



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ,  
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ,  
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ V

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ,  
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:** Δρ. Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ:** Δρ. Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Κοντός Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2021

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2020 – Δεκέμβριος 2021 στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Χρήστου Κοντού.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Κοντό, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, την επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και τη γενικότερη υποστήριξή του για το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη εργασία. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα, επίσης, να απευθύνω στον Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Διαμάντη Σίδηρη για την επιστημονική συμβουλή τους και τις παρεμβάσεις τους σε καίρια σημεία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, για την μεγάλη βοήθεια, την υποστήριξη που παρείχαν καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε όλο αυτό το χρονικό διάστημα, τις υποψήφιες διδάκτορες Κατερίνα Κατσαράκη, Παρασκευή Καρούση, Πηνελόπη Αρτεμάκη και Μαρία Παπασίρου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	Καρκίνος Προστάτη.....	1
1.1.1	Γενικά στοιχεία.....	1
1.1.2	Κληρονομικοί παράγοντες για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη .....	4
1.1.3	Μοριακή βάση του καρκίνου του προστάτη .....	4
1.1.4	Πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη .....	7
1.1.5	Μοριακοί δείκτες στο καρκίνο του προστάτη .....	10
1.1.6	Διαγνωστικοί καρκινικοί δείκτες .....	10
1.2	Το φαινόμενο της απόπτωσης.....	12
1.2.1	Απόπτωση.....	12
1.2.2	Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης .....	13
1.3	Αποπτωτικές σηματοδοτικές πορείες.....	15
1.3.1	Η πορεία της απόπτωσης μέσω υποδοχέων.....	15
1.3.2	Σηματοδοτική πορεία μέσω μιτοχονδρίου .....	18
1.3.3	Μόρια με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση .....	20
1.4	Το πρωτεασώμα.....	25
1.4.1	Δομή του πρωτεασώματος .....	26
1.4.2	Λειτουργία πρωτεασώματος .....	27
1.4.3	Μικρά μόρια αναστολείς του πρωτεασώματος .....	28
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1	Κυτταροκαλλιέργειες.....	37
2.2	Προσδιορισμός κυτταρικής επιβίωσης.....	38
2.2.1	Σουλφοροδαμίνη Β (SRB) .....	38
2.2.2	Trypan Blue .....	39
2.3	Επίδραση στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη με τους αναστολείς του πρωτεασώματος.....	39
2.4	Απομόνωση ολικού RNA .....	40

2.5	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA .....	41
2.6	Αντίστροφη μεταγραφή .....	41
2.6.1	Αρχή Μεθόδου.....	41
2.6.2	Συνθήκες για την επίτευξη της αντίστροφης μεταγραφής.....	42
2.7	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) .....	43
2.7.1	Αρχή Μεθόδου.....	43
2.7.2	Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes) .....	43
2.7.3	Σχεδιασμός εκκινητών PCR.....	44
2.7.4	Εκκινητές PCR για τον έλεγχο έκφρασης γονιδίου αναφοράς HPRT1 .....	44
2.7.5	Εκκινητές PCR για τα μέλη της οικογένειας BCL2 .....	45
2.7.6	Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	47
2.8	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου – Real-time PCR.....	47
2.8.1	Αρχή Μεθόδου.....	47
2.8.2	Συνθήκες ποσοτικής Real-time PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των γονιδίων της οικογένειας BCL2.....	49
2.9	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	50
2.9.1	Αρχή Μεθόδου.....	50
2.9.2	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντα των γονιδίων της οικογένειας BCL2 51	
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	52
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	68
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	77
	ABSTRACT .....	79

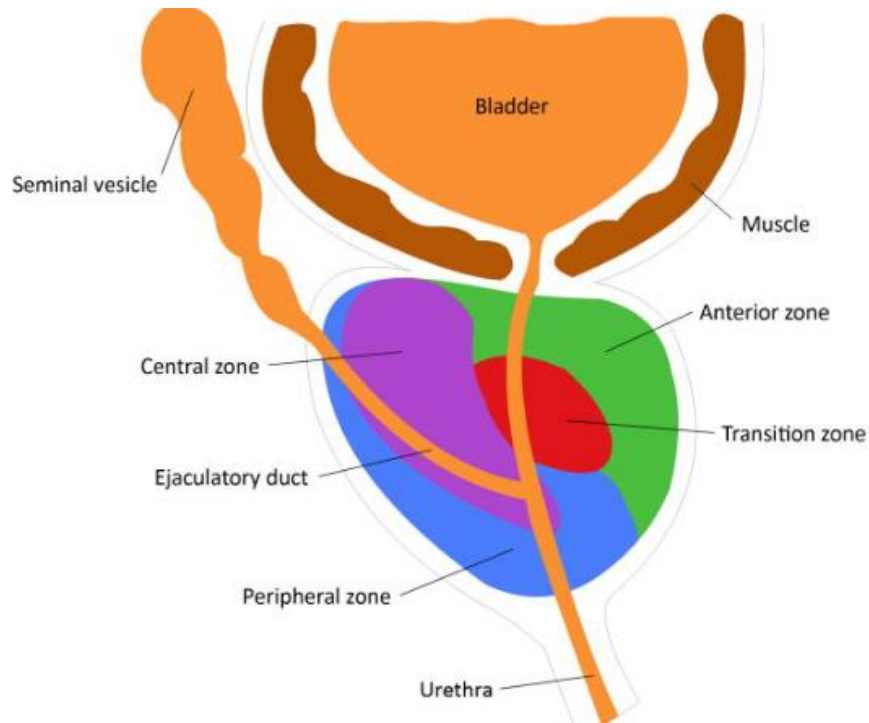
# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Καρκίνος Προστάτη

### 1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο προστάτης είναι αδένας στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, περιβάλλει την ουρήθρα και εντοπίζεται ακριβώς κάτω από την ουροδόχο κύστη. Εμφανίζει κορυφή, βάση και τέσσερις επιφάνειες, πρόσθια, οπίσθια και δύο πλάγιες. Ο προστάτης αποτελείται από έξι διακριτές ζώνες, κατά Mc Neal (Σχήμα 1.1), οι οποίες είναι [1]:

- η περιφερική ζώνη (Peripheral Zone, PZ): φυσιολογικά είναι η μεγαλύτερη ζώνη (70% αδενικό στοιχείο), ενώ αποτελεί την περιοχή πιθανής ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη, καθώς και χρόνιων φλεγμονών.
- η μεταβατική ζώνη (Transitional Zone, TZ): φυσιολογικά είναι το πιο μικρό κομμάτι του αδένα (5% αδενικό στοιχείο), αποτελεί την περιοχή πιθανής εμφάνισης υπερπλασίας, όπου κατά τη περίπτωση αυτή αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του αδένα με αποτέλεσμα τα υπόλοιπα μέρη να πιέζονται και να ατροφούν.
- η κεντρική ζώνη (Central Zone, CZ): εντοπίζεται μεταξύ περιφερικής και μεταβατικής ζώνης (25% αδενικό στοιχείο), οριοθετεί τη βάση του προστάτη και έρχεται σε επαφή με τους σπερματικούς πόρους.
- η πρόσθια ζώνη (Anterior Zone, AZ): στερείται αδενικού στοιχείου και καλύπτει τη πρόσθια επιφάνεια του προστάτη.

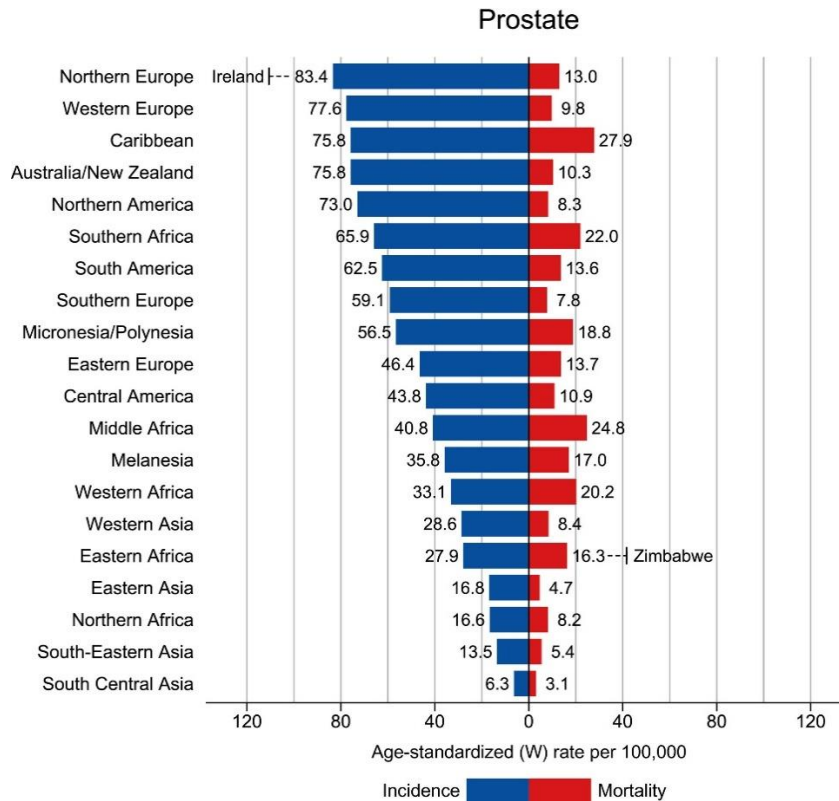


**Σχήμα 1.1:** Απεικόνιση των ζωνών του προστάτη αδένος. Οι διακριτές ζώνες του προστάτη είναι η περιφερική ζώνη, η μεταβατική, η κεντρική και η πρόσθια ζώνη [1].

