέα εμφανίζουν λειτουργικές περιοχές χαρακτηριστικές για την υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Αυτές περιλαμβάνουν μια περιοχή που απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (AF-1), μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), μια περιοχή άρθρωσης (hinge) και μια περιοχή πρόσδεσης ορμόνης που περιλαμβάνει επίσης μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF-2) και ένα τμήμα που είναι υπεύθυνο για το σηματοδότηση διμερούς (Moggs and Orphanides, 2002).

Αρχικά, ήταν γνωστός μόνο ένας από τους οιστρογονικούς υποδοχείς, ο οιστρογονικός υποδοχέας τύπου άλφα (Estrogen Receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ ). Το 1996 ταυτοποιήθηκε ένας δεύτερος οιστρογονικός υποδοχέας, γνωστός σήμερα ως οιστρογονικός υποδοχέας τύπου β (Estrogen Receptor  $\beta$ , ER $\beta$ ) (Kuiper, 1996 – Moore, 1998).

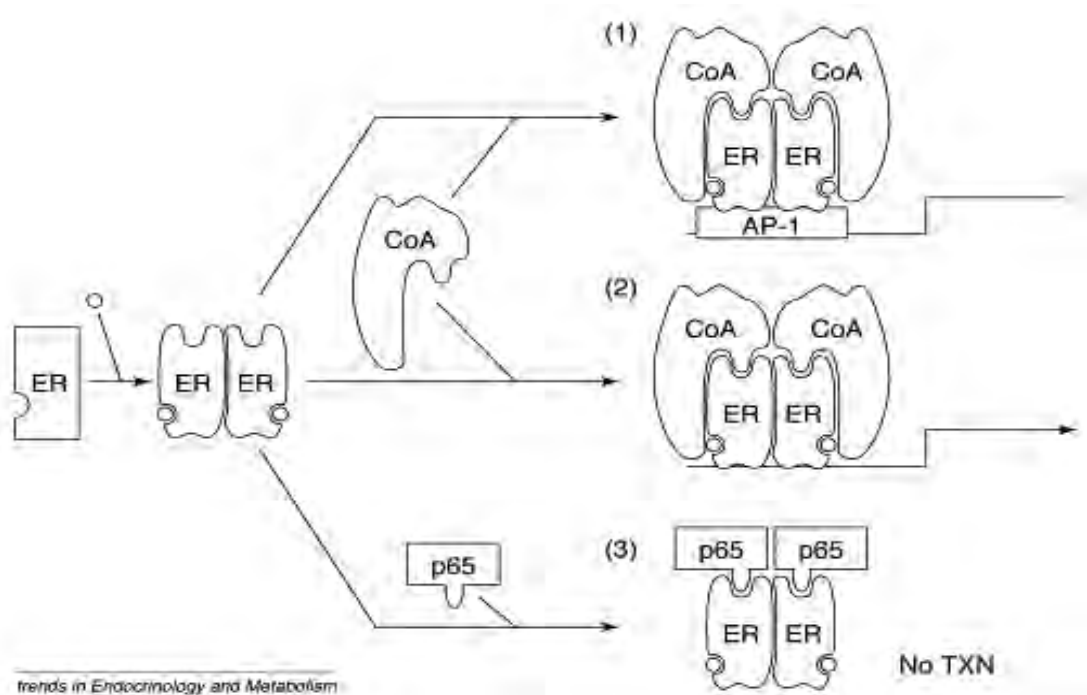
Οι υποδοχείς ER $\alpha$  και ER $\beta$  δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι επιδράσεις τους στο γονιδίωμα ρυθμίζονται μέσω της εισόδου του προσδέματος (π.χ. ενός οιστρογόνου ή αντιοιστρογόνου) στο κύτταρο, της σύνδεσης του προσδέματος στον υποδοχέα και της σύνδεσης του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με τη μορφή διμερούς σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, ERE) (Εικόνα 2) (Welboren, 2009). Στην πλειοψηφία τους, τα στοιχεία ERE είναι απομακρυσμένα από τα σημεία έναρξης της μεταγραφής. Τα στοιχεία ERE λειτουργούν ως ενισχυτές της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 2: Μηχανισμοί ρύθμισης της δράσης του ER

Η μεταγραφική δράση των ER επηρεάζεται, 1) από το μεταβολισμό του προσδέματος, 2) την απομάκρυνση του προσδέματος από κάποια αντλία στην κυτταρική μεμβράνη (π.χ. ABC), 3) από τυχόν μεταμεταφραστική τροποποίηση των υποδοχέων, 4) την αλληλεπίδραση ER με άλλες πρωτεΐνες (IP, π.χ. Hsp90, Hsp70, FKBP52) (Gougelet, 2005) και τέλος 5) την αλληλεπίδραση ER με άλλες πρωτεΐνες

ήδη συνδεδεμένες στο DNA στις οποίες συνδέονται οι ER χωρίς απαραίτητα τη μεσολάβηση ERE, όπως π.χ. οι μεταγραφικοί παράγοντες AP1 και NFκB (Εικόνα 3) (Kushner, 2000). Μέσω των παραγόντων οι υποδοχείς μπορούν να δράσουν ως ενεργοποιητές ή καταστολείς της μεταγραφής σε συνεργασία και με αρκετούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ονομάζονται συνενεργοποιητές (CoActivators, CoA) ή συγκαταστολείς (CoRepressors, CoR) και συγκροτούν μαζί με τους υποδοχείς ποικίλης σύστασης σύμπλοκα μεταγραφής.



Εικόνα 3: Μοντέλο δράσης του ER. Μετά την ενεργοποίηση και το διμερισμό, ο ER μπορεί να συμμετάσχει στη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου με έναν από τους τρεις τρόπους: 1) ο ER ενεργοποιημένος από προσδέτη μπορεί να προσδεθεί με υποκινητές του γονιδίου-στόχου όταν δεσμευτεί σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο AP-1 που είναι ήδη δεσμευμένοι στο DNA. Το σύμπλοκο που προκύπτει μπορεί να «προσλάβει» τότε συνενεργοποιητές. 2) Ο ER μπορεί να σχηματίσει ένα τριμερές σύμπλοκο με έναν συνενεργοποιητή μετά την αλληλεπίδραση του με ειδικές ρυθμιστικές αλληλουχίες εντός της περιοχής του υποκινητή. 3) Ο ER μπορεί να λειτουργήσει ως καταστολέας της μεταγραφής αναστέλλοντας την ικανότητα των μεταγραφικών παραγόντων όπως η υπομονάδα p65 του NF-κB να αλληλεπιδράσει με τους στόχους τους.

### 1.3.1. Η δομή του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου άλφα και οι ισομορφές του

Το γονίδιο του υποδοχέα οιστρογόνων τύπου άλφα (ER $\alpha$ ) του ανθρώπου βρίσκεται στη ζώνη 25.1 του χρωμοσώματος 6q (Menasce, 1993). Η πρωτεΐνη ER $\alpha$  αποτελείται από 595 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 66 kDa (Green, 1986) και περιλαμβάνει πέντε διακριτές περιοχές (Εικόνα 1) (Kumar, 1986 – Kumar, 1987) .

Οι λειτουργίες ενεργοποίησης της μεταγραφής που έχουν εντοπιστεί στις περιοχές A/B και E, εμφανίζουν αυτοδύναμη (AF-1) και εξαρτημένη από τη δομή του υποκαταστάτη (AF-2), αντίστοιχα, ενεργότητα ενίσχυσης του ρυθμού μεταγραφής γονιδίων. Η περιοχή δέσμευσης στο DNA (C) περιέχει δύο δομές δακτυλίων ψευδαργύρου που είναι υπεύθυνοι για την πρόσδεση του υποδοχέα στα στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα. Το N-τελικό τμήμα της περιοχής D είναι αναπόσπαστο κομμάτι της περιοχής C. Η περιοχή δέσμευσης της ορμόνης (E) περιέχει δύο τμήματα υψηλής ομολογίας με άλλους υποδοχείς ορμονών και εξασφαλίζει την ορμονική εξειδίκευση και επιλεκτικότητα (Kumar, 1986 – Kumar, 1987 – Carson-Jurica, 1990 – Orti, 1992). Αποτελείται κυρίως από 12  $\alpha$ -έλικες και περιέχει τη μεταγραφική ενεργότητα (AF-2). Πέρα από τη δωδέκατη έλικα ξεκινά η περιοχή F, η οποία δεν είναι αναγκαία για την πρόσδεση της ορμόνης, αλλά είναι σημαντική για τη διάκριση των προσδεμάτων σε αγωνιστές και ανταγωνιστές.

### 1.3.2. Η δομή του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου βήτα και οι ισομορφές του

Το γονίδιο του ER $\beta$  κλωνοποιήθηκε αρχικά από βιβλιοθήκη cDNA από προστάτη αρουραίου (Kuiper, 1996). Στη συνέχεια, ακολούθησε η κλωνοποίηση του γονιδίου του ER $\beta$  του ανθρώπου (hER $\beta$ ), (Mosselman, 1996 - Moore, 1998) . Το γονίδιο χαρτογραφήθηκε στην περιοχή q22-24 του χρωμοσώματος 14 του ανθρώπου και έχει 8 εξώνια που κατανέμονται σε περίπου 40 Kbp (Enmark, 1997). Η πρωτεΐνη ER $\beta$  αποτελείται από 530 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 59 kDa και περιλαμβάνει επίσης πέντε διακριτές περιοχές (Εικόνα 1) .

Ο ER $\beta$  φέρει σημαντική αμινοξική ομολογία με τον ER $\alpha$ , ειδικά στην περιοχή δέσμευσης στο DNA και στην περιοχή πρόσδεσης της ορμόνης, γεγονός που υποδηλώνει πως ο ER $\beta$  αναγνωρίζει και προσδένεται σε ERE στοιχεία με τρόπο παρόμοιο του ER $\alpha$ , αλλά ο κάθε τύπος υποδοχέα διαφοροποιείται ως προς το φάσμα των προσδεμάτων. Η αμινοξική αλληλουχική ομολογία μεταξύ των δύο υποδοχέων

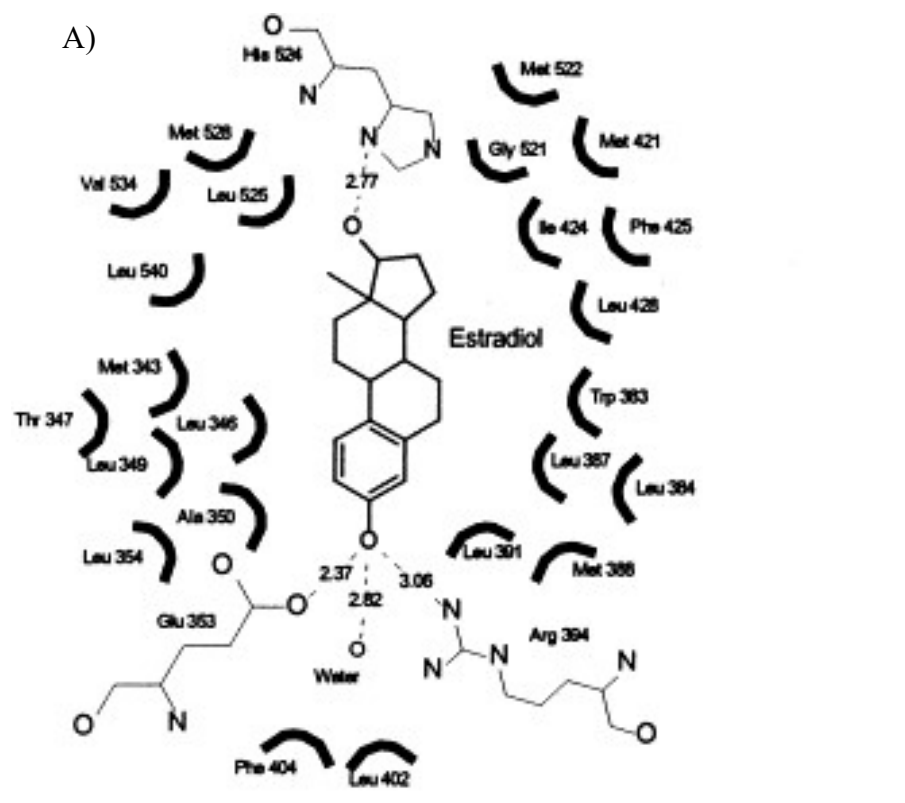
είναι μικρότερη στην N-τελική και C-τελική περιοχή F. Δεδομένου ότι οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των διαφόρων πυρηνικών συμπαραγόντων, ο ERα και ο ERβ μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διαφορετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεταγραφής και να έχουν διαφορετικό αποτέλεσμα στη γονιδιακή ρύθμιση. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει τις αντίθετες δράσεις του ERα και ERβ στη βάση ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διαφορετικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεταγραφής και να έχουν διαφορετικό αποτέλεσμα στη γονιδιακή ρύθμιση. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει τις αντίθετες δράσεις του ERα και ERβ στα γονίδια που ελέγχονται από το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Paech, 1997). Ο ERβ1 παρουσιάζει υψηλή και παραπλήσια του ERα χημική συγγένεια προς την οιστραδιόλη, όπως καταδεικνύεται από αναλύσεις κορεσμού της ορμόνης. Παρόλα αυτά, πολλές ενώσεις εμφανίζουν προσδετική προτίμηση στον έναν από τους δύο ER.

#### 1.4 ΠΡΟΣΔΕΜΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

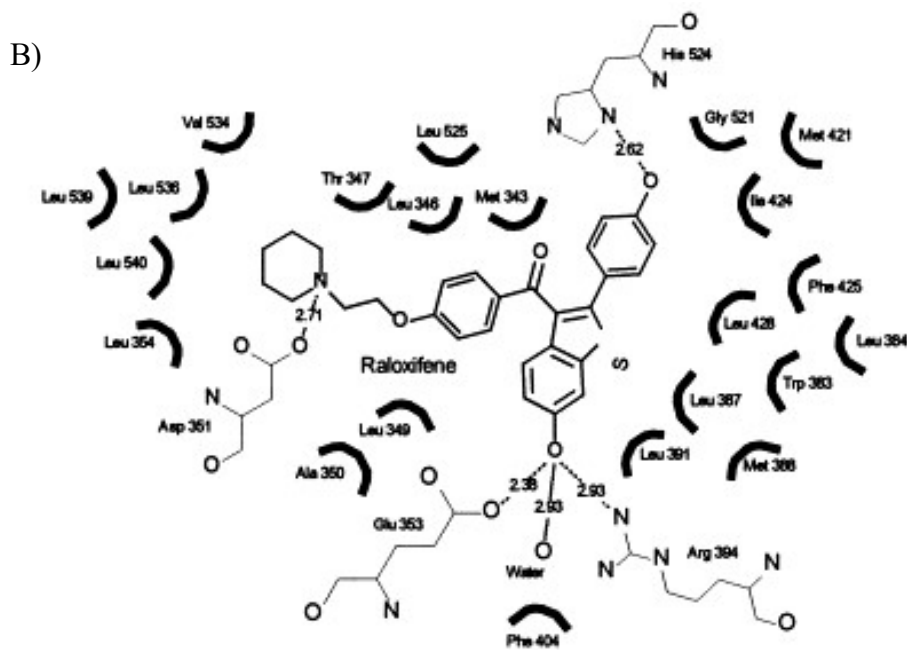
Οι υποδοχείς των οιστρογόνων αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται κατόπιν σύνδεσης με την ορμόνη. Η πρόσδεση των οιστρογόνων στους υποδοχείς τους συνεπάγεται επαγωγή ή καταστολή πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Απουσία κάποιου προσδέματος, ο ER βρίσκεται σε ανενεργή στερεοδιάταξη σε σύμπλοκο με ορισμένες πρωτεΐνες που είναι γνωστές ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp90, Hsp70, κ.ά.), (Bohen, 1995). Σε αυτή την ανενεργή στερεοδιάταξη ο υποδοχέας δεν μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή.