Ο προστάτης είναι ο μεγαλύτερος εξωκρινής αδένος του ανδρικού γεννητικού συστήματος. Παράγει και εκκρίνει πολυαμίνες, τις σπερμίνη και σπερμιδίνη, οι οποίες συμβάλουν τόσο στη μεταφορά όσο και στη ρευστοποίηση του σπέρματος αλλά φαίνεται να έχουν και αντιβακτηριδιακή δράση. Οι κύριες πρωτεΐνες που παράγονται από τον προστάτη είναι το ειδικό προστατικό αντιγόνο ( Prostate Specific Antigen, PSA), η ειδική προστατική πρωτεΐνη 94 (Prostate Secretory Protein 94, PSP94) και η όξινη προστατική φωσφατάση (Prostatic Acid Phosphatase, PAP) [2].

Οι ασθένειες του προστάτη εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα, με τις πιο κοινές να είναι η καλοήγησ υπερπλασία του προστάτη, ο καρκίνος του προστάτη και η χρόνια προστατίτιδα. Πιο συγκεκριμένα ο καρκίνος του προστάτη, με 1.400.000 νέες περιπτώσεις και 357.000 θανάτους παγκοσμίως (Σχήμα 1.2), είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος και η πέμπτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες το 2020 [3].





**Σχήμα 1.2:** Παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα, ανά περιοχή και ηλικία, για το καρκίνο του προστάτη το έτος 2020 [4].

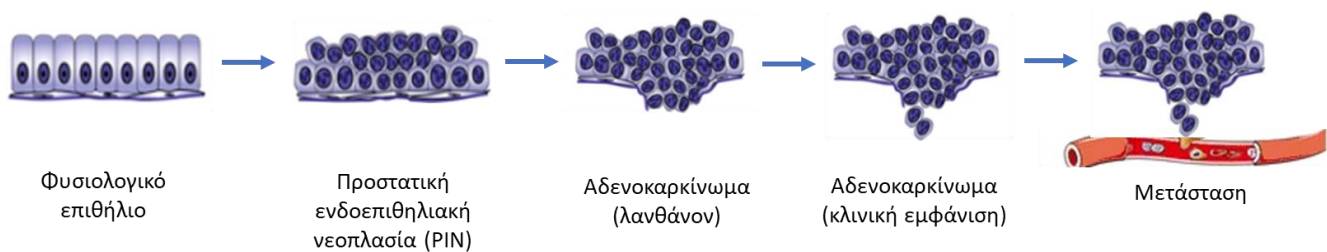
Η έγκαιρη διάγνωση στο καρκίνο του προστάτη αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα και επιτυγχάνεται μέσω προσδιορισμού των επιπέδων του PSA στον ορό του ανδρικού πληθυσμού που δεν έχει εμφανίσει συμπτώματα της νόσου. Ωστόσο, για την επιβεβαίωση της διάγνωσης χρειάζεται η λήψη και η εξέταση βιοψτικού υλικού από τον αδένα. Η ετερογένεια που τον χαρακτηρίζει είναι αξιοσημείωτη, τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και σε κλινική συμπεριφορά είναι δύσκολο να αποτυπωθεί με τους προγνωστικούς παράγοντες που εφαρμόζονται σήμερα στη κλινική πράξη, όπως ο βαθμός κακοήθειας κατά Gleason (Gleason score), το στάδιο της νόσου κατά TNM (TNM stage), το PSA και τα χειρουργικά όρια (surgical margins) [5, 6].

### **1.1.2 Κληρονομικοί παράγοντες για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη**

Για μια ασθένεια τόσο κοινή όσο ο καρκίνος του προστάτη, είναι λίγα αυτά που γνωρίζουμε για τον τρόπο εμφάνισής της. Η ηλικία αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη. Βάση μελετών υποστηρίζεται ότι ακόμα και στο 10% των ανδρών στην ηλικία των 20 ετών περίπου έχουν ήδη αναπτυχθεί καρκινικά κύτταρα προστάτη. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 30% μέχρι την ηλικία των 50 ετών και ξεπερνά το 50% μέχρι την ηλικία των 80. Επιπλέον, αυξημένο επίπεδο κινδύνου εμφανίζουν όσοι έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου προστάτη ή μαστού [7, 8]. Η φυλή αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα κινδύνου, με τους Αφρο-αμερικανούς να εμφανίζουν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τους Καυκάσιους άνδρες. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του προστάτη επίσης έχει συσχετιστεί με το τρόπο ζωής, όπως για παράδειγμα με το κάπνισμα αλλά και με τη κατανάλωση τροφών πλούσιων σε ζωικά λίπη. Τέλος τα επίπεδα των ανδρογόνων έχουν στενή συσχέτιση με την εμφάνιση και την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα των ορμονών αυτών αυξάνονται κατά τη κατανάλωση ζωικών λιπαρών [9].

### **1.1.3 Μοριακή βάση του καρκίνου του προστάτη**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο βασικός παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του προστάτη είναι η ηλικία. Παρόλα αυτά, στηριζόμενοι στις διαφοροποιήσεις του επιπολασμού της νόσου ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη ασθένεια πιθανώς να οφείλεται και σε περιβαλλοντικούς, γενετικούς και μοριακούς παράγοντες, οι οποίοι σε συνάρτηση με τις επιπτώσεις που επιφέρει η γήρανση οδηγούν στην διαφοροποίηση των φυσιολογικών προστατικών επιθηλιακών κυττάρων σε κύτταρα με υψηλό μεταστατικό δυναμικό και ανθεκτικότητα στον ευνουχισμό. Οι γενετικές και οι επιγενετικές αλλαγές επηρεάζουν την έκφραση και κατ' επέκταση τη λειτουργία σημαντικών γονιδίων, γεγονός που οδηγεί σε προβληματική σύνθεση αλλά και δράση πρωτεϊνών καίριας σημασίας, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την αναστολή της απόπτωσης και τελικά στην μετάσταση και την ανεξάρτητη ανδρογόνων ανάπτυξη των καρκινικών προστατικών κυττάρων (Σχήμα 1.3) [10].



**Σχήμα 1.3:** Σχηματική απεικόνιση των σταδίων εξέλιξης καρκίνου του προστάτη. Από το φυσιολογικό επιθήλιο έως το μεταστατικό καρκίνο του προστάτη μεσολαβούν διάφορα βήματα, όπως η προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (PIN) και το αδενοκαρκίνωμα λανθάνουσας φάσης και κλινικής εμφάνισης. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται σε μια ποικιλία επιγενετικών αλλά και γενετικών παραγόντων που επιδρούν στο γονιδίωμα.

Το πρώτο στάδιο κατά την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη είναι η προστατική επιθηλιακή νεοπλασία (Prostatic Intraepithelial Neoplasia, PIN), η οποία προκαλείται από τη χρόνια φλεγμονή του αδένου, το οξειδωτικό στρες καθώς και τις επαγόμενες βλάβες του DNA. Η χρόνια φλεγμονή επηρεάζει την καρκινογένεση σε μοριακό επίπεδο, καθώς ρυθμίζει το μικροπεριβάλλον του όγκου μέσω αλλαγής στο ισοζύγιο μεταξύ κυτοκινών, χημειοκινών και μεταγραφικών παραγόντων [11]. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη καρκινογένεσης, την πρόκληση επιθετικού φαινοτύπου καρκίνου του προστάτη, την πρόοδο της νόσου σε κατάσταση ανθεκτική στον ευνουχισμό, την προώθηση της μετάστασης του όγκου και τέλος την αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, είναι γνωστό πως τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένο οξειδωτικό στρες. Τα ανδρογόνα φαίνεται να είναι πηγή αντιδραστικών ενώσεων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) καθώς αυξάνουν τα επίπεδα ανιόντος υπεροξειδίου σε καρκινικά κύτταρα προστάτη. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να συμβάλει στην ογκογένεση και την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) [5]. Η ύπαρξη βλαβών στο DNA, η οποία σχετίζεται κατά κύριο λόγο με τη μείωση του μήκους των τελομερών και οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια είναι ένας ακόμα μοριακός μηχανισμός που δρα επιβαρυντικά στον καρκίνο του προστάτη.

Η κυτταρική γήρανση έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο στο καρκίνο του προστάτη, ο ρόλος αυτός παρακάμπτεται από μια σειρά ογκογονικών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα και οδηγούν στην εξέλιξη της PIN σε αδενοκαρκίνωμα [12]. Πιο συγκεκριμένα, με τον όρο κυτταρική γήρανση περιγράφεται μια μορφή διακοπής του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία το κύτταρο παραμένει ζωντανό και παρά τα μιτογόνα σήματα δεν πολλαπλασιάζεται. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*, που εμπλέκεται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, στο καρκίνο του προστάτη συχνά υφίσταται μεταλλάξεις ή απώλεια αντιγράφων. Η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *PTEN* φαίνεται να σχετίζεται τόσο με την εξέλιξη προστατικών όγκων σε πιο επιθετικούς αλλά και σε ανθεκτικούς στον ευνουχισμό όγκους, όσο και να εμπλέκεται στην αυξημένη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, *PI3K/Akt* και *Akt/mTOR*, γεγονός που οδηγεί σε κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό [13, 14].

Σε προχωρημένες μορφές της νόσου τα καρκινικά κύτταρα του αδένου έχουν αποκτήσει υψηλό μεταστατικό δυναμικό και ταυτόχρονα φαίνεται να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον ανδρογονικό αποκλεισμό. Η μεταστατική νόσος είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο του προστάτη, η πρώτη θέση εντοπισμού μετάστασης του όγκου είναι στους λεμφαδένες, ενώ ακολουθούν μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα συμπεριλαμβανομένων του ήπατος, των πνευμόνων αλλά και των οστών, με τη τελευταία να είναι η πιο κοινή θέση μετάστασης. Η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση, (*epithelial-mesenchymal transition*, *EMT*) διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη μετάσταση, καθώς τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη υφίστανται *EMT* και εξέρχονται στη κυκλοφορία ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (*circulating tumor cells*, *CTCs*), κατά αυτό τον τρόπο ξεπερνούνται πολλά φυσικά εμπόδια και διαδίδονται καρκινικά κύτταρα σε απομακρυσμένα όργανα [15].

Τέλος, για το μεταστατικό, ανθεκτικό στον ευνουχισμό, καρκίνο του προστάτη φαίνεται να οφείλεται κυρίως στη μη φυσιολογική ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών ή μορίων του υποδοχέα ανδρογόνων, *AR*. Μερικοί από τους βασικότερους μοριακούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στον ανδρογονικό αποκλεισμό είναι οι μεταλλάξεις λειτουργικής ενεργοποίησης του υποδοχέα *AR*, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία του υποδοχέα στα ανδρογόνα, σε απόκτηση ευαισθησίας προς άλλα στεροειδή, ακόμα και σε ενεργοποίηση του υποδοχέα απουσία προσδέτη, που επάγεται από σηματοδοτικά μονοπάτια που υπόκεινται στον έλεγχο αυξητικών ορμονών (π.χ. *MAPK*, *PI3K*). Επιπρόσθετα,

παρατηρείται ενίσχυση των αντιγράφων του γονιδίου που κωδικοποιεί τον AR, αλλά και έκφραση ισομορφών εναλλακτικού ματίσματος με επακόλουθο την σύνθεση των ανδρογόνων [16].

#### **1.1.4 Πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη**

Ο καρκίνος του προστάτη, όπως έχει αναφερθεί, παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια τόσο στο επίπεδο εξέλιξης της νόσου όσο και στη πορεία αυτής. Γίνεται αντιληπτό ότι η αξιολόγηση της πληθώρας των προγνωστικών δεικτών καθίσταται αναγκαία για τη πρόβλεψη της πορείας της νόσου και για την επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα για πρόγνωση είναι ο βαθμός της αποδιαφοροποίησης των δομών του αδένου, που καλείται βαθμός κακοήθειας κατά Gleason (Gleason Score) και είναι ο πιο σημαντικός δείκτης, ακολουθεί το στάδιο της νόσου, τα θετικά χειρουργικά όρια και τα προεγχειρητικά επίπεδα PSA στον ορό. Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν είναι ικανός να προβλέψει την εξέλιξη της νόσου.

Το Gleason score αποτελεί τον πιο αξιόπιστο, μέχρι στιγμής, προγνωστικό δείκτη, με την αύξηση της τιμής του να συνεπάγεται χειρότερη πρόγνωση της νόσου. Η σταδιοποίηση της νόσου διαχωρίζεται στη κλινική διάγνωση, η οποία πραγματοποιείται πριν από το χειρουργείο, ενώ αξιολογούνται οι εξής παράγοντες: τα επίπεδα του PSA, η δακτυλική εξέταση, τα αποτελέσματα της αξονικής τομογραφία, καθώς και τα αποτελέσματα της διορθικής βιοψίας και του διορθικού υπερηχογραφήματος. Επιπλέον έχουμε τη παθολογοανατομική σταδιοποίηση, η οποία με τη σειρά της πραγματοποιείται έπειτα από ριζική προστατεκτομή και στηρίζεται στην ιστολογική εξέταση του χειρουργικού παρασκευάσματος και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες όσο αφορά τη διήθηση των λεμφαδένων, της προστατικής κάψας και των σπερματοδόχων κύστεων. Η σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη βασίζεται στο σύστημα TNM (Tumor-Nodes-Metastasis), όπου συνυπολογίζονται το μέγεθος του όγκου (T), η ύπαρξη λεμφαδενικών (N) ή απομακρυσμένων (M) μεταστάσεων (Πίνακας 1). Ωστόσο η συνολική σταδιοποίηση προκύπτει από το συνδυασμό του συστήματος που αναφέρθηκε, του Gleason score και των επιπέδων του PSA [17].

**Πίνακας 1:** Παρουσιάζεται η σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη βασισόμενη στο σύστημα TNM [18].

Σταδιοποίηση πρωτοπαθούς όγκου	
<b>T0</b>	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
<b>Tx</b>	Κανένα στοιχείο για το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου
<b>T1</b>	Μη ψηλαφητός και μη απεικονιζόμενος όγκος
• <b>T1a</b>	• Τυχαίο ιστολογικό εύρημα, καταλαμβάνει <5% του ιστού
• <b>T1b</b>	• Τυχαίο ιστολογικό εύρημα, καταλαμβάνει >5% του ιστού
• <b>T1c</b>	• Διαπίστωση με βιοψία λόγω αυξημένου PSA
<b>T2</b>	Όγκος περιορισμένος στο προστάτη
• <b>T2a</b>	• Ο όγκος καταλαμβάνει το μισό ή λιγότερο του λοβού
• <b>T2b</b>	• Ο όγκος καταλαμβάνει περισσότερο από το μισό ενός λοβού
• <b>T2c</b>	• Ο όγκος καταλαμβάνει και τους δύο λοβούς
<b>T3</b>	Ο όγκος επεκτείνεται έξω από τη κάψα του προστάτη
• <b>T3a</b>	• Ο όγκος επεκτείνεται έξω από τη κάψα εμφανίζοντας ίσως μικροσκοπική διήθηση της ουροδόχου κύστεως
• <b>T3b</b>	• Ο όγκος διηθεί τις σπερματοδόχους κύστεις
<b>T4</b>	Ο όγκος διηθεί και άλλα όργανα πέρα από την ουροδόχο κύστη

Σταδιοποίηση λεμφαδενικών μεταστάσεων (N)	
<b>Nx</b>	Οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
<b>N0</b>	Δεν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
<b>N1</b>	Μετάσταση σε έναν ή περισσότερους περιοχικούς λεμφαδένες
Απομακρυσμένες Μεταστάσεις (M)	
<b>Mx</b>	Η παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης δεν μπορεί να αξιολογηθεί
<b>M0</b>	Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
<b>T3</b>	Ο όγκος επεκτείνεται έξω από τη κάψα του προστάτη
• <b>M1a</b>	• Ο όγκος επεκτείνεται έξω από τη κάψα εμφανίζοντας ίσως μικροσκοπική διήθηση της ουροδόχου κύστεως
• <b>M1b</b>	• Ο όγκος διηθεί τις σπερματοδόχους κύστεις
• <b>M1c</b>	• Μεταστάσεις σε άλλα όργανα (ήπαρ, πνεύμονες, κλπ.)

Η εκτίμηση των χειρουργικών ορίων σχετίζεται με απομάκρυνση του όγκου έπειτα από ριζική προστατεκτομή. Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με θετικά χειρουργικά όρια, δηλαδή ο όγκος έχει εξαπλωθεί έως τα όρια για τη προστατεκτομή, παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες υποτροπής.

Η πρόγνωση της νόσου, τέλος, σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αξιολόγηση των επιπέδων του PSA στον ορό σε προεγχειρητικό στάδιο. Οι τιμές του PSA για εντοπισμένη νόσο και καλή πρόγνωση κυμαίνονται μέχρι τα 4 ng/mL, ενώ σε περιπτώσεις που τα επίπεδα

PSA ξεπερνούν τα 10ng/mL αναμένεται διάσπαση της προστατικής κάψας. Στις περιπτώσεις που οι τιμές του PSA ξεπερνούν τα 50 ng/mL συνήθως εντοπίζονται λεμφαδενικές διηθήσεις και σε επίπεδα μεγαλύτερα των 100 ng/mL οι ασθενείς φέρουν οστικές μεταστάσεις και η πρόγνωση είναι πολύ κακή [19].