Η δέσμευση της ορμόνης επάγει αλλαγές στη στερεοδιάταξη του υποδοχέα, την αποσύνδεσή του από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και το διμερισμό του (ή τον ετεροδιμερισμό του στην περίπτωση που το κύτταρο συνεκφράζει τους ERα και ERβ) ώστε να είναι πλέον διαθέσιμος για να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να συγκροτήσει πυρηνικά μεταγραφικά σύμπλοκα, αφού προηγουμένως δεσμευτεί σε ειδικές αλληλουχίες του DNA ή σε ήδη συνδεδεμένους με το DNA μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνες 1 και 3). Ο ανασταλτικός ρόλος που έχει για το διμερισμό η θέση της περιοχής F του ER εξουδετερώνεται με τη σύνδεση της ορμόνης (Peters, 1999). Είναι πλέον γνωστό πως για τη ρύθμιση της μεταγραφής απαιτείται η αλληλεπίδραση του ER με ένα αριθμό συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών (συνενεργοποιητές και συγκαταστατολείς) που λειτουργούν ως μεσολαβητές μεταξύ

του υποδοχέα και του γενικού μεταγραφικού μηχανισμού (Εικόνα 3), (McKenna, 1999). Η ανάλυση κρυστάλλων του ER σε σύνδεση με την οιστραδιόλη (Brzozowski, 1997) και το συνθετικό μη-στεροειδές αντιοιστρογόνο ραλοξιφαίνη (ραλοξιφαίνη, RAL), αποκάλυψε ένα διμερές στο οποίο και οι δύο προσδέτες αλληλεπιδρούν με πολύ συγκεκριμένα αμινοξέα (Glu353, Arg394, His524) (Εικόνες 4A και 4B). Επιπλέον, η ραλοξιφαίνη, αλληλεπιδρά μέσω της πλευρικής της αλυσίδας με το αμινοξύ 351 του ERα (Εικόνα 4B).

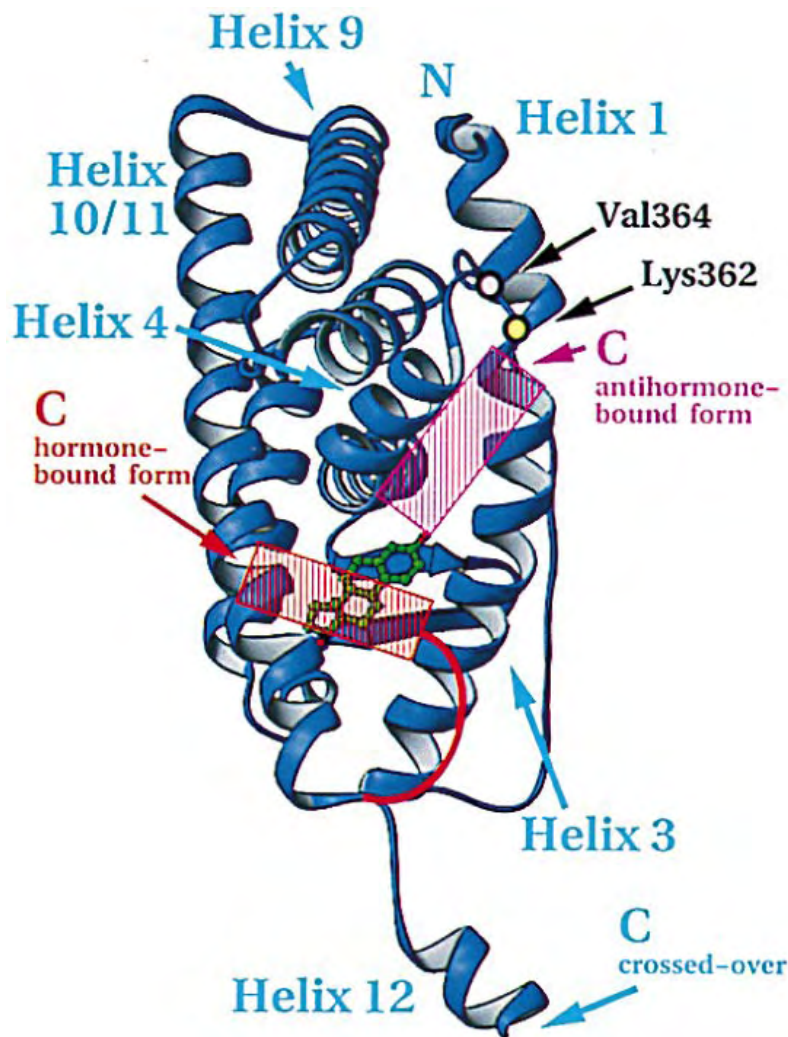






Εικόνα 4A και 4B: Αλληλεπίδραση της οιστραδιόλης (A) και της ραλοξιφαίνης (B) με συγκεκριμένα αμινοξέα στην περιοχή δεσμεύσης του προσδέτη του υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Τα υδροξύλια της οιστραδιόλης και της ραλοξιφαίνης αλληλεπιδρούν με τα ίδια αμινοξέα, υποστηρίζοντας την παρατήρηση ότι η οιστραδιόλη και ραλοξιφαίνη έχουν μια υψηλή συγγένεια για τον ER. Ωστόσο, ο δακτύλιος πιπεραζίνης της πλευρικής αλυσίδας εκτείνεται για να αλληλεπιδράσει με το κατάλοιπο Asp351 (Brzozowski, 1997).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της δομής του υποδοχέα είναι η ελεύθερη πρόσβαση της ορμόνης στη θέση δέσμευσης του προσδέματος μέσα από ένα υδροφοβικό αυλό που, στη συνέχεια σφραγίζεται από την έλικα 12 (Εικόνα 5). Η τοποθέτηση αυτή της έλικας 12 μετά την πρόσδεση του υποδοχέα με την ορμόνη είναι κρίσιμης σημασίας για την προσέλκυση των συν-ενεργοποιητών από την AF-2 με επακόλουθο την έναρξη της δραστηριότητας της RNA πολυμεράσης. Η επαγόμενη από την ορμόνη τοποθέτηση της έλικας 12 στη θέση σφράγισης του αυλού έχει προταθεί ως ένα σημαντικό μηχανιστικό μοντέλο για την επίτευξη της μέγιστης οιστρογονικής δράσης (Brzozowski, 1997 – Feng, 1998 – Moras, 1998).



Εικόνα 5: Η έλικα 12 παγιδεύει την ορμόνη στην περιοχή δέσμευσης του προσδέτη, εκθέτοντας έτσι την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής AF-2. Τα βασικά αμινοξέα στις θέσεις 538, 542, 545 στη συνέχεια δεσμεύουν συνενεργοποιητές. Αντίθετα, όταν η ραλοξιφαίνη (αντιοιστρογόνο) προσδέεται στην περιοχή δέσμευσης του προσδέτη, η έλικα 12 επαναπροσανατολίζεται, κρύβοντας την AF-2 περιοχή. (Tanenbaum, 1998).

Όπως έχει προσδιοριστεί από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ERα με το αντιοιστρογόνο ραλοξιφαίνη, η πλευρική αλυσίδα της ραλοξιφαίνης δεν επιτρέπει τη σταθεροποίηση της έλικας 12 στη θέση σφράγισης του αυλού αλλά σε άλλη θέση η οποία όμως δεν επιτρέπει την πρόσδεση συνενεργοποιητών (Εικόνα 5). Ως αντιοιστρογόνα ορίζονται τα προσδέματα του ER στην παρουσία των οποίων η έλικα 12 λαμβάνει τέτοια διαμόρφωση που η AF-2 δεν έχει τη δυνατότητα να προσελκύσει

συνενεργοποιητές ώστε να προωθήσει τη μεταγραφή, Αντίθετα, παρατηρείται προσέλκυση συγκαταστολέων που παρεμποδίζουν τη μεταγραφή (Brzozowski, 1997).

### 1.5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Η πιο γνωστή λειτουργία του οιστρογονικού υποδοχέα ER είναι ο ρόλος που επιτελεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Οι λειτουργίες ενεργοποίησης της μεταγραφής AF-1 και AF-2 των οιστρογονικών υποδοχέων συνήθως δρουν συνεργιστικά, παρότι έχει δειχθεί ότι οι υποκινητές κάποιων γονιδίων ενεργοποιούνται από την AF-1 ή την AF-2 ξεχωριστά (Osborne, 2001). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το δέσιμο του προσδέματος στον οιστρογονικό υποδοχέα προκαλεί πρόσδεση του υποδοχέα των οιστρογόνων στα στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα. Αυτό είναι το «κλασσικό» μονοπάτι της δράσης του ER. Εκτός από το «κλασσικό» μονοπάτι δράσης του ER που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μέσω σύνδεσης σε EREs, ο ER μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων ήδη συνδεδεμένων στο DNA (Kushner, 2000). Μέσω αυτής της μη-κλασσικής δράσης, η πυρηνική πρωτεΐνη του ER αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο AP-1, οδηγώντας σε ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης απουσία ERE (Ray, 1997 - Kushner, 2000 – Safe, 2001). Άλλοι μη-εξαρτώμενοι από το ERE μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον ER συμπεριλαμβάνουν τον FOX και τον NFκB. Η πρόσδεση του ER στο DNA μέσω ERE ή άλλων μεταγραφικών παραγόντων ακολουθείται από πρόσδεση συν-ενεργοποιητών ή συν-καταστολέων ανάλογα με το πρόσδεμα, το είδος πρόσδεσης στο DNA (κλασσικό ή μη στοιχείο καθώς και από τον τύπο του κυττάρου. Τόσο το είδος όσο και ο αριθμός των μεταγραφικών παραγόντων και συμπαραγόντων που συγκροτούν το ρυθμιστικό στοιχείο εξαρτάται από το είδος του κυττάρου. Αυτές οι πρωτεΐνες οδηγούν στη δημιουργία μεγάλων συμπλόκων με τον ER που ενισχύουν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή μέσω διαφορετικών μηχανισμών, όπως π.χ. η προσέλκυση ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης στις θέσεις του υποκινητή. Σε αντίθεση με τα οιστρογόνα, τα αντιοιστρογόνα επάγουν μια διαφορετική διαμόρφωση του υποδοχέα που οδηγεί στην προσέλκυση πρωτεϊνών-καταστολέων με αποτέλεσμα να σταματά η μεταγραφή των γονιδίων.

## 1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

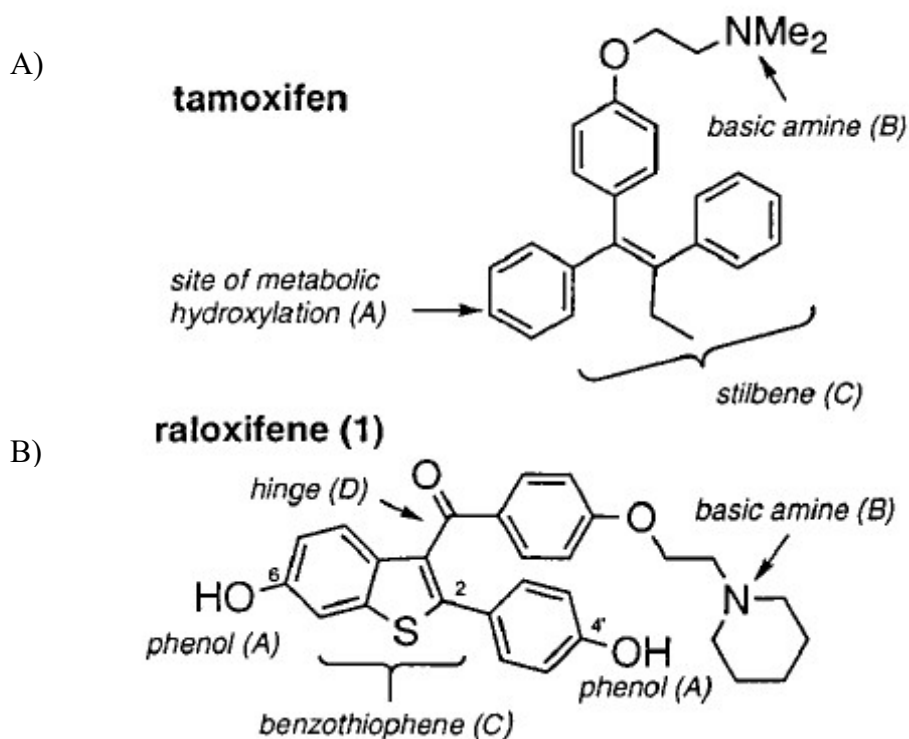
Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, όπως εφαρμόζεται σήμερα με την προληπτική μαστογραφία, μπορεί να μειώσει τα ποσοστά θνησιμότητας της νόσου. Μια μέθοδος πρόληψης είναι και ο ορμονικός έλεγχος σε γυναίκες υψηλού κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Επίσης, η σχέση ορισμένων διαιτητικών παραγόντων με την εμφάνιση της νόσου, δικαιολογεί την άποψη ότι η πρόληψή της μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη προσαρμογή της διαίτας (Van't Veer, 1991). Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου αποτελεί την πρώτη γραμμή θεραπείας, ενώ η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία είναι δύο σημαντικά μέσα στο οπλοστάσιο για την καταπολέμηση της νόσου..Από τότε που ο George Beatson παρατήρησε την υποστροφή μεταστατικού καρκίνου του μαστού μετά από ωθηκεκτομή, αναπτύχθηκαν διάφορες θεραπείες είτε χειρουργικές είτε φαρμακευτικές βασισμένες σε αυτό το εύρημα. Η αποκάλυψη ότι η δράση των οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού επιτελείται μέσω του ER οδήγησε στην ανάπτυξη αντιοιστρογόνων ως μιας ασφαλούς και απλής εναλλακτικής θεραπείας αντί της χειρουργικής ωθηκεκτομής (Lerner, 1990). Η σύνθεση του πρώτου αντιοιστρογόνου προηγήθηκε της ανακάλυψης του υποδοχέα των οιστρογόνων. Το 1958, οι Lerner και συνεργάτες δημοσίευσαν τη σύνθεση και τις φαρμακολογικές ιδιότητες του μη-στεροειδούς αντιοιστρογόνου εθαμοξυφετόλη (MER-25). Το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της νέας ένωσης ήταν η πλήρης αναστολή της δράσης της οιστραδιόλης στη μήτρα και η έλλειψη μιτογόνου ερεθισμού του ενδομητρίου. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αντιοιστρογονική δράση εξαρτιόταν από τη δοσολογία, υποδεικνύοντας μια σχέση ανταγωνισμού με την οιστραδιόλη για πρόσδεση σε έναν άγνωστο «υποδοχέα». Η ανακάλυψη του ER από τους Jensen και Jacobsen το 1960 άνοιξε το δρόμο για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο δρουν τα αντιοιστρογόνα καθώς και την κατασκευή νέων ενώσεων με ανάλογες ιδιότητες.

Ακολούθησε η σύνθεση δύο νέων αντιοιστρογονικών ενώσεων, της κλομφαίνης (Boostanfar, 2001) και της ταμοξιφαίνης (Klopper, 1971 – Williamson, 1973), (Εικόνα 6Α). Η ταμοξιφαίνη αποτελεί σήμερα την πρώτη επιλογή για την ενδοκρινική θεραπεία του καρκίνου του μαστού σε ER-θετικούς όγκους. Το σκεύασμα αυτό έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για χορήγηση σε όλα τα στάδια του καρκίνου του μαστού καθώς και προληπτικά για τη μείωση των συμβάντων

καρκίνου του μαστού σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Η υποστηρικτική θεραπεία με ταμοξιφαίνη για πέντε χρόνια μετά την χειρουργική επέμβαση θεωρείται ότι αποδίδει τα βέλτιστα αποτελέσματα αυξάνοντας σημαντικά την ελεύθερα νόσου επιβίωση (δηλαδή το χρονικό διάστημα που μεσολαμβάνει μέχρι την επανεμφάνιση της νόσου) καθώς και τη συνολική επιβίωση των ασθενών (EBCTCG, 1998). Η συνέχιση της χορήγησης της ταμοξιφαίνης πέρα των πέντε έτων δεν θεωρείται ότι προσφέρει περαιτέρω επιβίωση της ανταπόκρισης των ασθενών (Fisher, 1996). Η χορήγηση ταμοξιφαίνης έχει βρεθεί ότι συμβάλλει επίσης στη μείωση καταγμάτων δρώντας ως οιστρογόνο στα οστά. Ενώσεις που δρουν ως ανταγωνιστές του ER στο μαστό αλλά ως αγωνιστές του στα οστά ονομάζονται επιλεκτικοί ρυθμιστές του ER (Selective ER modulators, SERMs). Όμως η ταμοξιφαίνη βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση της συχνότητας του καρκίνου της μήτρας καθώς αυξάνει το πάχος του επιθηλίου της, γεγονός που έδωσε αφορμή για την αναζήτηση και ανακάλυψη νέων SERMs.