### **1.1.5 Μοριακοί δείκτες στο καρκίνο του προστάτη**

Η μεγάλη ετερογένεια της νόσου έχει δημιουργήσει την ανάγκη να αναπτυχθούν ομάδες τόσο διαγνωστικών όσο και προγνωστικών καρκινικών δεικτών για το καρκίνο του προστάτη. Το γεγονός αυτό θα διευκολύνει τη διαχείριση της νόσου σε κλινικό επίπεδο, λόγω των περιορισμών κατά τη διάγνωση, τη πρόγνωση, τη πρόβλεψη και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

### **1.1.6 Διαγνωστικοί καρκινικοί δείκτες**

#### **1.1.6.1 Καλλικρεΐνη 3- Ειδικό προστατικό Αντιγόνο (Prostate Specific Antigen- PSA)**

Το Ειδικό προστατικό Αντιγόνο, PSA, είναι μια σερινοπρωτεάση, κωδικοποιείται από το γονίδιο καλλικρεΐνης 3, KLK3 και θεωρείται μέλος της οικογένειας των καλλικρεΐνών. Οι καλλικρεΐνες, KLKs, αποτελούν μια ομάδα πρωτεασών σερίνης, απαρτίζονται από 15 μέλη (KLK1-KLK15) και έχουν ανιχνευτεί σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών και βιολογικών υγρών του ανθρώπινου σώματος. Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού το PSA εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά και μόνο στο προστάτη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το PSA εκκρίνεται στο σπερματικό υγρό και η δραστηριότητα του εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων ψευδαργύρου,  $Zn^{2+}$ , ενώ συναντάται συμπλοκοποιημένος με αναστολείς, όπως είναι η άλφα-1-αντιχυμειοθρυψίνη, ACT. Το σύμπλοκο PSA-ACT αποτελεί την επικρατέστερη μορφή PSA στον ορό. Στον ορό οι συγκέντρωση του PSA αυξάνεται σε καταστάσεις φλεγμονής ή και νεοπλασίας, καθώς το PSA εξέρχεται στη κυκλοφορία λόγω διαταραχής της αρχιτεκτονικής του αδένου. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στη θεώρηση του PSA ως έναν ευαίσθητο δείκτη για το καρκίνο του προστάτη, με το ολικό PSA ορού (total PSA, tPSA) να συμπεριλαμβάνει τόσο τις σύνθετες όσο και τις ελεύθερες μορφές PSA (free PSA, fPSA) [20, 21].



Το PSA είναι μια πρωτεΐνη 261 αμινοξέων, όπου περιέχει ένα προ-πεπτίδιο 17 αμινοξέων και ένα προ-πεπτίδιο 7 αμινοξέων. Οι πρωτεάσες KLK2, KLK4 και KLK5 επεξεργάζονται τη πρωτεΐνη και έτσι δημιουργούν την ώριμη και ενεργή μορφή του PSA αφαιρώντας τα πρώτα 7 αμινοξέα από τη προ-μορφή. Η υπο-επεξεργασία ή η υπερβολική επεξεργασία της προ-PSA μορφής οδηγεί σε ισομορφές του PSA, που εντοπίζονται σε ιστούς προστάτη και στον ορό καρκινοπαθών και καλούνται (-5), (-4) και (-2) προ-μορφές. Η (-2) μορφή προ-PSA είναι αυτή που συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διαγνωστική του αξία στο καρκίνο του προστάτη αλλά και στη συμβολή του ώστε να αναγνωριστούν οι πιο επιθετικές μορφές της νόσου, μέσω του συνδυασμού του προ-PSA με το fPSA ή το tPSA [22].

Πέραν όσων αναφέρθηκαν, το PSA βρίσκει εφαρμογή και στη παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, εφόσον τα υψηλά επίπεδα του σχετίζονται με όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας και προχωρημένου σταδίου. Εντούτοις, η θεραπευτική αντιμετώπιση στο καρκίνο του προστάτη μετά από ριζική προστατεκτομή θεωρείται επιτυχής, όταν παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του PSA στον ορό, ενώ αντίθετα όταν τα επίπεδα δείχνουν να αυξάνονται μετά τη λήψη θεραπείας έχουμε βιοχημική υποτροπή. Η βιοχημική υποτροπή στο καρκίνο του προστάτη είναι η αύξηση των επιπέδων PSA σε επίπεδα προκαθορισμένα και αναλόγως τη θεραπεία που έχει υποβληθεί ο ασθενής. Υπολογίζεται ότι το 20-40% των ασθενών που υποβάλλονται σε ριζική προστατεκτομή (PSA > 0.2 ng/ml) θα αναπτύξουν υποτροπή μετά από αρχική θεραπεία [23].

#### **1.1.6.2 Δείκτης Υγείας Προστάτη (Prostate Health Index, PHI)**

Το PHI είναι διαγνωστικό τεστ για το καρκίνο του προστάτη, το οποίο εγκρίθηκε το 2012 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων, (Food and Drug Administration, FDA). Το τεστ αυτό εφαρμόζεται σε άντρες  $\geq 50$  ετών με τιμές PSA 4-10 ng/mL και αρνητική δακτυλική από το ορθό εξέταση (DRE), ενώ προτείνεται σε άνδρες με τιμές > 35 ng/mL που σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ύπαρξης καρκίνου του προστάτη που δεν έχουν υποβληθεί σε βιοψία ή έχουν φυσιολογική βιοψία. Το τεστ αυτό είναι ικανό να προβλέψει με ακρίβεια την εμφάνιση της νόσου σε άντρες με οικογενειακό ιστορικό και επιπλέον αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι το PHI υπερτερεί των PSA και %fPSA, τόσο στη

διαγνωστική του αξία αλλά και στην ικανότητα αναγνώρισης των όγκων με υψηλό βαθμό κακοήθειας [24].

#### **1.1.6.3 4K Σκόρ**

Η συγκεκριμένη εξέταση αίματος προσδιορίζει τα επίπεδα 4 καλλικρεϊνών: tPSA, fPSA, iPSA και της ανθρώπινης καλλικρεϊνης 2 (hKLK2). Τα στοιχεία αυτά συνεκτιμώνται με την ηλικία του ασθενούς, τα αποτελέσματα της εξέτασης DRE και αποτελέσματα παλαιότερης βιοψίας, εφόσον υπάρχει. Το 4K Score σύμφωνα με οδηγίες του NCCN (National Comprehensive Cancer Network), το 2015, το συγκεκριμένο τεστ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση επιθετικού καρκίνου του προστάτη σε ασθενείς που δεν έχουν υποβληθεί σε βιοψία ή το αποτελέσματα αυτής να είναι αρνητικό [25, 26].

#### **1.1.6.4 Καρκινικό προστατικό αντιγόνο 3 (PCA3 ή DD3)**

Το PCA3 είναι ένα μη-κωδικό RNA, το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά στο προστάτη και τα επίπεδα του είναι υψηλά σε περιπτώσεις νεοπλασίας. Το 2012 εγκρίθηκε από τον FDA ένα τεστ ποσοτικού προσδιορισμού του PCA3 στα ούρα, γνωστό ως Progensa. Το τεστ αυτό βασίζεται στο ποσοτικό προσδιορισμό με Real-time PCR των PCA3 και PSA μέσω υπολογισμού του PCA3 score, το οποίο αντιπροσωπεύει το λόγο PCA3/PSA [26].

## **1.2 Το φαινόμενο της απόπτωσης**

### **1.2.1 Απόπτωση**

Η απόπτωση είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου. Περιγράφηκε πρώτη φορά το 1972 από τον Kerr με σκοπό να εξηγήσει την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη και κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, στηριζόμενος σε μορφολογικές παρατηρήσεις. Οι μορφολογικές αλλαγές αποτέλεσαν τη βάση για τον ορισμό της απόπτωσης και σήμερα αντιπροσωπεύουν το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης και επαγωγής των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, με στόχο το κυτταρικό θάνατο. Ο όρος «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος» στο παρελθόν χρησιμοποιούταν για να περιγραφεί η εξάλειψη των κυττάρων που λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη ενός

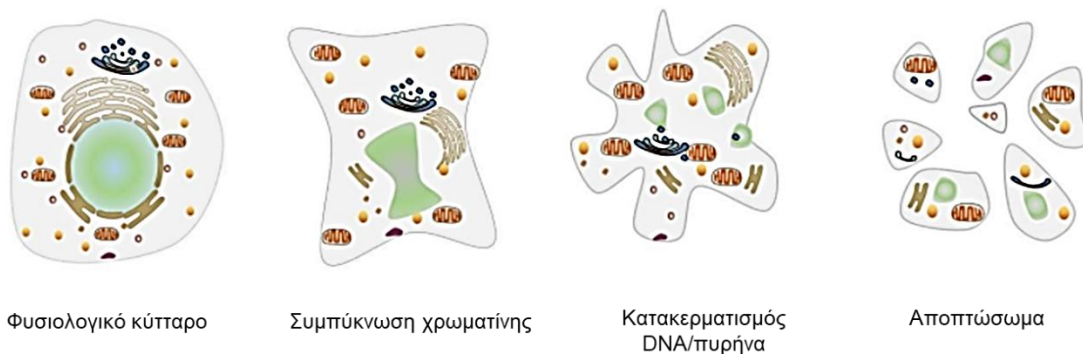
οργανισμού, πλέον χρησιμοποιείται ως συνώνυμο της απόπτωσης. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται, αφού ο θάνατος ενός κυττάρου μέσω της αποπτωτικής διαδικασίας ακολουθεί μια μορφή ενδοκυτταρικού προγράμματος [27, 28]. Η απόπτωση θεωρείται ως ένας από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους τύπους κυτταρικού θανάτου, ενώ γνωρίζουμε πως υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου, όπως είναι η νέκρωση, η πυρόπτωση και η αυτοφαγία [29]. Αποτελεί μια ενεργή διαδικασία, απαραίτητη για την ανάπτυξη και την ομοιόσταση όλων των πολυκύτταρων οργανισμών, ενώ διαδραματίζει κύριο ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των ιστών σε όλο το σώμα.