Άλλο ένα σημαντικό αντιοιστρογόνο είναι η ραλοξιφαίνη, η οποία αναπτύχθηκε, αρχικά, για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης (Εικόνα 6B). Σε αντίθεση με την ταμοξιφαίνη, η ραλοξιφαίνη έχει βρεθεί ότι μειώνει τη συχνότητα του καρκίνου της μήτρας αλλά προκαλεί εξάψεις καθώς και εμβολές όπως και η ταμοξιφαίνη. Η ραλοξιφαίνη έχει μελετηθεί λιγότερο συστηματικά για χρήση στον καρκίνο του μαστού. Υψηλές δόσεις ραλοξιφαίνης (300mg ημερησίως) έδειξαν αρχικά μέτρια αποτελέσματα σε ERα-θετικούς καρκίνους (Gradishar, 2000). Αυτά τα δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με εργαστηριακά ευρήματα που υποστηρίζουν ότι η ραλοξιφαίνη είναι λιγότερο αποτελεσματική από την ταμοξιφαίνη σε ζωικά μοντέλα καρκίνου του μαστού (Clemens, 1983). Όμως, με βάση την υπόθεση ότι η ραλοξιφαίνη μπορεί να μειώσει την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού, ως μια θετική παράπλευρη δράση της θεραπείας της οστεοπόρωσης, έχουν αρχίσει και βρίσκονται σε εξέλιξη συστηματικές κλινικές δοκιμές που συγκρίνουν τα ποσοστά συμβάντων καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που παίρνουν ραλοξιφαίνη (Evista) σε σχέση με άλλες που παίρνουν ψευδοσκεύασμα (placebo). Μελέτες έδειξαν μείωση του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου του μαστού κατά 54-70% (Cauley, 2001). Όμως, τα αποτελέσματα του προγράμματος κλινικών δοκιμών STAR (Study of Tamoxifen and Raloxifen, STAR) δείχνουν ότι η ραλοξιφαίνη και η ταμοξιφαίνη έχουν παραπλήσια αποτελεσματικότητα στην πρόληψη των διηθητικών καρκίνων μαστού, με την ταμοξιφαίνη να είναι πιο αποτελεσματική για την πρόληψη των καρκινωμάτων in situ (Vogel, 2006).

Υπάρχουν τέσσερα δομικά στοιχεία μεταξύ ραλοξιφαίνης και ταμοξιφαίνης που ευθύνονται για την ιστοειδικότητα. Το πρώτο είναι η παρουσία φαινολικών υδροξυλίων στη ραλοξιφαίνη τα οποία είναι σημαντικά για τη δέσμευση στον υποδοχέα. Το δεύτερο είναι η φύση της βασικής αμίνης η οποία είναι κριτικής σημασίας για τον ανταγωνισμό. Η μετατροπή από μια ακυκλική ολεφίνη στην ταμοξιφαίνη σε μια δομή που περιλαμβάνει το δακτύλιο του βενζοθειοφαινίου είναι το τρίτο δομικό στοιχείο. Το τελευταίο και το πιο σημαντικό είναι η καρβονυλική άρθρωση που βρίσκεται μεταξύ της βασικής πλευρικής αλυσίδας και της ολεφίνης (Εικόνα, 6), (Grese, 1997).



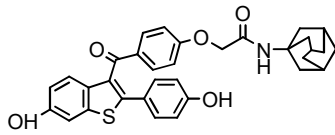
Εικόνα 6A και 6B: Στην εικόνα επισημαίνονται οι δομικές διαφορές τη ταμοξιφαίνης (A) και της ραλοξιφαίνης (B), (Grese, 1997).

Εκτός από τους SERMs, μια άλλη κατηγορία αντιοιστρογόνων είναι τα λεγόμενα «καθαρά αντιοιστρογόνα» τα οποία ανακαλύφθηκαν από τους Wakeling και συνεργάτες (1987). Η ένωση ICI182,780 γνωστή, επίσης, ως fulvestrant ή με την εμπορική ονομασία Faslodex είναι το πιο ισχυρό αντιοιστρογόνο αυτής της κατηγορίας (Wakeling, 1991) και ήδη χορηγείται σε ασθενείς που παρουσίασαν

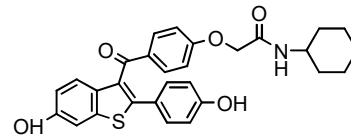
αντοχή στην ταμοξιφαίνη. Τα καθαρά αντιοιστρογόνα έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης από τα SERM. Η αγωνιστική τους δράση είναι μηδενική καθώς η πρόσδεσή τους στον ER προκαλεί απόδομηση του τελευταίου από το πρωτεάσωμα. Το ενδεχόμενο χρήσης του Faslodex για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού θα ήταν επομένως πολύ ελκυστικό, εάν δεν υπήρχαν οι πολύ σοβαρές παρενέργειες της οστεοπόρωσης και των καρδιαγγειακών νόσων που συνδέονται με την πλήρη απαλοιφή της σηματοδότησης μέσω του ERα. Παρόλα τα μειονεκτήματα, ενδείκνυται για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού σε ασθενείς ανεξάρτητα αν έχουν δεχθεί ή όχι ταμοξιφαίνη για 5 χρόνια (Howell, 2002 – Osborne, 2002).

### 1.7 ΝΕΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΡΑΛΟΞΙΦΑΙΝΗΣ

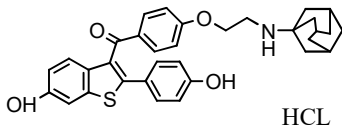
Με βάση τη δομή της ραλοξιφαίνης σχεδιάστηκαν *in silico* και συντέθηκαν από τους Δρ. Ε. Μικρό και Δρ. Γ. Λαμπρινίδη (Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ), συνεργάτες του Προγράμματος Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΙΒΦΧΒ του ΕΙΕ, ορισμένα ανάλογα της ραλοξιφαίνης που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στη δομή της πλευρικής αλυσίδας. Η εικόνα 7 δείχνει ότι σε σχέση με τη ραλοξιφαίνη (Εικόνα 6B) οι τροποποιήσεις αφορούσαν στην αύξηση του όγκου του τελικού τμήματος της πλευρικής αλυσίδας χωρίς (GL285 και 287) ή με παράλληλη εισαγωγή μιας δεύτερης κετονικής ομάδας (ανάλογα GL141 και 158), ή μιας υδροξυλομάδας (ανάλογα GL308 και 310) ή μιας ακεταμιδομάδας (GL352 και 353) στη θέση 3' του βενζολικού πυρήνα της πλευρικής αλυσίδας. Επίσης σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ανάλογα στα οποία η εισαγωγή της υδροξυλομάδας ή της ακεταμιδομάδας έγινε στη θέση 3' του βενζολικού πυρήνα της πλευρικής αλυσίδας της ραλοξιφαίνης (GL297 και 351) ή σε ανάλογά της με δύο μέθυλο (GL 309 και 349) ή αίθυλο ομάδες (GL298 και 350) στη θέση της πιπεριδίνης του τελικού δακτυλίου. Τέλος σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν από τους Δρ. Δ. Παπαχατζή και Δρ. Ν. Ασυμομύτη (ΙΒΦΧΒ, ΕΙΕ) ανάλογα στα οποία η ομάδα κετόνης της πλευρικής αλυσίδας αντικαταστάθηκε από 2 μεθυλομάδες (DP18) ή από έναν 4μελή (DP22) ή 5μελή (DP17) ή 6μελή (DP21) κυκλοαλκανικό δακτύλιο (Εικόνα 8).



GL158

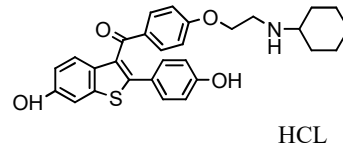


GL141



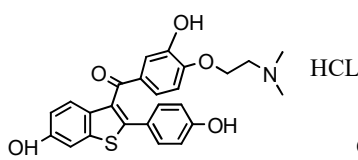
HCL

GL287



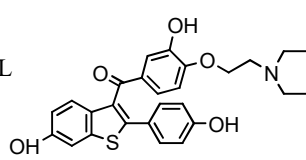
HCL

GL285

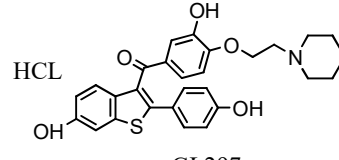


HCL

GL309



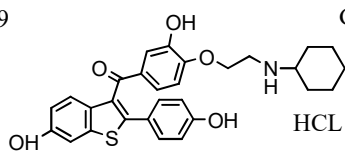
GL298



HCL

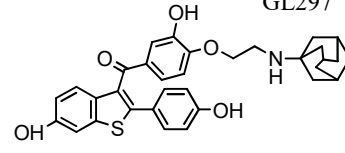
HCL

GL297



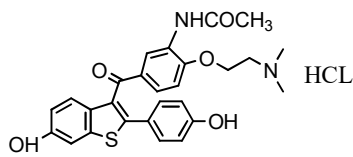
HCL

GL308



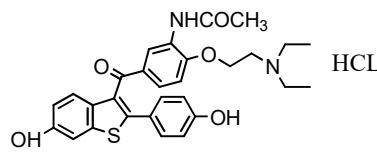
HCL

GL310



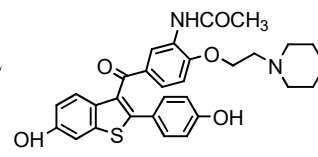
HCL

GL349



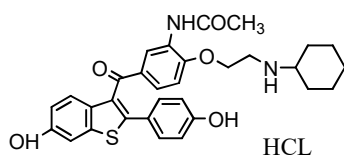
HCL

GL350



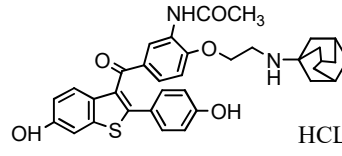
HCL

GL351



HCL

GL352



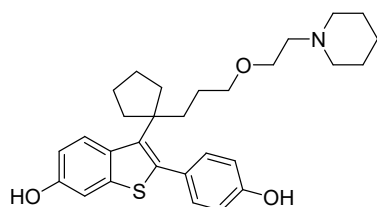
HCL

GL353



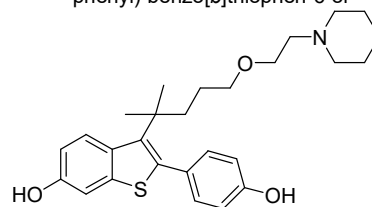
Εικόνα 7: Νέα ανάλογα της ραλοξιφαίνης. Τα ανάλογα αυτά δημιουργήθηκαν αυξάνοντας τον όγκο του τελικού τμήματος της πλευρικής αλυσίδας χωρίς (ανάλογα GL285 και 287) ή με παράλληλη εισαγωγή μιας δεύτερης κετονικής ομάδας (ανάλογα GL141 και 158), ή μιας υδροξυλομάδας (ανάλογα GL308 και 310) ή μιας ακεταμιδομάδας (GL352 και 353) στη θέση 3' του βενζολικού πυρήνα της πλευρικής αλυσίδας. Επίσης σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ανάλογα στα οποία η εισαγωγή της υδροξυλομάδας ή της ακεταμιδομάδας έγινε στη θέση 3' του βενζολικού πυρήνα της πλευρικής αλυσίδας της ραλοξιφαίνης (GL297 και 351) ή σε ανάλογά της με δύο μέθυλο (GL 309 και 349) ή αίθυλο ομάδες (GL298 και 350) στη θέση του τελικού δακτυλίου.

2-(4-Hydroxy-phenyl)-3-{1-[3-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-propyl]-cyclopentyl}-benzo[*b*]thiophen-6-ol

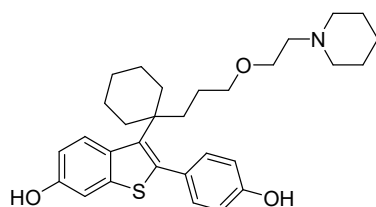


**DP-17**

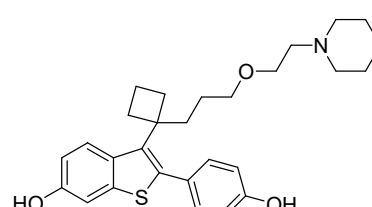
3-[1,1-Dimethyl-4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-butyl]-2-(4-hydroxy-phenyl)-benzo[*b*]thiophen-6-ol



**DP-18**



**DP-21**



**DP-22**

2-(4-Hydroxy-phenyl)-3-{1-[3-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-propyl]-cyclohexyl}-benzo[*b*]thiophen-6-ol

4-(4-(3-Hydroxy-allylidene)-3-{1-[3-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-propyl]-cyclobutyl}-4,5-dihydro-thiophen-2-yl)-phenol

Εικόνα 8: Νέα ανάλογα της ραλοξιφαίνης. Τα ανάλογα αυτά σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν αντικαθιστώντας την ομάδα κετόνης της πλευρικής αλυσίδας με 2 μεθυλομάδες (DP18) ή με έναν 4μελή (DP22) ή 5μελή (DP17) ή 6μελή (DP21) κυκλοαλκανικό δακτύλιο.

## 2.0 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης επιλεκτικών ρυθμιστών του υποδοχέα των οιστρογόνων *in vitro* χρησιμοποιώντας 4 κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα:

- Κύτταρα MCF-7:D5L παρουσία 1nM E2 (η συγκέντρωση της ορμόνης αντιστοιχεί σε αυτή που συνήθως υπάρχει στην κυκλοφορία γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία). Τα MCF-7:D5L είναι κύτταρα MCF-7 στα οποία έχει ενσωματωθεί μόνιμα το πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της γλοβίνης. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας των αντιοιστρογόνων να παρεμποδίζουν την αγωνιστική δράση της οιστραδιόλης μέσω ERα.
- Κύτταρα MCF-7:D5L παρουσία 0,1nM E2 (συγκέντρωση της ορμόνης στην κυκλοφορία γυναικών που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση).
- Κύτταρα HEK:ERβ1 παρουσία 1nM E2. Τα HEK:ERβ1 είναι κύτταρα HEK-293 (ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού) σταθερά διαμολυσμένα με το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3.1-hERβ1 και με το πλασμίδιο αναφορά pERE-TKLuc. Αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ. Τα κύτταρα HEK:ERβ1 χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας των αντιοιστρογόνων να παρεμποδίζουν την αγωνιστική δράση της οιστραδιόλης μέσω ERβ.
- Κυττάρα HEK:ERβ1 παρουσία 0,1nM E2.
- Κύτταρα MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού) παρουσία E2 1nM. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας των αντιοιστρογόνων να παρεμποδίζουν τη μιτογονική δράση των οιστρογόνων στο μαστικό επιθήλιο.
- Κυττάρα MCF-7 παρουσία 0,1nM E2.
- Κύτταρα Ishikawa παρουσία 1nM E2. Τα Ishikawa είναι ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος του ενδομητρίου που παράγουν πλακούντι αλκαλική φωσφατάση υπό την επίδραση οιστρογόνων. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας να παρεμποδίζουν την οιστρογονική δράση στη μήτρα.
- Κύτταρα Ishikawa παρουσία 0,1nM.

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 1.1 ΥΛΙΚΑ

##### 1.1.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν από τις κάτωθι αναφερόμενες εταιρείες:

- Τα υλικά της καλλιέργειας των κυττάρων (MEM, MEM κατά Dulbecco, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό νάτριο, τρυψίνη, όξινο ανθρακικό νάτριο) από τη Biochrom (Germany).
- Η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη από την Gibco (Invitrogen, USA).
- Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS από την Gibco (Invitrogen, USA).
- Τα πλαστικά είδη της κυτταροκαλλιέργειας (τρυβλία διαμέτρου 100mm, 60mm και 35mm, 60mm πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων) από τη Nunc (Denmark).
- Το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Η E2 από την Steraloids (USA).
- Τα ICI182 από την Tocris-Bioscience (USA).
- Το κιτ μέτρησης λουσιφεράσης από την Promega (USA).
- Το p-nitro-phenyl phosphate (υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης) από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Η μεθανόλη από την Carlo Erba Reagents (Italy).
- Το οξικό οξύ από την BDH, VWR International Ltd (England).
- Η ινσουλίνη από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Η αιθανόλη από τη Merck (Germany).
- Η ταμοξιφαίνη από την Sigma Aldrich (Germany).

### 1.1.2 Πλασμίδια

- pERE - TK - Luc : (Cowley and Parker, 1999). Είναι πλασμίδιο αναφοράς που εκφράζει το ένζυμο λουσιφεράση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης (TK) και ενός ERE αναροϊκά του υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης. Παραχωρήθηκε από τον Δρ. M.G. Parker.
- pERE -β- Glob - Luc : Είναι πλασμίδιο αναφοράς που εκφράζει το ένζυμο λουσιφεράση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της γλοβίνης (Glob) και ενός ERE αναροϊκά του υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης. Παρασκευάστηκε από την Ίντα Φλωρεντίν (Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, ΕΙΕ).
- pCDNA 3.1- hER β1 : Το pCDNA3.1 που φέρει το cDNA του ERβ1 ανθρώπου (hERβ1), υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV. Χρησιμοποιείται για έκφραση του hERβ1 σε κύτταρα θηλαστικών. Παρασκευάστηκε από την Δρ. Δ. Μήτσιου (Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα).

### 1.1.3 Κυτταρικές σειρές

- MCF-7: Ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού. (ATCC, American Tissue Culture Collection).
- MCF-7:D5L: Είναι κύτταρα MCF-7 στα οποία έχει ενσωματωθεί μόνιμα το πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της γλοβίνης (pERE-Glob-Luc) και το πλασμίδιο pWL2neo που περιέχει το γονίδιο της νεομυκίνης που προσφέρει ανθεκτικότητα στη γενετισίνη. Αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ.
- Ishikawa: Είναι ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος του ενδομητρίου. Παράγουν πλακούντια αλκαλική φωσφατάση υπό την επίδραση οιστρογόνων. (ECACC, European Collection of Animal Cell Cultures).
- HEK-293: Ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού (ATCC).
- HEK:ERβ1: Είναι κύτταρα HEK-293 σταθερά διαμολυσμένα με το πλασμίδιο έκφρασης pCDNA3.1-hERβ1 και με το πλασμίδιο αναφοράς pERE-TKLuc. Αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του ΕΙΕ.

#### 1.1.4 Αποστείρωση

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

## 1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.2.1 Χειρισμοί κυττάρων

#### 1.2.1.1 Διαδικασίες για την καλλιέργεια των κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες της καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν κάτω από στείρες συνθήκες, ενώ στείρα ήταν επίσης και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία petri διαμέτρου 100mm και 60mm με 10ml πλήρους υλικού, στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>. Η καλλιέργεια των κυττάρων HEK-293 και του κλώνου τους έγινε με υλικό κυτταροκαλλιέργειας DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με κόκκινο της φαινόλης στο οποίο προστέθηκε γλουταμίνη (20mM), στρεπτομυκίνη (50mg/L), πενικιλίνη (50.000IU/L), πυροσταφυλικό νάτριο (1mM), NaHCO<sub>3</sub> (2g/L) και 10% κ.ό. ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS).

Τα κύτταρα MCF-7 και ο κλώνος τους καλλιεργήθηκαν σε υλικό MEM χωρίς ερυθρό της φαινόλης παρουσία 10% FBS, 1mg/L ινσουλίνης και 0,1nM οιστραδιόλης (E2) (πλήρες υλικό καλλιέργειας). Τα κύτταρα Ishikawa καλλιεργήθηκαν σε υλικό MEM χωρίς ερυθρό της φαινόλης παρουσία 5% FBS. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm, με 10 ml πλήρους υλικού, στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>.

## A. Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με τρυψίνη (τρυψινοποίηση)

Η ανακαλλιέργεια με τρυψίνη πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει όλο το ταπήτιο του τρυβλίου (80% πληρότητα), καθώς δεν υπάρχει άλλος χώρος προκειμένου να αναπτυχθούν περαιτέρω. Σε πρώτη φάση, παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και ελέγχεται η μορφολογία τους αλλά και η πληρότητα του ταπητίου τους (confluency). Έπειτα απομακρύνεται (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS 1X (14,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /80,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5, 2,68 mM KCl, 136,7 mM NaCl). Στη συνέχεια απομακρύνεται το PBS και προστίθεται προστέθηκε 1ml διαλύματος τρυψίνης (0,25 % κ.ο. σε PBS) ή τρυψίνης-EDTA (0,05 % κ.ο. τρυψίνη και 0,002% κ.ο. EDTA σε 10x PBS), (ανάλογα με την κυτταρική σειρά) και ανακινείται το τρυβλίο προκειμένου να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του τρυβλίου με το διάλυμα της τρυψίνης. Ακολούθησε επώαση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα (ανάλογα με την κυτταρική σειρά, απαιτείται και διαφορετικός χρόνος επώασης, από 2-10 min). Μετά το πέρας της επώασης προστίθεται τριπλάσιος όγκος θρεπτικού διαλύματος έτσι ώστε να σταματήσει η δράση της τρυψίνης. Λαμβάνεται στο τέλος η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1/3) για το νέο τρυβλίο και προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού υλικού. Τέλος, διασπείρονται τα κύτταρα ομοιόμορφα στο τρυβλίο ώστε να αναπτυχθούν. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και όταν επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα σε συγκεκριμένα πειράματα.

Στο τέλος κάποιων πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά την τρυψινοποίησή τους, φυγοκεντρήθηκαν στα 400 g για 10 min, εκτύθηκαν μια φορά με PBS και το ίζημά τους φυλάχθηκε σε υγρό άζωτο.

### 1.2.1.2 Προετοιμασία των ενώσεων

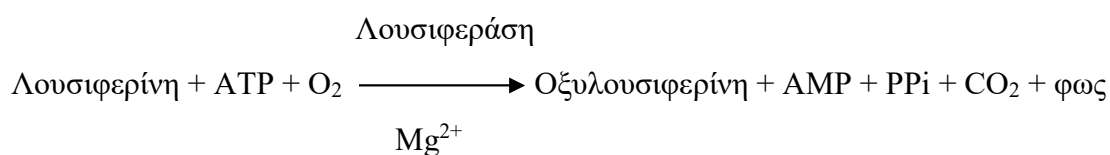
Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διαλύθηκαν αρχικά σε διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση  $10^{-2}$  M και στη συνέχεια αραιώθηκαν διαδοχικά με διαλύτη για την παρασκευή ενδιάμεσων αραιώσεων των ενώσεων σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη αυτής που ελέγχθηκε. Η τελική αραιώση προέκυψε με την προσθήκη 1 ml της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

### 1.2.1.3 Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

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

### 1.2.1.4 Προσδιορισμός της έκφρασης της λουσιφεράσης

Για τη μελέτη της επαγωγής της λουσιφεράσης στις υπό εξέταση ενώσεις χρησιμοποιήθηκε το κιτ της Promega. Για τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης γίνεται μέτρηση των παραγόμενων φωτονίων που προκύπτουν από την αντίδραση:



Οι πιο συνηθισμένες αντιδράσεις ανοσοφθορισμού απελευθερώνουν CO<sub>2</sub> σαν προϊόν. Τα επίπεδα αυτής της αντίδρασης μεταξύ λουσιφερίνης και οξυγόνου είναι πολύ αργά

μέχρι να καταλυθούν από τη λουσιφεράση, με την παρουσία μερικές φορές συμπαραγόντων, όπως ιόντα ασβεστίου ή ATP.

Τα πειράματα επαγωγής της λουσιφεράσης πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Για τη μέθοδο της λουσιφεράσης τα κύτταρα HEK:ERβ1 και MCF-7:D5L καλλιεργούνται σε 96-well plate σε τελικό όγκο καλλιέργειας και υλικού 100  $\mu$ L στο κάθε βοθρίο. Μετά το πέρας των 72 ωρών προστίθενται οι υπό εξέταση ουσίες και σε 16 με 18 ώρες μετά την προσθήκη των ενώσεων, κρίνεται ασφαλές να πραγματοποιηθεί η δοκιμασία της λουσιφεράσης.

Αρχικά, απορροφάται το υλικό που βρίσκεται πάνω από την επιφάνεια των κυττάρων. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 25  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων καθώς και το υπόστρωμα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 25  $\mu$ l του διαλύματος της λουσιφερίνης ως υπόστρωμα και ακολούθησε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως «ξήνονται» τα προσκολλημένα κύτταρα από τον πάτο των πηγαδιών, λαμβάνεται ποσότητα 35  $\mu$ l και προστίθεται στην ειδική πλάκα. Έπειτα ακολουθεί επώαση 5 min κατά τη διάρκεια της οποίας τα κύτταρα αναδεύονται. Μετά το τέλος της επώασης έγινε μέτρηση των παραγόμενων φωτονίων στον πολυμετρητή Safire II (TECAN).

#### **1.2.1.5 Προσδιορισμός της έκφρασης Αλκαλικής Φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa**

Η μέθοδος μέτρησης της επαγωγής της αλκαλικής φωσφατάσης από τα οιστρογόνα στα κύτταρα Ishikawa βασίζεται στον προσδιορισμό της υδρόλυσης του φωσφορικού εστέρα της νιτροφαινόλης από την αλκαλική φωσφατάση που προκαλεί τη μετατροπή σε χρωμογόνο παράγωγο το οποίο έχει μέγιστη απορροφητικότητα φωτός στα 405 nm (Littlefield, 1990). Τα πειράματα επαγωγής της αλκαλικής φωσφατάσης πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Μετά το τέλος της επώασης με τις προς εξέταση ενώσεις, ακολούθησαν δυο εκπλύσεις των κυττάρων με διάλυμα PBS (100  $\mu$ l ανά θέση) απομακρύνθηκαν τυχόν υπολείμματα του PBS και οι πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 θέσεων τοποθετήθηκαν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  τουλάχιστον για ένα 24h και έτσι προκλήθηκε λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, η πλάκα έμεινε για περίπου 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τοποθετήθηκε στον πάγο όπου επώαστηκε με κρύο διάλυμα (50  $\mu$ l ανά θέση) που περιείχε 5 mM



φωσφορικό εστέρα της νιτροφαινόλης, 0,24 mM MgCl<sub>2</sub> και 1 M διαιθανολαμίνης (pH 9,8). Τα κύτταρα που επώαστηκαν με οιστραδιόλη αποτέλεσαν το θετικό δείγμα αναφοράς. Το κίτρινο χρώμα του προϊόντος παρακολουθούνταν και γινόταν μέτρηση κάθε 10 min στα 405 nm χρησιμοποιώντας τον πολυμετρητή Safire II (TECAN) μέχρι το θετικό δείγμα αναφοράς έδειξε οπτική απορρόφηση (στα 405nm) της τάξης του 1,2. Οι τιμές που προέκυψαν από αυτή τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της επίδρασης των υπό εξέταση ενώσεων στην έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης.

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

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζώντων και νεκρών κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωστική trypan blue. Το trypan blue ανήκει στην κατηγορία των χρωστικών που δεν διαπερνούν την μεμβράνη των ζώντων κυττάρων και χρωματίζουν μόνο τα νεκρά ή αποδιοργανωμένα κύτταρα. Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας συλλέχθηκαν όλα τα κύτταρα, προσκολλημένα και μη. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε το υλικό καλλιέργειας στο οποίο μπορεί να αιωρούνταν κύτταρα και προστέθηκαν σε αυτό και τα προσκολλημένα κύτταρα τα οποία συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση. Μέρος του τελικού εναιωρήματος των κυττάρων αραιώθηκε με προσθήκη ίσου όγκου 0,4% Trypan blue σε PBS και έγινε καταμέτρηση χρησιμοποιώντας αιμοκυττόμετρο (Neubauer). Ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

#### **1.2.1.7 Μέτρηση της σχετικής χημικής συγγένειας πρόσδεσης στους ERα και ERβ1 με χρήση πολωσιμετρίας φθορισμού**

Η μέτρηση της ΣΧΣΠ ορμόνης στους καθαρούς ERα και ERβ1 σε διάλυμα έγινε με χρήση πολωσιμετρίας φθορισμού χρησιμοποιώντας το kit Polar screen της Panvera. Το kit περιλάμβανε διάλυμα σχετικά καθαρού ανασυνδυασμένου ERα και ERβ1 ανθρώπου και ένα φθορίζον οιστρογόνο (Fluormone ES2). Το ES2 προστέθηκε στο διάλυμα του ER σε συγκέντρωση 1 nM για να σχηματίσει το σύμπλοκο ER/ES2. Στη

συνέχεια, στο διάλυμα του συμπλόκου προστέθηκαν οι υπό εξέταση ενώσεις, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ώστε να εκτοπίσουν το ES2 από τον ER. Η ΣΧΣΠ προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το πολωσίμετρο φθορισμού Beacon 2000 της PanVera όπως έχει περιγραφεί από τους Bolger και συνεργάτες (1998). Η συγκέντρωση της υπό εξέταση ένωσης που χρειάστηκε για να εκτοπίσει το 50% του ES2 από τον ER (IC50), σε σχέση με αυτή της οιστραδιόλης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ΣΧΣΠ της ένωσης στον ER σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{ΣΧΣΠ} = \text{IC50 E2} \times 100 / \text{IC50 ένωσης}$$

### 1.2.1.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το πακέτο SPSS 12.0 για Windows. Οι συγκρίσεις μεταξύ πολλαπλών μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance) κατά, ANOVA με εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών κατά Turkey (Turkey's post hoc test). Οι συγκρίσεις μεταξύ δύο μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Τυχόν διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για τιμές του p που ήταν μικρότερες από 0,05.

## 2.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.1 Σχετική χημική συγγένεια πρόσδεσης στους ERα και ERβ1

Οι τιμές της σχετικής χημικής συγγένειας πρόσδεσης (ΣΧΧΠ) των νέων αναλόγων της ραλοξιφαίνης στους υποδοχείς ERα και ERβ1 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**. Η μέτρηση της ΣΧΧΠ έγινε με πολωσιμετρία φθορισμού. Η οιστραδιόλη θεωρείται ότι έχει την ίδια ικανότητα πρόσδεσης και στους δυο υπότυπους του ER, ERα και ERβ1 (ΣΧΣΠα = ΣΧΣΠβ1 = 100). Όλα τα προς εξέταση νέα αντιστρογόνα έχουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στον ERα σε σχέση με τον ERβ. Τη μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για τον ERα ((ΣΧΣΠα / ΣΧΣΠβ1 ή απλά α / β) εμφανίζει το ανάλογο DP22 (α/β = 119). Η επιλεκτικότητα για τον ERα των υπολοίπων DP αναλόγων κυμαίνεται μεταξύ 2 και 25 και των GL αναλόγων μεταξύ 7,2 (GL350) και 1,3. Η ραλοξιφαίνη έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στον ERα και τον ERβ

από τα υπόλοιπα αντιστρογόνα και εμφανίζει επιπλέον επιλεκτικότητα πρόσδεσης στον ERα ίση με 1,7. Η σειρά κατάταξης των αντιστρογόνων με βάση τιμές ΣΧΣΠα > 10% είναι:

Ραλοξιφαίνη > GL285 > DP22 > GL158 > GL308 > GL287 > GL298 > GL141 > GL353

Η σειρά κατάταξης των αντιστρογόνων με βάση τιμές ΣΧΣΠβ > 10% είναι:

Ραλοξιφαίνη > GL285 > GL287 > GL158 > GL141

Ενώσεις	RBAα	RBAβ	α/β
E2	100	100	
RAL	62,9 ± 14,3	37,9 ± 25,7	1,70
DP17	5,77 ± 1,20	0,23 ± 4	2,00
DP18	2,66 ± 0,24	0,12 ± 6	22,00
DP21	0,77 ± 0,16	0,37 ± 0,15	25,00
DP22	32,1 ± 12,8	0,27 ± 0,10	119,00
GL 141	13,51 ± 3,04	10,38 ± 1,02	1,30
GL 158	28,56 ± 3,44	21,04 ± 3,07	1,40
GL 285	46,61 ± 3,61	23,46 ± 2,48	2,00
GL 287	20,51 ± 0,69	15,87 ± 2,22	1,30
GL 297	6,51 ± 2,02	3,48 ± 0,54	1,90
GL 298	13,68 ± 2,45	5,51 ± 1,83	2,50
GL 308	23,45 ± 2,45	6,17 ± 0,98	3,80
GL 310	8,01 ± 1,56	1,69 ± 0,31	4,70
GL 349	6,33 ± 2,11	0,98 ± 0,15	6,50
GL 350	6,64 ± 2,63	0,92 ± 0,38	7,20
GL 351	5,53 ± 1,66	1,48 ± 0,24	3,70
GL 352	5,08 ± 1,61	1,55 ± 0,22	3,30
GL 353	12,45 ± 4,84	6,52 ± 0,75	1,90

**Πίνακας 1:** Σχετική χημική συγγένεια πρόσδεσης των ανταγωνιστών στους ERα και ERβ1 και επιλεκτικότητα πρόσδεσης στον ERα. α/β = ΣΧΣΠα / ΣΧΣΠβ1.