### **1.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης**

Η παρατήρηση του κυτταρικού θανάτου παραπέμπει σε κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά και στη πλειάδα των περιπτώσεων ακόμα και σε ίδια, ανεξαρτήτως καρκινικού ιστού ή κυτταρικής σειράς ή φαρμακευτικής ουσίας που επιδρούμε σε καρκινικά κύτταρα με σκοπό την επαγωγή της απόπτωσης. Τα ίδια αυτά χαρακτηριστικά μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως η αποπτωτική διαδικασία διέπεται από την ίδια ακολουθία ενδοκυτταρικών αντιδράσεων. Οι μορφολογικές παρατηρήσεις έχουν μελετηθεί εκτενώς *in vitro* και συνάδουν με τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον εκάστοτε οργανισμό, ενώ η μελέτη αυτών *in vivo* είναι δύσκολη λόγω «εγκόλπωσης» των αποπτωτικών κυττάρων και αφομοίωση τους από γειτονικά κύτταρα. Η άμεση και αποτελεσματική απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων είναι αναγκαία, καθώς αποφεύγεται η καταστροφή τους και η διαρροή των συστατικών τους. Η διαδικασία επιτελείται μέσω της φαγοκυττάρωσης, μιας διαδικασίας ενδοκύττωσης που διενεργείται από τα φαγοκύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί, πως βιολογικά η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ φαγοκυττάρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών και των αποπτωτικών κυττάρων, είναι ότι στη πρώτη περίπτωση, δηλαδή κατά την εξάλειψη των παθογόνων παρατηρείται φλεγμονή [30].

Οι πρώτες μορφολογικές αλλαγές που εντοπίζονται αφορούν την συμπύκνωση της χρωματίνης, που περιβάλλει όλο το πυρήνα (Σχήμα 1.4). Ο συμπυκνωμένος πυρήνας αρχίζει και θρυμματίζεται σε πυκνά και μικρά σωματίδια τα οποία απορροφώνται και εξαφανίζονται σταδιακά. Στη διαδικασία αυτή εντοπίζονται ένζυμα, οι κασπάσες, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον τεμαχισμό του DNA, καθώς και άλλων συστατικών του κυττάρου. Ο τεμαχισμός των

χρωμοσωμάτων αρχικά οδηγεί σε μεγάλα τμήματα DNA 200-300 kbp και καταλήγουν σε κομμάτια 200 ζευγών βάσεων, bp, τμήμα που αντιστοιχεί στο DNA που είναι περιελιγμένο γύρω από το οκταμερές των ιστονών, στο νουκλεόσωμα. Τα τμήματα του DNA ανάμεσα στο οκταμερές των ιστονών κόπτονται από ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Για την αποπτωτική αποικοδόμηση του πυρήνα υπεύθυνος είναι ο διμερής παράγοντας DFF, ο παράγοντας αυτός αποτελείται από τα επιμέρους μόρια DFF40 και DFF45. Όσο τα δύο μόρια παραμένουν συμπλοκοποιημένα το διμερές είναι ανενεργό. Κατά την διαδικασία της απόπτωσης η κασπάση-3 τεμαχίζει το DFF45 και το μόριο DFF40 δρα μόνο του και προκαλεί κατάτμηση της διπλής έλικας DNA. Επιπλέον ο παράγοντας AIF (Apoptosis Inducing Factor), που είναι φλαβοπρωτεΐνη και εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο, ακολουθεί τα αποπτωτικά σήματα, οδηγείται στο πυρήνα του κυττάρου και συμμετέχει στη διάσπαση του DNA και στη συμπύκνωση της χρωματίνης [31, 32].



**Σχήμα 1.4:** Απεικόνιση των μορφολογικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την απόπτωση.

Επιπλέον, αυτό που αδιαμφισβήτητα βλέπει κάποιος στο μικροσκόπιο σε ένα κύτταρο που υφίσταται απόπτωση είναι ο επαναπροσδιορισμός των εξωτερικών ορίων. Τα αποπτωτικά κύτταρα διαχωρίζονται από τα γειτονικά τους και δημιουργούνται προεξοχές στην επιφάνειά τους, που καλούνται φούσκες. Επιπλέον, συμπυκνώνονται και οργανώνονται σε αποπτωτικά σωματίδια, ενώ μορφολογικές αλλαγές έχουν παρατηρηθεί και στη κυτταροπλασματική μεμβράνη.

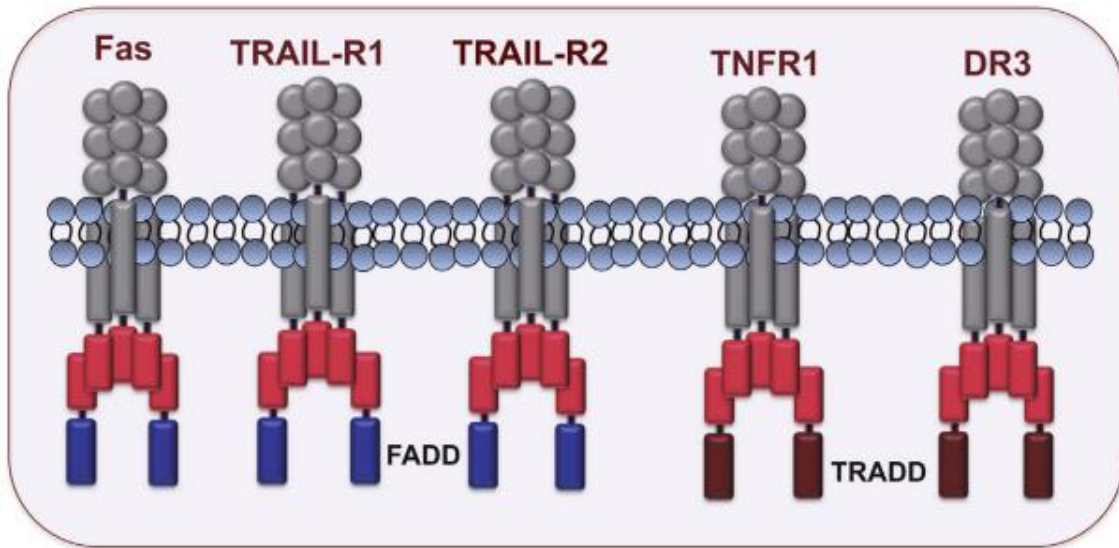
Η πλήρως ρυθμιζόμενη εξάλειψη του κυττάρου χρειάζεται ενέργεια για να προαχθεί. Έτσι, η ενέργεια που καταναλώνεται για το κυτταρικό θάνατο είναι της μορφής ATP. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανάλογα με τα επίπεδα συγκέντρωσης ATP στο ενδοκυττάριο περιβάλλον καθορίζεται και το είδος κυτταρικού θανάτου, που θα ακολουθήσει το κύτταρο. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι τυπικοί αποπτωτικοί επαγωγείς οδηγούν το κύτταρο σε νέκρωση και όχι σε απόπτωση, καθώς αδρανοποιούνται πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας, όπως οι κασπάσες [33].

### **1.3 Αποπτωτικές σηματοδοτικές πορείες**

Έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες έρευνες για την αποκρυπτογράφηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της απόπτωσης. Παρόλη τη σύνδεση που έχει διαπιστωθεί μεταξύ των μονοπατιών, διαχωρίζονται σε δύο γενικές πορείες επαγωγής της απόπτωσης: (α) την πορεία μέσω υποδοχέων, όπου έχουμε επαγωγή της απόπτωσης μέσω υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και (β) την πορεία μέσω μιτοχονδριακού μονοπατιού, που ξεκινά η απόπτωση λόγω διαταραχής της ενδοκυττάριας ομοιόστασης [34].

#### **1.3.1 Η πορεία της απόπτωσης μέσω υποδοχέων**

Οι υποδοχείς θανάτου, death receptors, είναι ένα υποσύνολο υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, που ανήκουν στην υπεροικογένεια του υποδοχέα TNF, (TNF receptor family). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς μεταφέρουν αποπτωτικά σήματα, με αφετηρία τους συγκεκριμένους υποκαταστάτες. Είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και διαθέτουν χαρακτηριστική δομή με ομόλογες εξωκυττάριας περιοχές, πλούσιες σε κυστεΐνη, ενώ τα έξι γνωστά μέλη αυτής της οικογένειας, DR1-DR6, διαθέτουν μια κυτταροπλασματική περιοχή «θανάτου» (DD-Death Domain), η οποία δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς του αποπτωτικού σήματος από τους υποδοχείς στο εσωτερικό του κυττάρου, έπειτα από πρόσδεση του κατάλληλου υποκαταστάτη (Σχήμα 1.5). Οι συγκεκριμένοι υποκαταστάτες σχηματίζουν τριμερή, γεγονός που καθιστά δυνατή τη πρόσδεση τους στους υποδοχείς και στη συνέχεια τη πρωτεόλυση τους στην επιφάνεια του κυττάρου, από μεταλλοπρωτεΐνάσες ή πρωτεάσες κυστεΐνης, με αποτέλεσμα να δίνουν διαλυτές κυτταροκίνες [35].