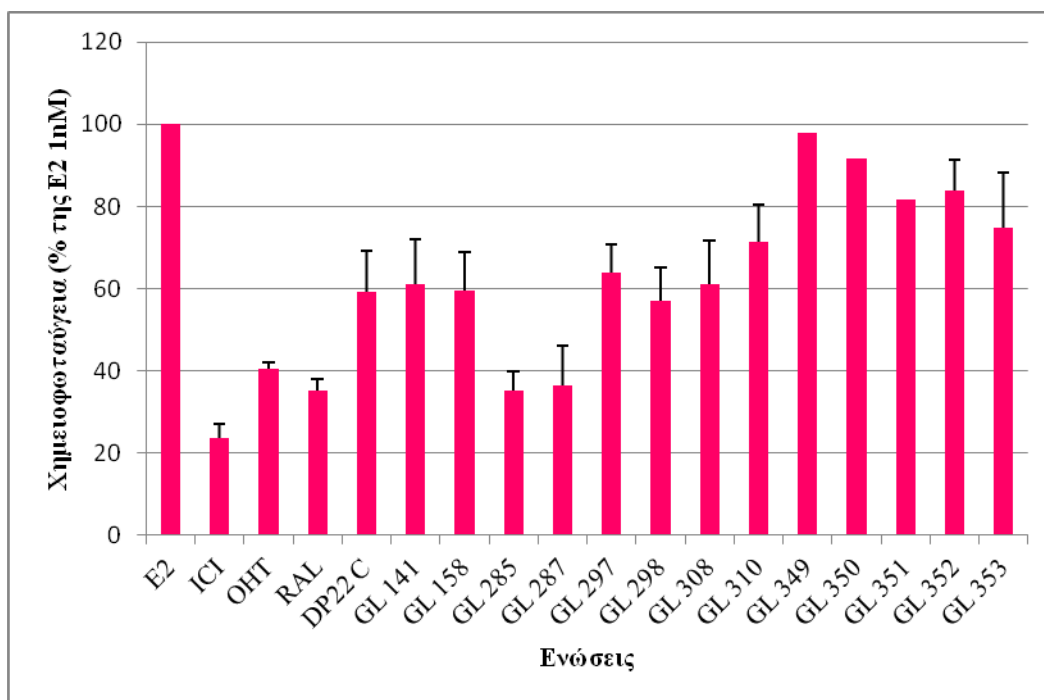
## 2.2 Επαγωγή ενός ERE-ελεγχόμενου γονιδίου αναφοράς

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση των ανταγωνιστών στον ERα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MCF-7:D5L. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 σταθερά διαμολυσμένα με το γονίδιο αναφοράς ERE-Glob-Luc. Στα κύτταρα αυτά η έκφραση λουσιφεράσης ελέγχεται από τον ενδογενή ERα μέσω ERE

και του υποκινητή του γονιδίου της γλοβίνης (Glob). Προκειμένου να μελετηθεί η δράση των ανταγωνιστών στον ERβ1 χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK:ERβ1. Τα κύτταρα αυτά παρήχθησαν μετά από σταθερή διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 με πλασμίδιο έκφρασης του ERβ1 καθώς και με το γονίδιο αναφοράς ERE-TK-Luc. Στα κύτταρα αυτά η έκφραση λουσιφεράσης ελέγχεται από το διαμολυσμένο ERβ1 μέσω ERE τοποθετημένου αναροϊκά του υποκινητή του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης (Thymidine Kinase, TK).

Χρησιμοποιώντας τα κύτταρα MCF-7:D5L και HEK:ERβ1 προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα των αναλόγων της ραλοξιφαίνης να καταστέλλουν την επαγόμενη από την οιστραδιόλη (1 και 0,1 nM) λουσιφεράση μέσω ERα και ERβ1. Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκέντρωση 1 μM να ανταγωνίζονται την επαγωγή της λουσιφεράσης στη κυτταρική σειρά MCF-7:D5L παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των γνωστών αντιστρογόνων, ICI182,780 (ICI), ταμοξιφαίνη (OHT) και ραλοξιφαίνη (RAL), επίσης σε συγκέντρωση 1 μM. Το ICI φαίνεται να προκαλεί τη μεγαλύτερη καταστολή της έκφρασης της λουσιφεράσης. Τα αντιστρογόνα χωρίζονται σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (60%) και τα σχετικά λιγότερο αποτελεσματικά. Η κατασταλτική αποτελεσματικότητα των ισχυρότερων αντιστρογόνων ακολουθεί τη σειρά: ICI > OHT  $\approx$  RAL  $\approx$  GL285  $\approx$  GL287

Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιστρογόνων στην κυτταρική σειρά MCF-7:D5L παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 2).

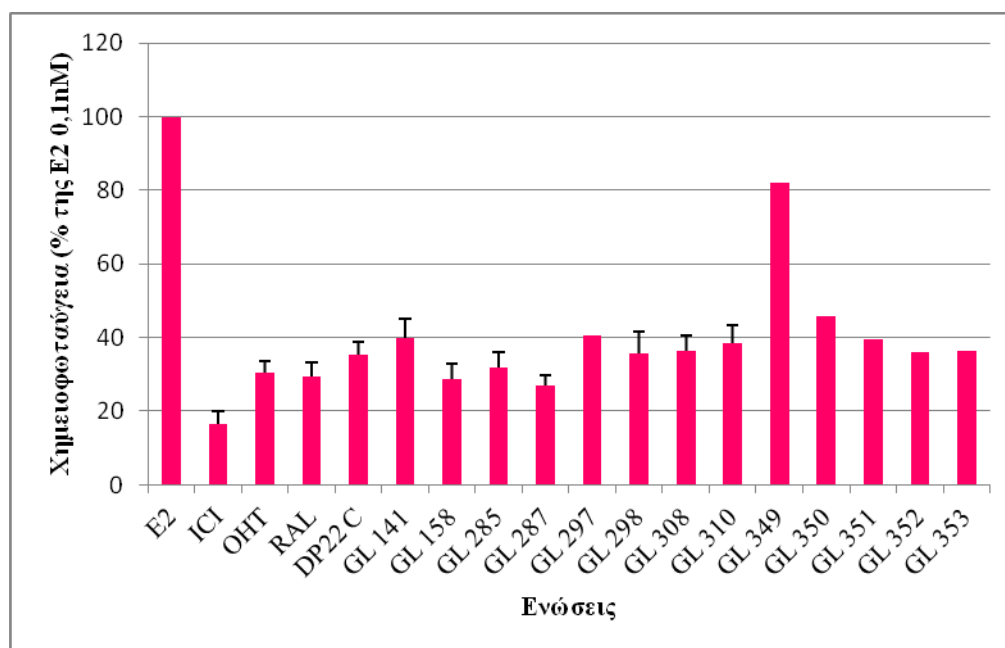


Εικόνα 9: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% FBS. Μετά από 72 h καλλιέργειας γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 16-20 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην § 1.2.1.4. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1  $\mu$ M, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1  $\mu$ M.

Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M να ανταγωνίζονται την επαγωγή της λουσιφεράσης στην κυτταρική σειρά MCF-7:D5L παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M. Τα αντιοιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (~70%) και τα σχετικά λιγότερο αποτελεσματικά. Η κατασταλτική αποτελεσματικότητα των ισχυρότερων

αντιοιστρογόνων ακολουθεί τη σειρά: ICI > OHT ≈ RAL ≈ GL158 ≈ GL285 ≈ GL287.

Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιοιστρογόνων στην κυτταρική σειρά MCF-7:D5L παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 3).

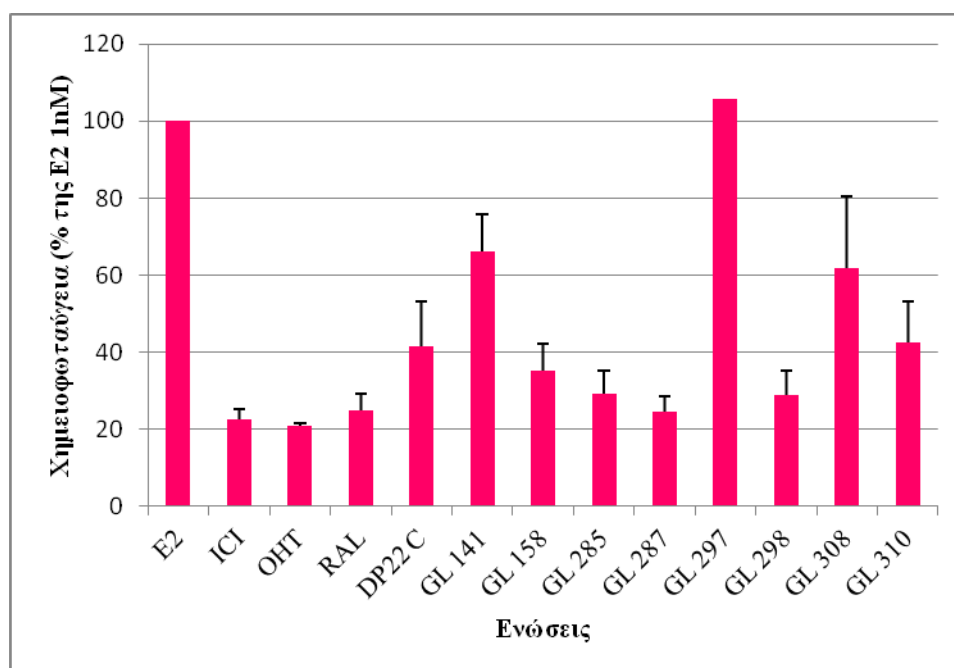


Εικόνα 10: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM απουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% FBS. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην **Εικόνα 9**. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0,1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1 μM, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1 μM, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1 μM. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1 μM.

Στην **Εικόνα 11** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκέντρωση 1 μM να ανταγωνίζονται την επαγωγή της λουσιφεράσης στην κυτταρική σειρά HEK:ERβ1 παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1 μM. Τα αντιοιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με

κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (~80%) και τα σχετικά λιγότερο αποτελεσματικά. Η κατασταλτική αποτελεσματικότητα των ισχυρότερων αντιοιστρογόνων ακολουθεί τη σειρά: ICI  $\approx$  OHT  $\approx$  RAL  $\approx$  GL285  $\approx$  GL287  $\approx$  GL298.

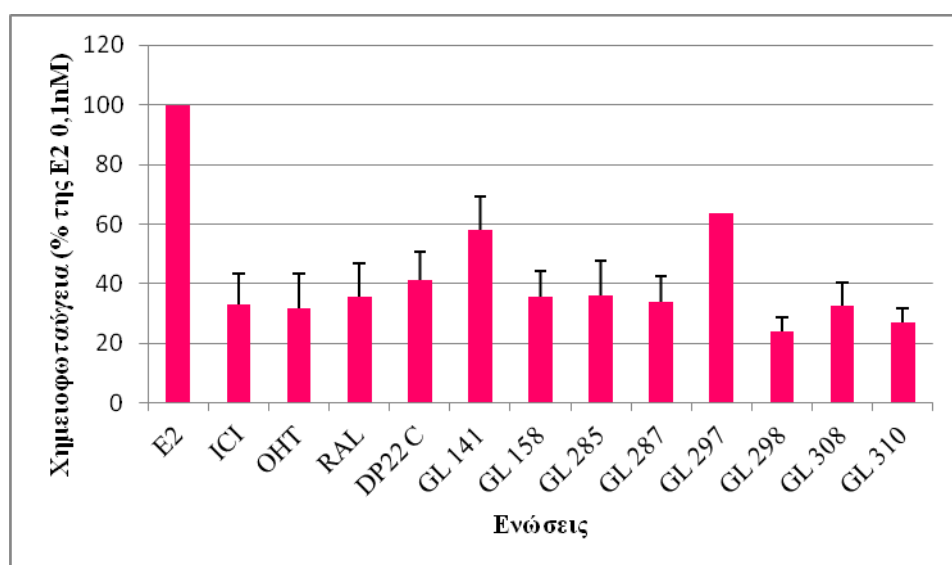
Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιοιστρογόνων στη κυτταρική σειρά HEK:ERβ1 παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 4).



Εικόνα 11: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% FBS. Μετά από 72 h καλλιέργειας γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 16-20 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης λουσιφεράσης όπως περιγράφεται στην § 1.2.1.4. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1  $\mu$ M, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1  $\mu$ M.

Στην **Εικόνα 12** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  να ανταγωνίζονται την επαγωγή της λουσιφεράσης στην κυτταρική σειρά HEK:ERβ1 παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$ . Τα αντιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT και τα σχετικά λιγότερο αποτελεσματικά. Η κατασταλτική αποτελεσματικότητα των ισχυρότερων αντιστρογόνων ακολουθεί τη σειρά: ICI  $\approx$  OHT  $\approx$  RAL  $\approx$  DP22  $\approx$  GL158  $\approx$  GL285  $\approx$  GL287  $\approx$  GL298  $\approx$  GL308  $\approx$  GL310.

Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιστρογόνων στη κυτταρική σειρά HEK:ERβ1 παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 5).



**Εικόνα 12: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1.** Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην Εικόνα 11. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0,1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1  $\mu\text{M}$ , OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu\text{M}$ , RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu\text{M}$ . Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1  $\mu\text{M}$ .



### 2.3. Προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των αντιστρογόνων να παρεμποδίζουν τη μιτογονική δράση των οιστρογόνων στα μαστικό επιθήλιο, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού). Προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα των αντιστρογόνων να καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7 παρουσία οιστραδιόλης σε συγκέντρωση 1 και 0,1 nM.

Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M να ανταγωνίζονται τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF7 παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M. Τα αντιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (~50%) και τα λιγότερο αποτελεσματικά. Η αποτελεσματικότητα των ισχυρότερων αντιστρογόνων ακολουθεί τη σειρά: ICI > RAL  $\approx$  GL287 > GL285 > OHT  $\approx$  GL310.

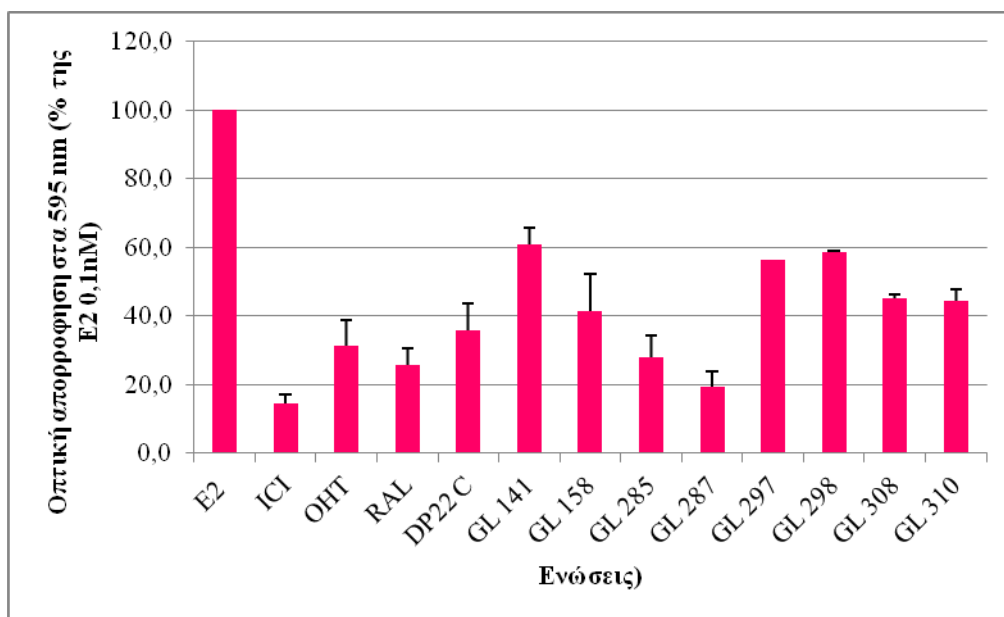
Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιστρογόνων στη κυτταρική σειρά MCF7 παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 8).



Εικόνα 13: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα MCF-7. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός παρουσία E2 0,1 nM. Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 72 h. Μετά το πέρας των 72h, γίνεται επαναρρόφιση των ήδη υπάρχουσών ενώσεων και προστίθενται νέες. Ακολουθεί επώαση 72h και στη συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως περιγράφεται στην § 1.2.1.3. Η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκφράζεται ως το ποσοστό αυτού που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1  $\mu$ M, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1  $\mu$ M.

Στην **Εικόνα 14** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M να ανταγωνίζονται τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF7 παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M. Τα αντιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (~70%) και τα λιγότερο αποτελεσματικά. Η αποτελεσματικότητα των πρώτων ακολουθεί τη σειρά:  $ICI \geq GL287 \approx RAL \approx OHT \approx GL285 \approx DP22 \approx GL158$ .

Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιστρογόνων στη κυτταρική σειρά MCF7 παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 9).



Εικόνα 14: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα MCF-7. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 13. Η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκφράζεται ως το ποσοστό αυτού που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0,1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1  $\mu$ M, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1  $\mu$ M.

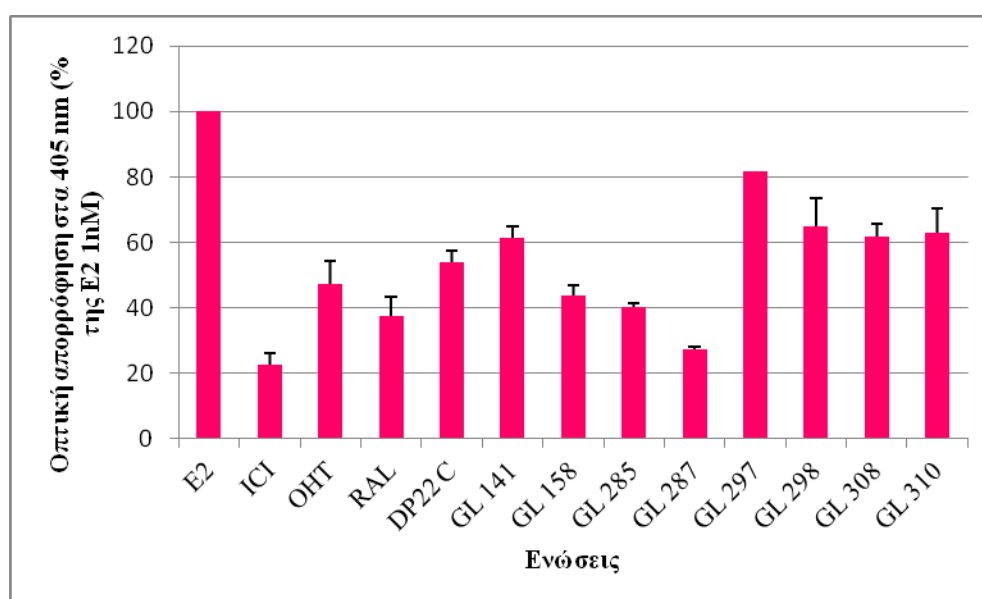
#### 2.4. Επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa

Για να αξιολογηθεί η οιστρογονική δράση των ανταγωνιστών του ER, επίσης, εξετάστηκε η ρύθμιση της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, AlkP) στα κύτταρα Ishikawa (αδenoκαρκίνωμα του ενδομητρίου ανθρώπου). Η επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης σε αυτά τα κύτταρα από μια ένωση θεωρείται δείκτης της εγγενούς οιστρογονικής δράσης της υπό εξέταση ένωσης, ενώ η καταστολή της επαγωγής της από την οιστραδιόλη θεωρείται δείκτης αντιστρογονικής δράσης της ένωσης (Markiewicz, 1993). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 7 και 8, η δράση των ανταγωνιστών δεν είναι εντελώς ανάλογη με αυτή που παρατηρήθηκε στα κύτταρα MCF-7:D5L, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς η

οιστρογονική δράση στα κύτταρα αυτά δεν βασίζεται μόνο στον ERα αλλά και στον ERβ1, όπως έχει προταθεί από τους Johnson και συνεργάτες (2007).

Στην **Εικόνα 15** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκ 1  $\mu\text{M}$  να ανταγωνίζονται την επαγωγή αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$ . Τα αντιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (~50%) και τα λιγότερο αποτελεσματικά. Η αποτελεσματικότητα των πρώτων ακολουθεί τη σειρά:  $\text{ICI} \geq \text{GL287} > \text{RAL} \approx \text{GL158} \approx \text{GL285} \approx \text{OHT} \approx \text{DP22}$ .

Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιστρογόνων στη κυτταρική σειρά Ishikawa παρουσία 1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 6).

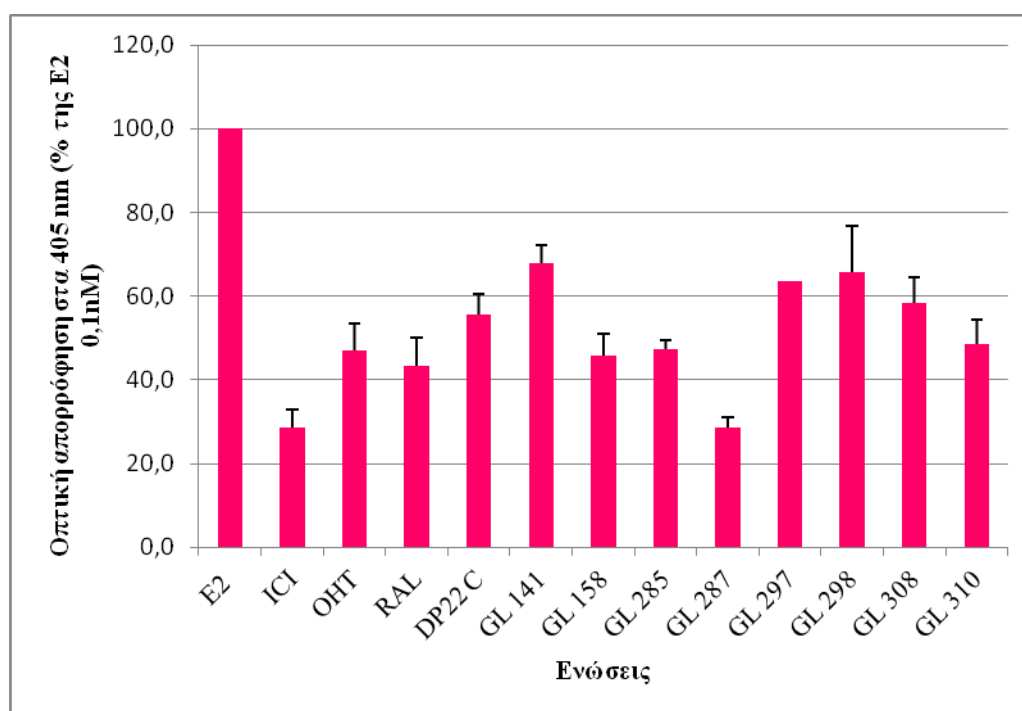


**Εικόνα 15: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa.** Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό MEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης εμπλουτισμένο με 5% FBS . Μετά από 24 h γίνεται η προσθήκη των ενώσεων και ακολουθεί επώαση 72 h. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται προσδιορισμός της έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης όπως περιγράφεται στην § 1.2.1.5. Η ενεργότητα της αλκαλικής

φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1  $\mu$ M, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1  $\mu$ M. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1  $\mu$ M.

Στην **Εικόνα 16** παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα των νέων αναλόγων σε συγκ 1  $\mu$ M να ανταγωνίζονται την επαγωγή αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των ICI, OHT και RAL, επίσης σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M. Τα αντιστρογόνα χωρίζονται και εδώ σε δυο ομάδες: τα πρώτης γραμμής με κατασταλτική αποτελεσματικότητα  $\geq$  της OHT (~50%) και τα λιγότερο αποτελεσματικά. Η αποτελεσματικότητα των πρώτων ακολουθεί τη σειρά: ICI  $\approx$  GL287 > RAL  $\approx$  OHT  $\approx$  GL158  $\approx$  GL285  $\approx$  DP22.

Η ακριβής κατασταλτική αποτελεσματικότητα όλων των γνωστών και νέων αντιστρογόνων στη κυτταρική σειρά Ishikawa παρουσία 0,1 nM οιστραδιόλης σε σχέση με αυτή του ICI παρουσιάζεται στον Πίνακα 2 (στήλη 7).



Εικόνα 16: Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 15. Η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. E2 = οιστραδιόλη σε συγκέντρωση 0,1 nM, ICI = ICI182,780 σε συγκ. 1 μM, OHT = ταμοξιφαίνη σε συγκ. 1 μM, RAL = ραλοξιφαίνη σε συγκ. 1 μM. Όλα τα ανάλογα της ραλοξιφαίνης σε συγκ. 1 μM.

Ο πίνακας 2 συνοψίζει τα αποτελέσματα από τα πειράματα που περιγράφονται στις προηγούμενες εικόνες (1-9) και απεικονίζει την κατάταξη των αναλόγων της ραλοξιφαίνης ως προς την κατασταλτική τους αποτελεσματικότητα στις 4 κυτταρικές σειρές (MCF-7:D5L, HEK:ERβ, MCF-7 και Ishikawa). Οι ουσίες αξιολογήθηκαν ως πλήρεις ανταγωνιστές (75-100%), μερικοί ανταγωνιστές (>25 & <75%) και ασθενείς ανταγωνιστές (≤ 25%).

Παρουσία προεμμηνοπαυσιακής συγκέντρωσης οιστραδιόλης (1nM) κατατάσσονται ως πλήρεις ανταγωνιστές βάσει της δράσης στις 4 κυτταρικές σειρές:

Ταμοξιφαίνη: MCF-7:D5L και HEK:ERβ

Ραλοξιφαίνη, GL285 & GL287: MCF-7:D5L, HEK:ERβ, MCF7 και Ishikawa

GL158, GL298 & GL310: HEK:ERβ

DP22 και τα υπόλοιπα ανάλογα GL: σε καμιά

Παρουσία μετεμμηνοπαυσιακής συγκέντρωσης οιστραδιόλης (0,1nM) κατατάσσονται ως πλήρεις ανταγωνιστές βάσει της δράσης στις 4 κυτταρικές σειρές:

Ταμοξιφαίνη, DP22, GL298, GL308: MCF-7:D5L και HEK:ERβ

Ραλοξιφαίνη, GL285 & GL287: MCF-7:D5L, HEK:ERβ, MCF7 και Ishikawa

GL158, GL310: MCF-7:D5L, HEK:ERβ, Ishikawa

Τα υπόλοιπα ανάλογα GL: σε καμιά

Ενώσεις	Έκφραση Λουσιφεράσης (MCF-7:D5L)		Έκφραση Λουσιφεράσης (HEK:ERβ)		Έκφραση ΑλκΦ (Ishikawa)		Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός (MCF-7)	
	Ανταγωνισμός (% του ICI 1 μM)				Ανταγωνισμός (% του ICI 1 μM)			
	Οιστραδιόλη (1nM)	Οιστραδιόλη (0,1nM)	Οιστραδιόλη (1nM)	Οιστραδιόλη (0,1nM)	Οιστραδιόλη (1nM)	Οιστραδιόλη (0,1nM)	Οιστραδιόλη (1nM)	Οιστραδιόλη (0,1nM)
ICI 182,780	100	100	100	100	100	100	100	100
OHT	77,95 ± 3,67 (π)	84,46 ± 0,90 (π)	99,03 ± 0,55 (π)	98,27 ± 0,92 (π)	71,05 ± 9,99 (π)	73,78 ± 5,58 (μ)	62,15 ± 0,07 (μ)	80,36 ± 6,26 (π)
RAL	84,86 ± 3,18 (π)	84,28 ± 1,29 (π)	96,74 ± 2,79 (π)	95,44 ± 3,57 (π)	80,32 ± 4,01 (π)	78,82 ± 4,58 (π)	86,83 ± 4,43 (π)	86,63 ± 2,59 (π)
DP22 C	52,57 ± 12,11 (μ)	77,14 ± 1,11 (π)	74,27 ± 10,96 (μ)	88,80 ± 7,61 (π)	59,86 ± 4,84 (μ)	61,98 ± 4,91 (μ)	55,24 ± 2,57 (μ)	74,70 ± 6,13 (π)
GL 141	50,28 ± 12,55 (μ)	72,82 ± 3,17 (μ)	43,78 ± 10 (μ)	54,85 ± 10,30 (π)	50,12 ± 5,28 (μ)	47,46 ± 6,61 (μ)	29,91 ± 3,61 (μ)	46,81 ± 4,93 (μ)
GL 158	52,17 ± 11,07 (μ)	85,06 ± 1,76 (π)	84,07 ± 8,68 (π)	97,23 ± 2,46 (π)	73,04 ± 5,61 (μ)	75,80 ± 4,49 (π)	48,14 ± 5,37 (μ)	67,90 ± 9,33 (μ)
GL 285	84,72 ± 5,69 (π)	81,33 ± 1,60 (π)	91,04 ± 4,58 (π)	94,51 ± 3,78 (π)	77,34 ± 8,20 (π)	74,31 ± 3,36 (μ)	79,63 ± 1,27 (π)	84,09 ± 4,41 (π)
GL 287	82,76 ± 12,16 (π)	85,87 ± 0,96 (π)	95,00 ± 5,22 (π)	106,98 ± 5,73 (π)	98,31 ± 4,33 (π)	97,31 ± 2,96 (π)	84,64 ± 0,91 (π)	92,49 ± 1,47 (π)
GL 297	44,78 ± 6,38 (μ)	69,83 ± 4,47 (μ)	0	61,96 (μ)	21,82 (α)	51,17 (μ)	12,67 (α)	50,51 (μ)
GL 298	55,08 ± 9,68 (μ)	77,94 ± 4,59 (π)	88,98 ± 7,38 (π)	93,40 ± 5,73 (π)	47,12 ± 7,43 (μ)	51,72 ± 11,59 (μ)	30,26 ± 1,71 (μ)	50,43 ± 0,62 (μ)
GL 308	50,39 ± 12,26 (μ)	77,16 ± 2,26 (π)	48,75 ± 8,00 (μ)	91,08 ± 2,58 (μ)	49,66 ± 5,63 (μ)	61,32 ± 8,99 (μ)	40,34 ± 7,49 (μ)	65,64 ± 1,01 (μ)
GL 310	36,21 ± 8,00 (μ)	74,61 ± 2,87 (π)	74,92 ± 10,00 (π)	99,54 ± 5,99 (π)	48,87 ± 8,26 (μ)	75,50 ± 7,53 (π)	60,90 ± 9,00 (μ)	67,64 ± 4,52 (μ)
GL 349	2,38 (α)	20,28 (α)						
GL 350	10,13 (α)	60,99 (μ)						
GL 351	22,03 (α)	68,05 (μ)						
GL 352	19,88 ± 4,00 (α)	72,31 (π)						
GL 353	30,84 ± 6,00 (μ)	71,81 (π)						

Πίνακας 2: Αποτελεσματικότητα καταστολής της δράσης της οιστραδιόλης από γνωστά και νέα αντιστρογόνα. Η καταστολή της επαγόμενης από την οιστραδιόλη (E2, 0,1 και 1 nM ) δράσης (Δ) από την υπό εξέταση ένωση σε συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M, υπολογίστηκε σε σχέση με αυτήν του ICI182,780 (1 μM) ως εξής:  $(\Delta_{E2} - \Delta_{E2 + \text{ένωση}}) * 100 / (\Delta_{E2} - \Delta_{E2 + \text{ICI}})$ . Ο ανταγωνισμός καταχωρήθηκε ως πλήρης (π), μερικός (μ) ή ασθενής (α) ανάλογα με το αν η καταστολή της επαγωγής από την E2 ήταν αντίστοιχα 75-100, <75 και >25 ή ≤ 25% αυτής που παρατηρείται στην

παρουσία  $10^{-6}$  M ICI182,780. Οι τιμές είναι μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα.

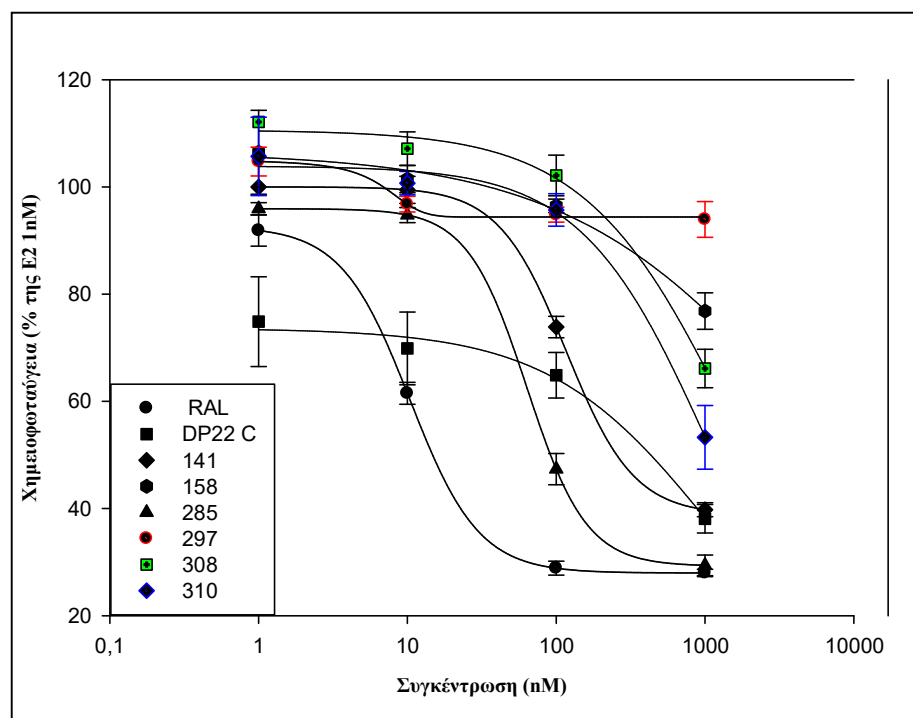
(π): πλήρης

(μ): μερικός

(α): ασθενής

Στη συνέχεια έγιναν πειράματα δοσοαπόκρισης στις τέσσερις κυτταρικές σειρές με τα επιλεγμένα αντιστρογόνα παρουσία οιστραδιόλης 1 και 0,1 nM προκειμένου να μετρηθεί η κατασταλτική τους ικανότητα (IC50), δηλ. η συγκέντρωση στην οποία προκαλούν 50% καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης.

Στην **Εικόνα 17** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ένωση GL285 φαίνεται να προκαλεί καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM, συγκέντρωση στην οποία η ραλοξιφαίνη προκαλεί πλήρη καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 9 παρουσιάζονται στη 4<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.

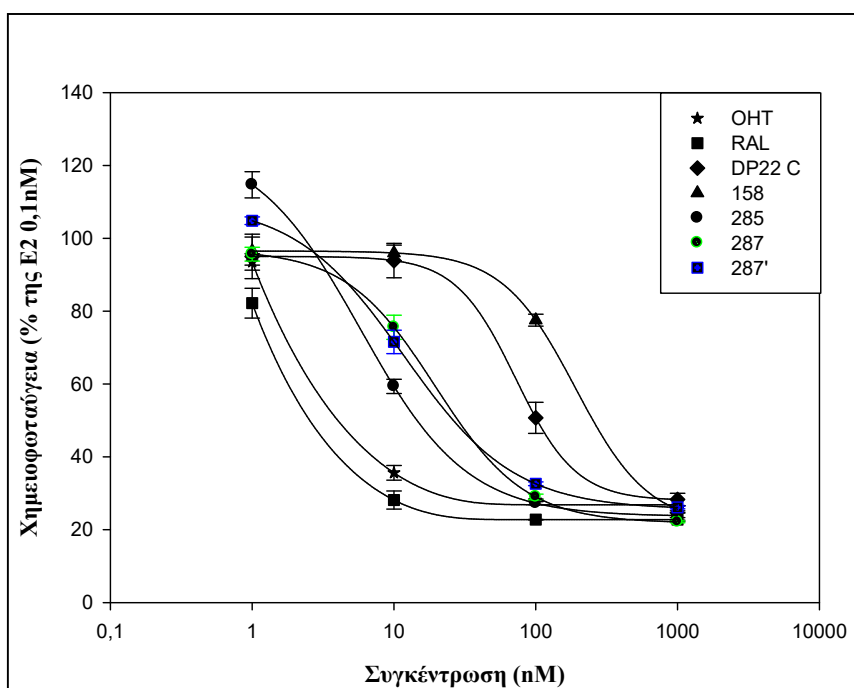


**Εικόνα 17:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα MCF-7:D5L. Ακολουθήθηκε η



πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 9. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ, από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

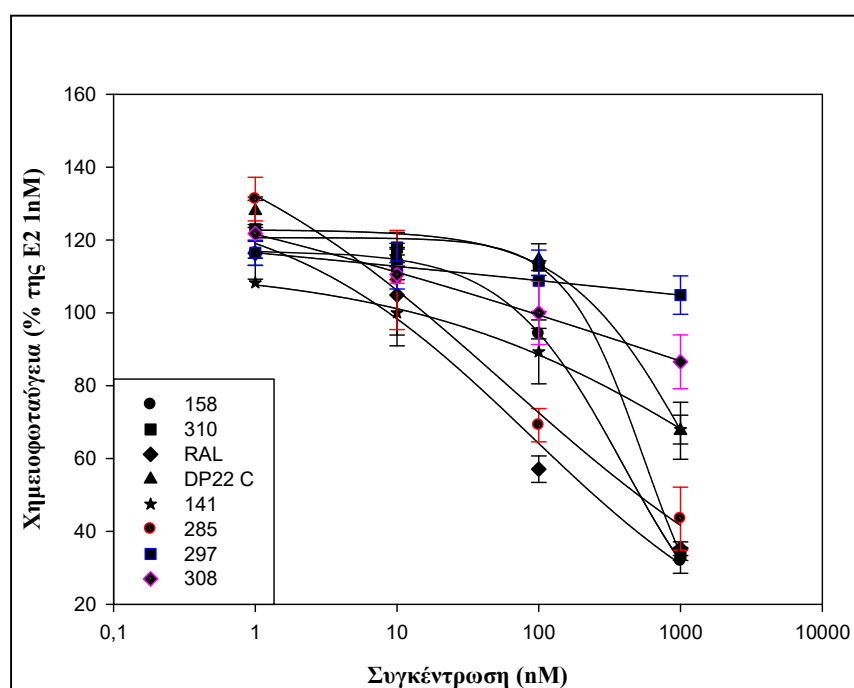
Στην **Εικόνα 18** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα MCF-7:D5L, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ενώσεις GL285 και GL287 φαίνεται να προκαλούν καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 10 παρουσιάζονται στη 2<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



**Εικόνα 18:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα MCF-7:D5L. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 9. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation). Οι δυο δοσοαποκρίσεις του GL287

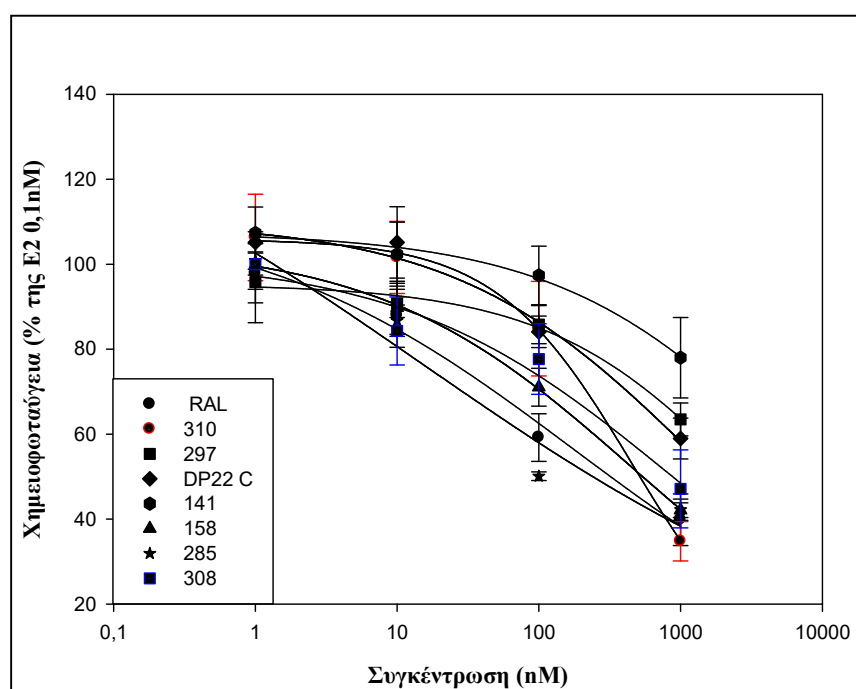
που παρουσιάζονται δείχνουν την απόκλιση μετρήσεων μεταξύ δυο διαφορετικών πειραμάτων (interassay variation).

Στην **Εικόνα 19** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα HEK:ERβ ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Καμιά από τις νέες ενώσεις δεν φαίνεται να προκαλεί καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 11 παρουσιάζονται στη 8<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



**Εικόνα 19:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 11. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

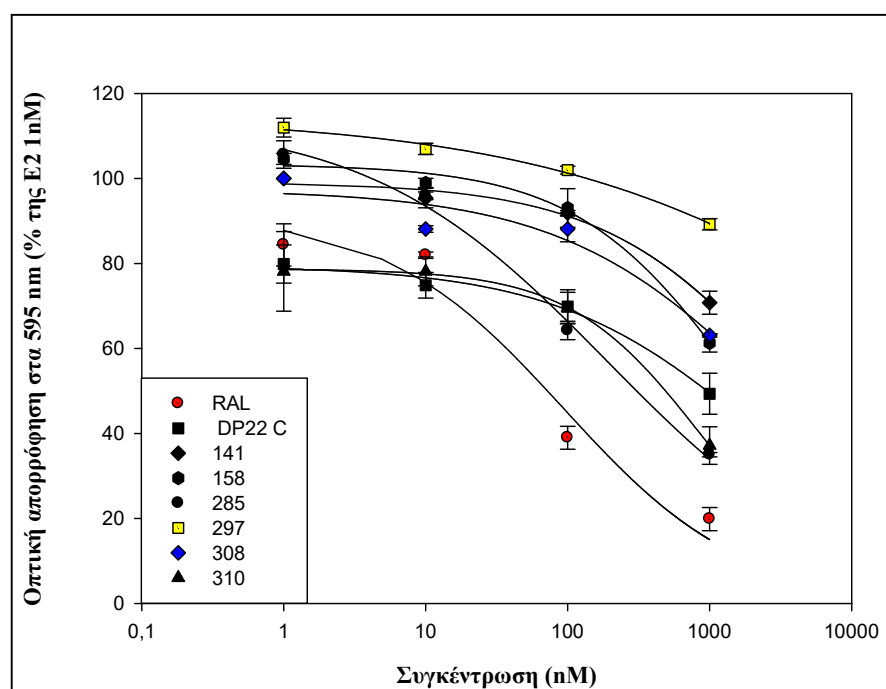
Στην **Εικόνα 20** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης, στα κύτταρα HEK:ERβ ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ένωση GL285 φαίνεται να προκαλεί καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 12 παρουσιάζονται στη 6<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



**Εικόνα 20:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της έκφρασης λουσιφεράσης στα κύτταρα HEK:ERβ1. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 11. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

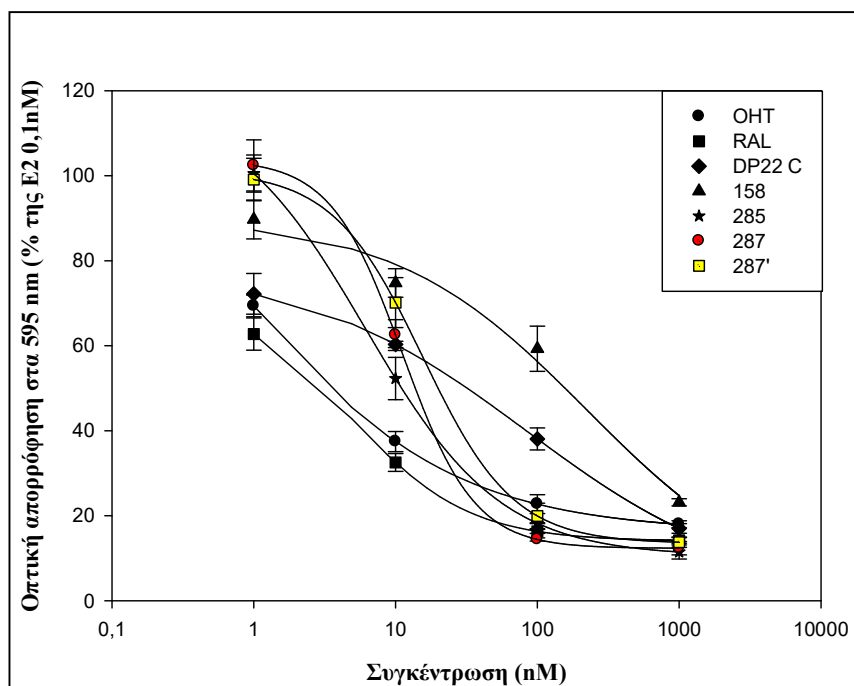
Στην **Εικόνα 21** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα MCF7 ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Καμιά ένωση δεν φαίνεται να προκαλεί

καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 13 παρουσιάζονται στη 16<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



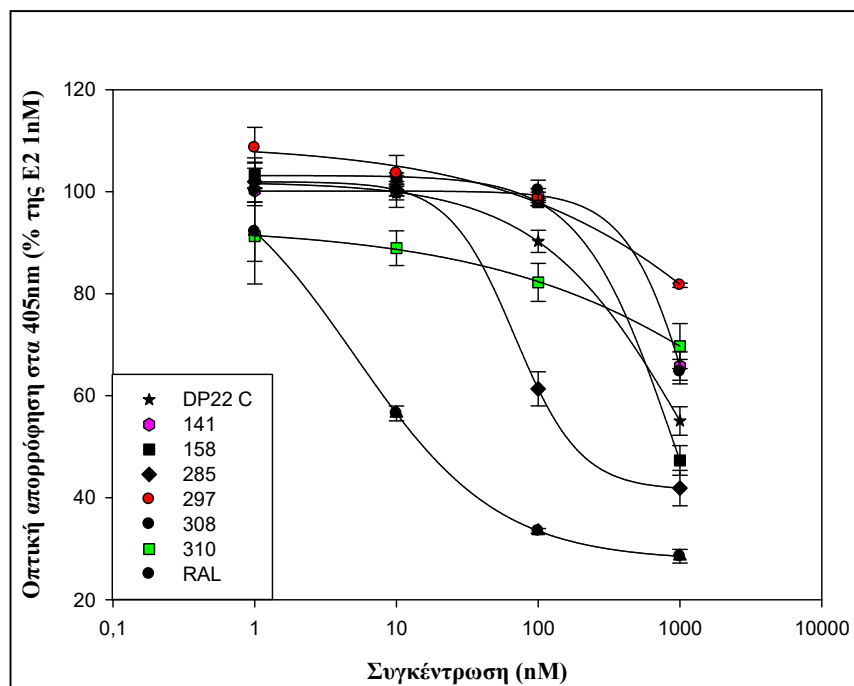
**Εικόνα 21:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα MCF-7. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 13. Η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Στην **Εικόνα 22** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα MCF7 ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ενώσεις GL285, GL287 & DP22 φαίνεται να προκαλούν καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 14 παρουσιάζονται στη 14<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



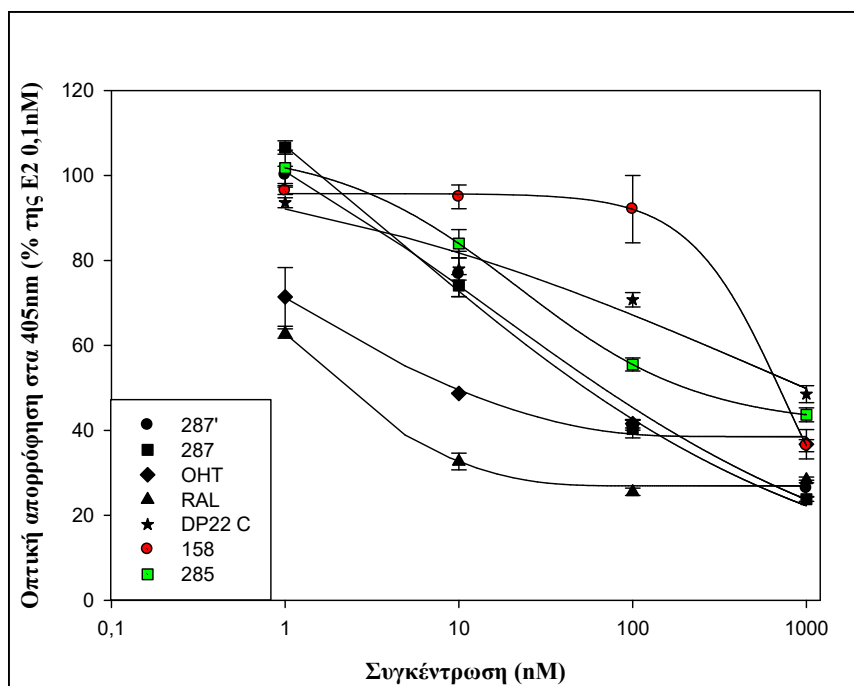
**Εικόνα 22:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα MCF-7. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 13. Η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation). Οι δυο δοσοαποκρίσεις του GL287 που παρουσιάζονται δείχνουν την απόκλιση μετρήσεων μεταξύ δυο διαφορετικών πειραμάτων (interassay variation).