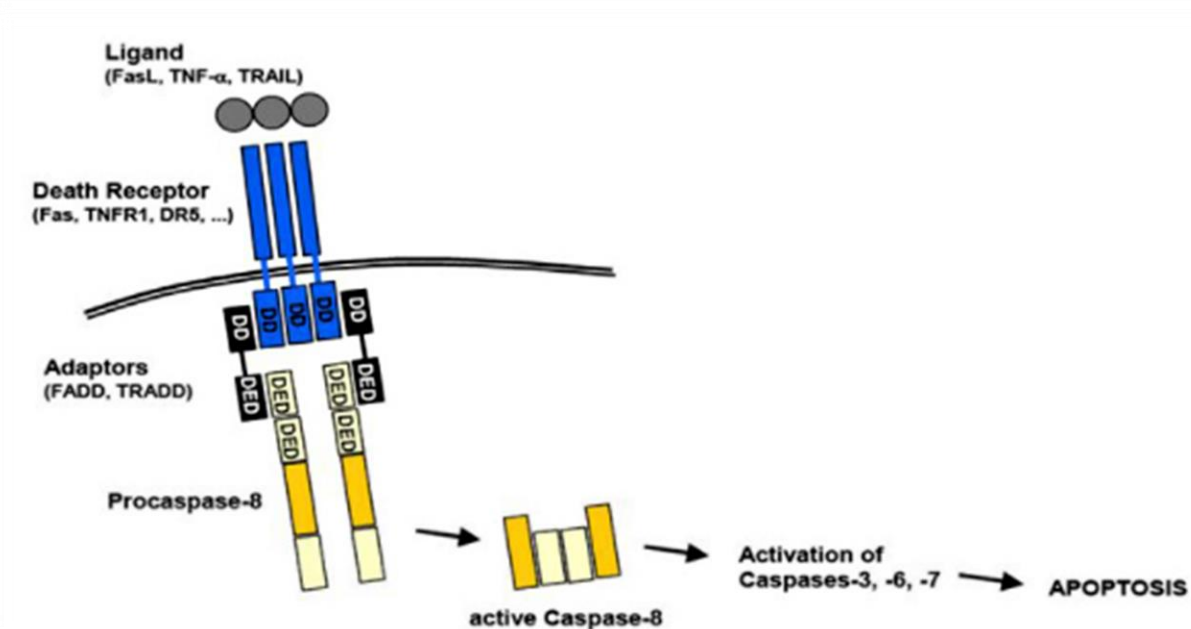
**Σχήμα 1.5:** Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων θανάτου. Να σημειωθεί πως ο υποδοχέας Fas καλείται και CD95 ή APO-1, ο υποδοχέας TRAIL-R1 καλείται DR4 και ο TRAIL-R2 είναι γνωστός και ως DR5.

Η πορεία σηματοδότησης, όπου μέσω του υποδοχέα FAS οδηγούμαστε στο κυτταρικό θάνατο έχει μελετηθεί εκτενώς (Σχήμα 1.6). Αρχικά, πραγματοποιείται πρόσδεση του συνδέτη FasL, Fas-Ligand, στον υποδοχέα Fas και προκαλείται ο τριμερισμός του υποδοχέα δημιουργώντας μια θέση πρόσδεσης για τη πρωτεΐνη FADD (Fas-Associated Death Domain). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύεται στο κυτταροπλασματική περιοχή, DD, και στρατολογεί τη προκασπάση-8, γεγονός που οδηγεί σε ενεργοποίηση της τελευταίας μέσω ενός συμπλόκου DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Το σύμπλοκο αυτό απαρτίζεται από τον υποδοχέα Fas, τη πρωτεΐνη FADD και τη προκασπάση-8. Ακολουθεί η πρωτεολυτική διάσπαση της προ-κασπάσης-8 στην ενζυμικά ενεργή μορφή της κασπάσης-8 και εν συνεχεία ενεργοποιείται το καταρροϊκό μονοπάτι μέσω ενεργοποίησης και άλλων κασπασών, όπως είναι η κασπάση-3 και η κασπάση-7, επάγοντας τελικώς την απόπτωση του κυττάρου [36, 37].

Οι κασπάσες ενεργοποιούνται με παρόμοιο τρόπο και από άλλους υποδοχείς θανάτου. Η σηματοδοτική πορεία μέσω του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF (tumor necrosis factor), αποτελεί μια δεύτερη μεγάλη κατηγορία μέσω υποδοχέων θανάτου. Η μεταγωγή του σήματος γίνεται μέσω του υποδοχέα TNF-R1, που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια. Η πρόσδεση του TNF στον TNF-R1 οδηγεί στον τριμερισμό του υποδοχέα και τη πρόσδεση

της πρωτεΐνης TRADD (TNF-R-associated Death Domain). Ακολούθως, έχουμε αλληλεπίδραση μεταξύ TRADD και FADD, με ταυτόχρονη δέσμευση της προ-κασπάσης-8. Η αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση τη προκασπάσης-8, με τη βοήθεια του συμπλέγματος DISC, οδηγεί σε ενεργή κασπάση-8. Η ενεργή κασπάση-8 με τη σειρά της ενεργοποιεί, είτε την κασπάση-3 και την κασπάση-7 και η διαδικασία ενεργοποίησης της απόπτωσης ολοκληρώνεται, είτε ενεργοποιεί ένα προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας BCL2, τη πρωτεΐνη BID, που αποτελεί κοινό μέλος μεταξύ της ενδογενούς και της εξωγενούς αποπτωτικής οδού και έτσι εμπλέκεται το ενδογενές μονοπάτι [38, 39].

Η αναστολή ενεργοποίησης της απόπτωσης μέσω της εξωγενούς οδού πραγματοποιείται μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Ο ένας σχετίζεται με τη παρεμπόδιση της βιογένεσης της προ-κασπάσης-8 από μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα T κύτταρα και καλείται TOSO, ενώ ο δεύτερος και πιο γνωστός μηχανισμός σχετίζεται με τη δέσμευση της ανασταλτικής πρωτεΐνης FLICE, cFLIP, η οποία σε υψηλά επίπεδα ανταγωνίζεται τη δράση της κασπάσης-8 [40, 41].



**Σχήμα 1.6:** Σχηματική απεικόνιση εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Ο προσδέτης, όπως ο TNF, προσδένεται στον υποδοχέα και έχουμε το τριμερισμό του. Στη συνέχεια στην ενεργοποιημένη επικράτεια θανάτου προσδένονται δύο κυτοσολικές πρωτεΐνες προσδέτες, οι TRADD και FADD και κατάλοιπα της προ-κασπάσης 8, σχηματίζοντας, έτσι, ένα

πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Τα δύο μόρια προ-κασπάσης-8 κόβονται και έχουμε την ενεργή κασπάση-8. Αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση κασπασών τελεστών με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης.

### 1.3.2 Σηματοδοτική πορεία μέσω μιτοχονδρίου

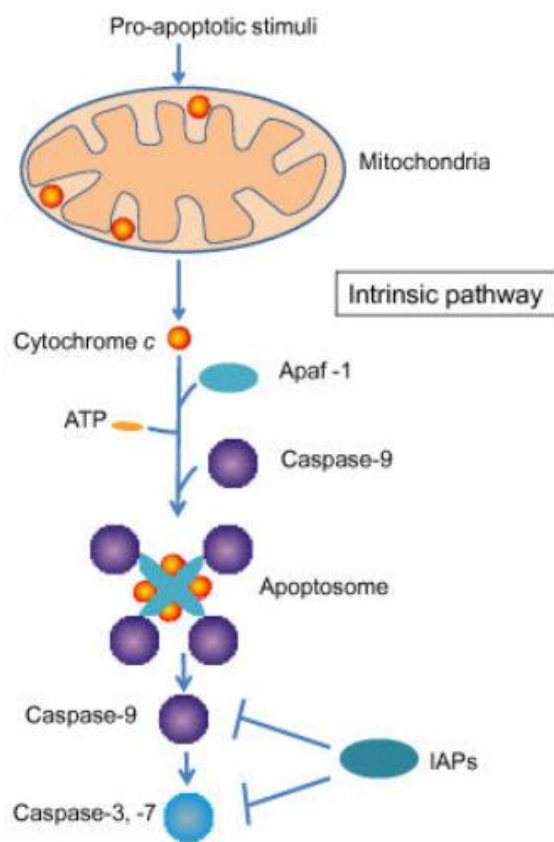
Η δεύτερη βασική αποπτωτική πορεία, γνωστή και ως ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, είναι ανεξάρτητη από κάποιον υποδοχέα σηματοδότησης. Η πορεία αυτή είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με ερεθίσματα που σχετίζονται με το μιτοχόνδριο και οδηγούν σε ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Η εσωτερική ενεργοποίηση του μονοπατιού ρυθμίζεται θετικά, μέσω ερεθισμάτων που ενεργοποιούν τους διαμεσολαβητές για την ενεργοποίηση της απόπτωσης, ενώ μπορεί να υπόκειται και σε αρνητική ρύθμιση, μέσω παραγόντων που εξαλείφουν τα αντι-αποπτωτικά σήματα και προκαλούν ενεργοποίηση της απόπτωσης (Σχήμα 1.7) [27, 42].

Μια σειρά προ-αποπτωτικών μορίων, όπως το κυτόχρωμα c, οι υποδοχείς SMAD, ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης, AIF, ή και η πρωτεΐνη OMI/HTRA2, απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και ενεργοποιούν το καταρράκτη κασπασών). Πιο συγκεκριμένα, το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με τον παράγοντα APAF1, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου του αποπτωσώματος. Εν συνεχεία το σύμπλοκο ενεργοποιεί την κασπάση-9, αυτή με τη σειρά της τη κασπάση-3 και έτσι ενεργοποιείται τα καταρροϊκό μονοπάτι με τελικό αποτέλεσμα τη διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, ο παράγοντας AIF είναι ένα από τα μόρια που απελευθερώνονται από το κυτταρόπλασμα και παρουσιάζουν προ-αποπτωτική δράση. Η συμμετοχή τους στη διαδικασία της απόπτωσης εντοπίζεται τόσο σε πρώιμο στάδιο, κατά τη μετατόπιση τους στο πυρήνα και το κατακερματισμό του DNA και τη συμπύκνωση της χρωματίνης, όσο και σε μεταγενέστερο στάδιο, όπου πραγματοποιείται εκτεταμένη συμπύκνωση της χρωματίνης με τη βοήθεια της κασπάσης-3 [43].