Στην **Εικόνα 23** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Καμιά ένωση δεν φαίνεται να προκαλεί καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκέντρωση  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 15 παρουσιάζονται στη 12<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



**Εικόνα 23:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (1 nM) στην επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα *Ishikawa*. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 15. Η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (1 nM). Μέση τιμή  $\pm$  ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation).

Στην **Εικόνα 24** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα δοσοαπόκρισης όπου εξετάζεται η καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα *Ishikawa* ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανταγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ενώσεις GL285 & GL287 φαίνεται να προκαλούν καταστολή  $\geq 50\%$  σε συγκ  $\leq 100$  nM. Τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ανάλογων αυτού της εικόνας 16 παρουσιάζονται στη 10<sup>η</sup> στήλη του Πίνακα 3.



**Εικόνα 24:** Ανταγωνισμός της δράσης της οιστραδιόλης (0,1 nM) στην επαγωγή της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα Ishikawa. Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην εικόνα 15. Η έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται ως ποσοστό αυτής που παρατηρείται παρουσία μόνο οιστραδιόλης (0,1 nM). Μέση τιμή ± ΣΣΜΤ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες μετρήσεις στο ίδιο πείραμα (intrassay variation). Οι δυο δοσοαποκρίσεις του GL287 που παρουσιάζονται δείχνουν την απόκλιση μετρήσεων μεταξύ δυο διαφορετικών πειραμάτων (interassay variation).

Με βάση τα πειράματα δοσοαπόκρισης που έγιναν υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub> των ενώσεων που εξεταστήκαν και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η σχετική κατασταλτική τους ικανότητα σε σύγκριση με τη ραλοξιφαίνη καθώς τα ανάλογα που αξιολογήθηκαν ήταν ανάλογα της ραλοξιφαίνης (Πίνακας 3). Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> μιας ένωσης, τόσο μικρότερη συγκέντρωση της εν λόγω ένωσης απαιτείται ώστε να προκαλέσει καταστολή. Όσο μεγαλύτερη η σχετική ικανότητα, τόσο ικανότερη είναι η ένωση σε σχέση με τη ραλοξιφαίνη. Από τα αποτελέσματα σχετικής ικανότητας του Πίνακα 3 προκύπτει ότι μόνο τα ανάλογα GL285 & GL287 εμφανίζουν μεγαλύτερη κατασταλτική ικανότητα από τη ραλοξιφαίνη στα κύτταρα HEK:ERβ (GL285) και MCF7 (GL285 & GL287).

Ενώσεις	Έκφραση Λουσιφεράσης								Έκφραση Αλκαλικής Φοσφατάσης				Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός			
	MCF-7:D5L				HEK:ERβ				Κύτταρα Ishikawa				Κύτταρα MCF-7			
	Οιστραδιόλη (0,1nM)		Οιστραδιόλη (1nM)		Οιστραδιόλη (0,1nM)		Οιστραδιόλη (1nM)		Οιστραδιόλη (0,1nM)		Οιστραδιόλη (1nM)		Οιστραδιόλη (0,1nM)		Οιστραδιόλη (1nM)	
	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>	IC50 <sup>a</sup> (nM)	Σχετική ικανότητα <sup>b</sup>
OHF	3,19	0,75							5	0,60			5,00	5,20		
RAL	3,56 ± 0,83	1,00	10,74	1,00	31,28 ± 11,05	1,00	95,60	1,00	2,95 ± 1,13	1,00	9,00	1,00	26,37 ± 14,64	1,00	44,00	1,00
DP22 C	134,58 ± 26,80	0,03	187,68	0,06	354,40 ± 28,83	0,09			291,72 ± 3,38	0,01	874,00	0,01	38,08 ± 10,14	0,68	457,00	0,10
GL141	251,00	0,02	168,49	0,07									641,00	0,04		
GL158	176,40 ± 22,17	0,02			120,04 ± 29,44	0,26	509,36	0,19	328,79 ± 123,92	0,01	743,00	0,01	121,97 ± 2,25	0,21		
GL285	21,83 ± 5,87	0,18	69,15	0,16	19,47 ± 5,44	1,63	159,63	0,60	61,47 ± 3,37	0,05	115,00	0,08	18,72 ± 5,52	1,37	183,00	0,24
GL287	21,70 ± 0,68	0,18							28,31 ± 2,25	0,11			14,88 ± 1,49	1,73		
GL297	633,00	0,01			702,13 ± 141,38	0,04			957,00	0,00			968,00	0,03		
GL308	317,00	0,01			128,21 ± 10,85	0,24			614,00	0,00			450,00	0,06	297,00	0,15
GL310	667,14	0,01	805,84	0,01	203,91 ± 6,40	0,15			270,00	0,01			317,00	0,84		

Πίνακας 3: Ικανότητα (IC50) και σχετική κατασταλτική ικανότητα των αντιστρογόνων να καταστέλουν τη δράση της οιστραδιόλης σε σύγκριση με τη ραλοξιφαίνη.

IC50 είναι η συγκέντρωση μιας ένωσης που είναι ικανή να προκαλέσει καταστολή της δράσης της οιστραδιόλης κατά 50%.

Η σχετική κατασταλτική ικανότητα υπολογίστηκε ως (IC50 αντιστρογόνου / IC50 ραλοξιφαίνης).

Ο πίνακας 4 απεικονίζει την απόκλιση της κατασταλτικής ικανότητας και αποτελεσματικότητας των ενώσεων που μελετήθηκαν αναλυτικότερα (Πίνακες 2 & 3) υπέρ του ERβ στα κύτταρα HEK:ERβ σε σχέση με τον ERα στα κύτταρα MCF-7:D5L. Η ραλοξιφαίνη, και τα ανάλογα DP22 και GL285 φαίνονται να είναι 2-10 φορές περισσότερο ικανά στα κύτταρα MCF-7:D5L ενώ τα ανάλογα GL308 και GL310



φαίνεται να είναι ~ 3 φορές περισσότερο ικανά μέσω του ERβ. Τα περισσότερα νέα ανάλογα όπως και τα γνωστά αντιστρογόνα παρουσίασαν κάπως μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μέσω ERβ.

Ενώσεις	Απόκλιση Ρύθμισης της Γονιδιακής Έκφρασης μέσω ERβ vs μέσω ERα			
	HEK:ERβ / MCF-7:D5L			
	Απόκλιση Ικανότητας		Απόκλιση Αποτελεσματικότητας	
	Οιστραδιόλη (0,1nM)	Οιστραδιόλη (1nM)	Οιστραδιόλη (0,1nM)	Οιστραδιόλη (1nM)
OHT			1,17	1,27
RAL	0,13	0,11	1,13	1,14
DP22 C	0,38		1,16	1,40
GL 141			0,75	0,88
GL 158	1,47		1,14	1,62
GL 285	1,16	0,43	1,17	1,07
GL 287			1,24	1,14
GL 297	0,90		0,89	
GL 308	2,48		1,18	0,98
GL 310	3,27		1,33	2,08

Πίνακας 4: Απόκλιση της ικανότητας και της αποτελεσματικότητας των αντιστρογόνων να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω ERβ vs μέσω ERα.

Η απόκλιση κατασταλτικής ικανότητας υπέρ του ERβ υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

(IC50 στα κύτταρα MCF-7:D5L ) / (IC50 στα κύτταρα HEK:ERβ).

Η απόκλιση κατασταλτικής αποτελεσματικότητας υπέρ του ERβ υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

(% Ανταγωνισμός στα κύτταρα HEK:ERβ) / (% Ανταγωνισμός στα κύτταρα MCF-7:D5L)

### 3.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνδυαστική χρήση των τεσσάρων κυτταρικών σειρών ανέδειξε την ικανότητα τους να αναπαράγουν *in vitro* την αυξημένη αποτελεσματικότητα της ραλοξιφαίνης στην καταστολή της μιτογονικής δράσης της οιστραδιόλης στα επιθηλιακά κύτταρα μαστού και μήτρας που έχει καταγραφεί με σειρά κλινικών μελετών. Συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι, ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης, η ραλοξιφαίνη παρουσιάζει πλήρη κατασταλτική αποτελεσματικότητα και στα 4 κύτταρα ενώ η ταμοξιφαίνη δεν είναι πλήρως αποτελεσματική στα κύτταρα MCF7 και Ishikawa παρά το ότι είναι πλήρως αποτελεσματική στα MCF-7:D5L και HEK:ERβ. Με δεδομένο λοιπόν ότι τα 4 κύτταρα αναπαράγουν αξιόπιστα *in vitro* την κλινικά διαπιστωμένη μεγαλύτερη αντιοιστρογονική δράση της ραλοξιφαίνης σε σχέση με αυτή της ταμοξιφαίνης, το κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι 2 νέα ανάλογα (GL285 & GL287) εμφανίζουν το ίδιο υψηλή αποτελεσματικότητα με τη ραλοξιφαίνη παρουσία χαμηλών αλλά και υψηλών φυσιολογικών συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης (Πίνακας 2). Αυτό πιθανόν τους επιτρέπει να μιμηθούν τη δράση της ραλοξιφαίνης στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού και της οστεοπόρωσης στις γυναίκες τόσο πριν όσο και μετά την εμμηνόπαυση. Ας σημειωθεί ότι τα GL285 & GL287 εμφανίζουν αυξημένη κατασταλτική ικανότητα σε σχέση με τη ραλοξιφαίνη στα κύτταρα MCF7, εύρημα που προϋδεάζει για ακόμα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού σε σχέση με τη ραλοξιφαίνη.

Ένα δεύτερο εύρημα είναι ότι τα ανάλογα DP22, GL298, GL308 μπορούν να συγκριθούν με τη ραλοξιφαίνη ως προς την κατασταλτική αποτελεσματικότητα στα κύτταρα MCF-7:D5L και HEK:ERβ παρουσία χαμηλών αλλά όχι υψηλών συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης και με την ταμοξιφαίνη ως προς το ότι εμφανίζουν μειωμένη αποτελεσματικότητα στα κύτταρα MCF7 και Ishikawa (Πίνακας 2). Αυτό πιθανόν τους επιτρέπει να μιμηθούν τη δράση της ταμοξιφαίνης στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού και της οστεοπόρωσης στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση.

Ένα τρίτο εύρημα είναι ότι τα ανάλογα GL158 & GL310 εμφανίζουν πλήρη κατασταλτική αποτελεσματικότητα στα κύτταρα HEK:ERβ αλλά όχι στα MCF-7:D5L (Πίνακας 2) και απόκλιση ικανότητας υπέρ των HEK:ERβ (Πίνακας 4) παρά το ότι οι αντίστοιχες τιμές ΣΧΣΠα/ΣΧΣΠβ είναι 1,4 & 4,7 (Πίνακας 1), γεγονός που υποδηλώνει ότι η κατασταλτική δράση δεν συναρτάται μόνο με την ικανότητα

πρόσδεσης στον αντίστοιχο υποδοχέα αλλά και από άλλες παραμέτρους όπως π.χ η προσέλκυση αυξημένης ποσότητας από συμπαράγοντες.

Η συσχέτιση της αυξημένης ικανότητας και αποτελεσματικότητας των GL285 & GL287 δηλώνει ότι η αύξηση του όγκου του τελικού τμήματος της πλευρικής αλυσίδας χωρίς όμως εισαγωγή μιας δεύτερης κετονικής ομάδας ή μιας υδροξυλομάδας ή μιας ακεταμιδομάδας στη θέση 3' του βενζολικού πυρήνα της πλευρικής αλυσίδας προάγει την αντιστρογονική δράση μέσω των ERα και ERβ. Το ίδιο δεν παρατηρήθηκε όταν η ομάδα κετόνης της πλευρικής αλυσίδας αντικαταστάθηκε από 2 μεθυλομάδες ή από έναν κυκλοαλκανικό δακτύλιο (ανάλογα DP). Αξίζει όμως να σημειωθεί η πολύ υψηλή επιλεκτικότητα πρόσδεσης στον ERα που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της αντικατάστασης της ομάδας κετόνης από 4μελή κυκλοαλκανικό δακτύλιο (DP22).



#### 4.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bohen, S. P. et al. Hold 'em and fold 'em: chaperones and signal transduction. *Science* 1995, 268, 1303-4.
- Bolger, R. et al. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 1998, 106, 551-7.
- Brzozowski, A. M. et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997, 389, 753-8.
- Carson-Jurica, M. A. et al. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 1990, 11, 201-20.
- Cauley, J. A. et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat* 2001, 65, 125-34.
- Enmark, E. et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82, 4258-65.
- Feng, W. et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 1998, 280, 1747-9.
- Fisher, B. et al. Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996, 88, 1529-42.
- Fournier, A. et al. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer* 2005, 114, 448-54.
- Gougelet, A. et al. Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005, 94, 71-81.
- Gradishar, W. et al. Effects of high dose raloxifene in selected patients with advanced breast carcinoma. *Cancer* 2000, 88, 2047-53.
- Green, S. et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986, 320, 134-9.
- Grese, A. T. et al. Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 14105–14110, December 1997, Pharmacology.

- Hanf, V.; Gonder, U. Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, 123, 139-49.
- Howell, A. et al. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 2002, 20, 3396-403.
- Jaga, K.; Dharmani, C. The epidemiology of pesticide exposure and cancer: A review. *Rev Environ Health* 2005, 20, 15-38.
- Johnson, S. M. et al. Ishikawa cells exhibit differential gene expression profiles in response to oestradiol or 4-hydroxytamoxifen, *Endocr Relat Cancer* 2007, 14, 337-350.
- Klopper, A.; Hall, M. New synthetic agent for the induction of ovulation: preliminary trials in women. *Br Med J* 1971, 1, 152-4.
- Kuiper, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 5925-30.
- Kumar, V. et al. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987, 51, 941-51.
- Kumar, V. et al. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *Embo J* 1986, 5, 2231-6.
- Kushner, P. J. et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 74, 311-7.
- Lerner, L. J.; Jordan, V. C. Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. *Cancer Res* 1990, 50, 4177-89.
- Littlefield, B. A. et al. A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids. *Endocrinology* 1990, 127, 2757-62.
- Mangelsdorf, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995, 83, 835-9.
- Markiewicz, L. et al. In vitro bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993, 45, 399-405.
- Marsden, J.; Sacks, N. The national randomised trial of hormone replacement therapy in women with a history of early stage breast cancer: an update. *J Br Menopause Soc* 2002, 8, 129.

- McKenna, N. J. et al. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999, 20, 321-44.
- Menasce, L. P. et al. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 1993, 17, 263-5.
- Moggs, J. G.; Orphanides, G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2001, 2, 775-81.
- Moore, J. T. et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247, 75-8.
- Moras, D.; Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1998, 10, 384-91.
- Mosselman, S. et al. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996, 392, 49-53.
- Muti, P. The role of endogenous hormones in the etiology and prevention of breast cancer: the epidemiological evidence. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1028, 273-82.
- Orti, E. et al. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* 1992, 13, 105-28.
- Osborne, C. K. et al. Double-blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial. *J Clin Oncol* 2002, 20, 3386-9.
- Osborne, C. K. et al. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* 2001, 7, 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Paech, K. et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997, 277, 1508-10.
- Peters, G. A.; Khan, S. A. Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol* 1999, 13, 286-96.
- Ray, P. et al. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett* 1997, 409, 79-85.
- Safe, S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 2001, 62, 231-52.



- Tanenbaum, D. M. et al. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95, 5998-6003.
- Tsubura, A. et al. Dietary factors modifying breast cancer risk and relation to time of intake. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005, 10, 87-100.
- Van 't Veer, P. et al. Combination of dietary factors in relation to breast-cancer occurrence. *Int J Cancer* 1991, 47, 649-53.
- Vega-Avila, E. and Pugsley, M, 2011. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc.* 54: 10-14.
- Vogel, V. G. et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama* 2006, 295, 2727-41.
- Wakeling, A. E.; Bowler, J. Steroidal pure antioestrogens. *J Endocrinol* 1987, 112, R7-10.
- Wakeling, A. E.; Dukes, M.; Bowler, J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 1991, 51, 3867-73.
- Welboren, W. J, et al. ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *Embo J* 2009, 28, 1418-28
- Williamson, J. G.; Ellis, J. D. The induction of ovulation by tamoxifen. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1973, 80, 844-7.
- Yager, J. D.; Davidson, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006, 354, 270-82.