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης κατέχουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2. Εντοπίζονται στην έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη και περιλαμβάνουν προ-αποπτωτικά (BAX, BAK, BID, BIM, PUMA, NOXA, BAD, και BLK) και αντι-αποπτωτικά (BCL2, BCLXL, BCLX και BAG) μέλη. Η ευαισθησία των κυττάρων



στα αποπτωτικά ερεθίσματα καθορίζεται από τη σχετική αναλογία των αντι- και προ-αποπτωτικών συνδυασμών των παραπάνω πρωτεϊνών. Έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν τη διαπερατότητα της έσω/ή και έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Πέρα από το κυτόχρωμα c, οι πρωτεΐνες αυτές ελέγχουν και την απελευθέρωση άλλων πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια, όπως ορισμένες κασπάσες (κασπάση-2, 3, 9), τον επαγωγικό παράγοντα απόπτωσης, AIF, κ.ά. [44].



**Σχήμα 1.7:** Σχηματική απεικόνιση ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Κάποιο ερέθισμα προκαλεί τη δημιουργία πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με την προ-κασπάση 9 και την APAF-1, με χρήση ATP, και σχηματίζουν το αποπτωτικό σωματίο. Το σωματίο ενεργοποιεί τη κασπάση-9, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και -7 [45].

### 1.3.3 Μόρια με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση

Όπως έχει αναφερθεί υπάρχει μεγάλος αριθμός μορίων που σχετίζονται άμεσα με την απόπτωση, σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η πρωτεΐνη p53, ο υποδοχέας θανάτου 3, καθώς και ο κυτταρικής επιφάνειας υποδοχέας θανάτου FAS. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο κατά την απόπτωση διαδραματίζουν κάποια μέλη από την οικογένεια των κασπασών, αλλά και από τη BCL2 οικογένεια, όπου ο ρόλος τους θα μελετηθεί εκτενέστερα παρακάτω.

#### 1.3.3.1 Οικογένεια Κασπασών

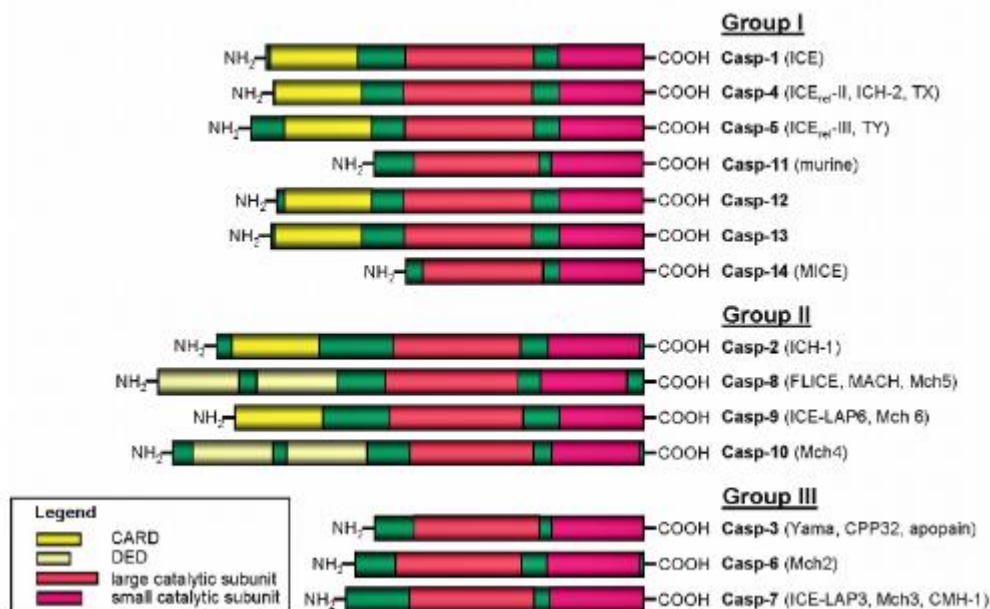
Τόσο το εξωγενές, όσο και το ενδογενές μονοπάτι καταλήγουν σε ένα τελικό κοινό μονοπάτι που οδηγεί σε ενεργοποίηση ενός καταρράκτη πρωτεασών, που καλούνται κασπάσες και οδηγούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Οι κασπάσες συντίθενται φυσιολογικά στα κύτταρα ως αδρανή προ-ένζυμα, τα οποία μέσω αυτό-κατάλυσης ή διάσπασης από άλλες κασπάσες σε συγκεκριμένες θέσεις μπορούν να ενεργοποιηθούν. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 διαφορετικές κασπάσες στα θηλαστικά, από τις οποίες 7 φαίνεται να εμπλέκονται στην απόπτωση. Τα μέλη της οικογένειας των κασπασών που διαδραματίζουν ρόλο κατά την απόπτωση είναι οι κασπάσες 2, 3, 6, 7, 8, 9 και 10, ενώ από την άλλη οι κασπάσες 1, 4, 5, 11, 12, 13 και 14 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Σχήμα 1.8) [46]. Ως προ-ένζυμα οι κασπάσες αποτελούνται από 3 περιοχές:

- i. ένα αμινοτελικό άκρο, που ποικίλει στο μήκος και στην αλληλουχία των αμινοξέων
- ii. μια μεγάλη υπομονάδα (20kDa)
- iii. μια μικρή υπομονάδα (10kDa)

Η ενεργοποίηση του προ-ενζύμου οδηγεί σε σύντηξη της μεγάλης και της μικρής υπομονάδας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ετεροδιμερούς. Για να πραγματοποιηθεί κατάλυση πρέπει να αναγνωριστούν 4 τουλάχιστον αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο της περιοχής διάσπασης και στηριζόμενοι στην ειδικότητα ενζύμου-υποστρώματος μπορούμε να διακρίνουμε τις κασπάσες σε τρεις γενικές ομάδες, ανάλογα με την αμινοτελική αλληλουχία αμινοξέων. Μια πιο γενική ταξινόμηση μεταξύ των μελών της οικογένειας των κασπασών είναι σε κασπάσες-εκκινητές που περιλαμβάνουν τη κασπάση-2, -8, -9 και -10, σε κασπάσες-τελεστές που περιλαμβάνουν τη κασπάση-3, -6, -7 και τέλος σε κασπάσες-

ενεργοποιητές κυτοκίνης που περιλαμβάνουν την κασπάση-1, -4, -5,-11, -12, -13 και -14 [47, 48].



**Σχήμα 1.8:** Παρουσίαση της οικογένειας των κασπασών. Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες με το Group I να αντιπροσωπεύει τις κασπάσες-ενεργοποιητές κυτοκίνης, το Group II τις κασπάσες-εκκινητές της απόπτωσης και το Group III τις κασπάσες-τελεστές της απόπτωσης [37].

Ο τρόπος δράσης των κασπασών στη διαδικασία της απόπτωσης δεν είναι πλήρως κατανοητός, ωστόσο η απόπτωση προκαλείται από διαφορετικούς μηχανισμούς. Η απενεργοποίηση των πρωτεϊνών που προστατεύουν το κύτταρο είναι ένας μηχανισμός που εμπλέκονται άμεσα οι κασπάσες. Παράδειγμα αποτελεί η αδρανοποίηση του παράγοντα ICAP από τις κασπάσες, με αποτέλεσμα το κατακερματισμό του DNA του κυττάρου. Η πρωτεΐνη ICAP (Inhibitor of Caspase Activated DNase), αναστέλλει τη δράση της νουκλεάσης CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease), αφού σε μη αποπτωτικά κύτταρα βρίσκονται συμπλοκοποιημένα. Κατά την απόπτωση η ICAP απενεργοποιείται από τις κασπάσες και η νουκλεάση CAD είναι ενεργή να δράσει. Επιπρόσθετα, οι κασπάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση της δράσης πρωτεϊνών, όπως σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, μέσω επίδρασης στις

ρυθμιστικές περιοχές τους. Η καταστροφή του κυτταρικού σκελετού είναι ένας ακόμα μηχανισμός που εμπλέκονται οι κασπάσες, όπου κατά την απόπτωση καταστρέφουν τη την κυτταρική δομή που περιβάλλει την χρωματίνη και συμβάλει στην οργάνωση της, με τελικό αποτέλεσμα την συμπύκνωση αυτής [49-51].

Οι κασπάσες μπορούν να ρυθμίζονται με ποικίλους τρόπους. Οι κασπάσες-εκκινητές ενεργοποιούνται από διάφορα σήματα και η ενεργοποίησή τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη σύνδεση τους με ειδικούς συμπαράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-9 προϋποθέτει τη σύνδεση της με το κυτόχρωμα c, καθώς και με τον συμπαράγοντα APAF1, στο ενδογενές μονοπάτι [52]. Στο εξωγενές μονοπάτι η ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-8 απαιτεί σύνδεση με το συμπαράγοντα FADD, μέσω της περιοχής DED. Επιπλέον, στην απόπτωση μέσω των υποδοχέων θανάτου σχηματίζεται το σύμπλοκο DISC, υπεύθυνο για τη μετάδοση αποπτωτικών σημάτων και την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-8 και εν συνεχεία των κασπασών-3, -6, -7 [53, 54]. Η πρωτεΐνη cFLIP είναι αντι-αποπτωτική και έχει παρόμοια δράση με τη προ-κασπάση-8, συνδέεται στον υποδοχέα θανάτου και εμποδίζει την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-8 με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης [55]. Αξίζει να σημειωθεί πως οι κασπάσες-εκκινητές όχι μόνο μπορούν να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες-τελεστές αλλά έχουν και την δυνατότητα αυτοενεργοποίησης, κάτι που δεν διαθέτουν οι κασπάσες-τελεστές. Οι κασπάσες που υπάγονται στη κατηγορία κασπάσες-τελεστές λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο μεταξύ τους. Όσο αφορά τη κασπάση-3, υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τον τρόπο δράσης της και φαίνεται να ενεργοποιείται μέσω του εξωγενούς, αλλά και του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης, ενώ η καταστολή της έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης [56]. Για τις κασπάσες-6 και -7 δεν υπάρχουν τόσες πολλές πληροφορίες, ωστόσο αξίζει να αναφερθεί πως η καταστολή τους δεν επηρεάζει σημαντικά την αποπτωτική διαδικασία. Η καταστολή της λειτουργίας των κασπασών επιτυγχάνεται από μια ομάδα πρωτεϊνών, που ονομάζονται καταστολείς της απόπτωσης, IAPs [57].

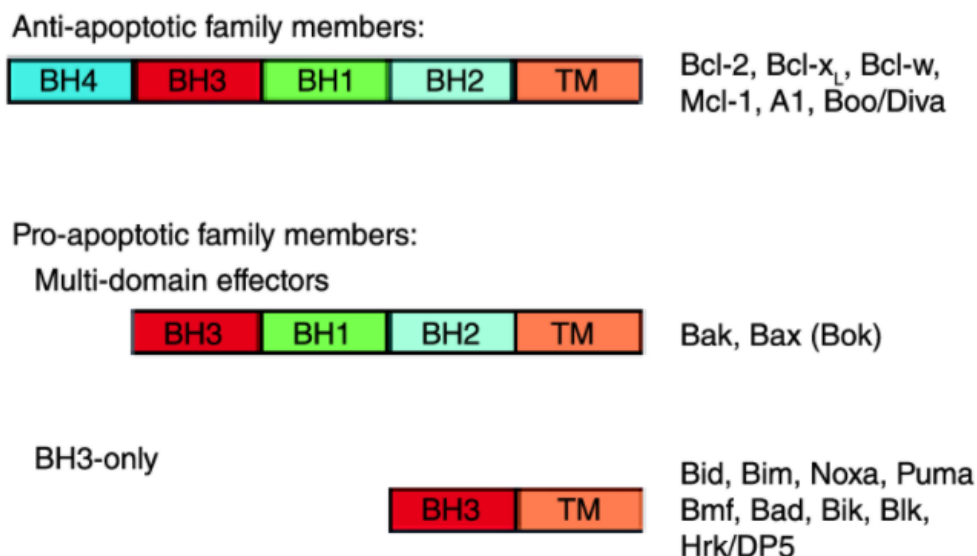
### **1.3.3.2 Οικογένεια BCL2**

Η BCL2 οικογένεια πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία, κυρίως μέσω του ρόλου που κατέχει στη ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c

από το μιτοχόνδριο. Η οικογένεια πήρε το όνομα της από το γονίδιο που απομονώθηκε πρώτο και χαρακτηρίστηκε ως πρωτο-ογκογονίδιο, το *BCL2*. Ανακαλύφθηκε στο σημείο χρωμοσωμικής μετατόπισης t(14; 18) σε λεμφώματα Β κυττάρων [58]. Μετά την ανακάλυψη και κλωνοποίηση του πρώτου αυτού γονιδίου, ταυτοποιήθηκε μια ολόκληρη οικογένεια πρωτεϊνών. Η οικογένεια αποτελείται από ένα δίκτυο προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών, τα οποία μέσω της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης λειτουργούν ως ρυθμιστές του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης [59].

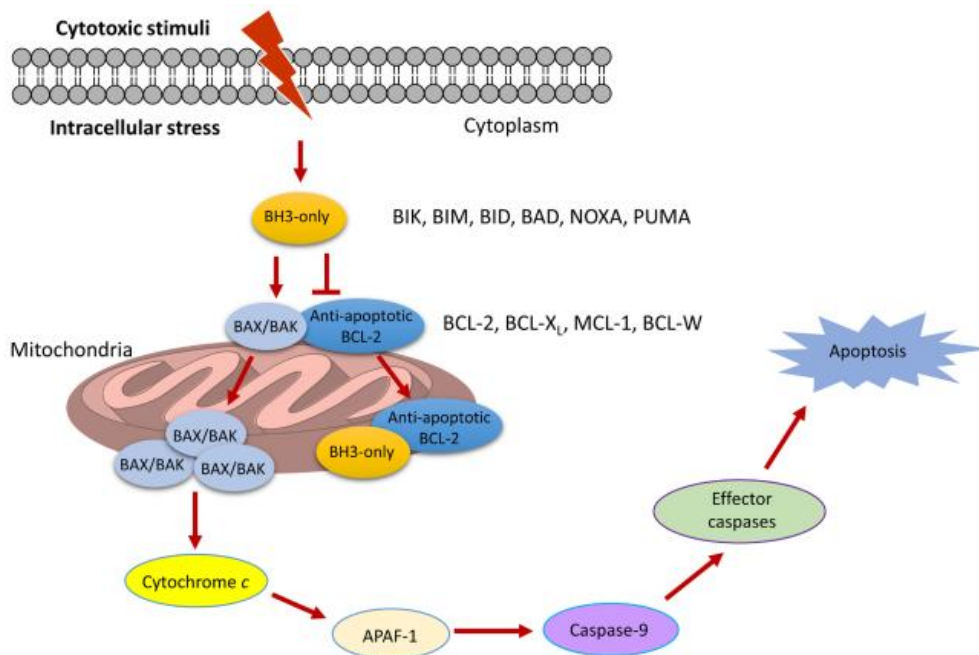
Με βάση τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά η οικογένεια *BCL2* περιέχει από μια μέχρι τέσσερις ομόλογες περιοχές *BCL2*, BH domains: BH1, BH2, BH3, BH4, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον ετεροδιμερισμό ή τον ομοδιμερισμό των μελών της οικογένειας μεταξύ τους, γεγονός που οδηγεί σε ρύθμιση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης. Οι *BCL2* πρωτεΐνες χωρίζονται σε τρεις υποοικογένειες (Σχήμα 1.9) [60, 61]. Η πρώτη υποοικογένεια είναι αυτή των αντι-αποπτωτικών μελών, που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τη *BCL2*, *BCLXL* (*BCL-extralong*), *BCLW*, *MCL1*, *BCL2A1*, *BCL2L12*. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν και τα τέσσερα αυτοτελή δομικά στοιχεία, τα πιο πολλά μέλη της οικογένειας αυτής περιέχουν και μια διαμεμβρανική περιοχή, TM (transmembrane domain) και εμποδίζουν την εξέλιξη της απόπτωσης. Η περιοχή TM επιτρέπει στις πρωτεΐνες αυτές να συνδέονται με τις μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς και των πυρηνικών μεμβρανών [62-64]. Η δεύτερη υποοικογένεια περιλαμβάνει προ-αποπτωτικές BH-3 μόνο πρωτεΐνες, όπως είναι η *BID* (*Bcl2 interacting mediator*), η *HRK* (*Hara-kiri*), η *NOXA*, η *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), η *BAD* (*Bcl2 associated death promoter*), η *BMF* (*Bcl2 modifying factor*) και η *BIK* (*Bcl2 interacting killer*). Η δράση τους σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης και με τον ανταγωνισμό με τις αντι-αποπτωτικές *BCL2* πρωτεΐνες. Η τρίτη και τελευταία υποοικογένεια στερείται της BH4 επικράτειας και ονομάζεται προ-αποπτωτική οικογένεια τύπου *BAX*. Μέσω αυτής προάγεται η απόπτωση, κυρίως λόγω δημιουργίας πόρων στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες που περιλαμβάνονται στην υποοικογένεια αυτή είναι η *BAX* (*BCL2 associated-X*) και η *BAK* (*BH3 homologous agonist killer*). Σύμφωνα με έρευνες έχει βρεθεί πως προ-αποπτωτικά μέλη περιλαμβάνουν και την BH4 επικράτεια, όπως η πρωτεΐνη *BOK*, που όμως

λόγω κοινών λειτουργικών χαρακτηριστικών με τη πρωτεΐνη BAX παραδοσιακά εντάσσεται στην υποοικογένεια αυτή [65, 66].



**Σχήμα 1.9:** Παρουσιάζονται οι επικράτειες των μελών της οικογένειας BCL2, η οποία περιλαμβάνει προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μέλη. Εντός των προ-αποπτωτικών μελών υπάρχει μία επιπλέον κατηγοριοποίηση μεταξύ των ενεργά καταλυτικών πρωτεϊνών που περιέχουν πολλές BH επικράτειες και των πρωτεϊνών που φέρουν ομολογία με μία επικράτεια (γνωστές ως BH3-μόνο πρωτεΐνες). [43]

Σε υγιή κύτταρα η πρωτεΐνη BAX είναι ανενεργή και παραμένει στο κυτοσόλιο και η BAK1 αντίστοιχα συνδέεται χαλαρά με τα μιτοχόνδρια. Έπειτα από ειδικό σήμα, όπως είναι η καταστροφή του DNA ή ιογενής λοίμωξη, οι BH3-μόνο πρωτεΐνες ενεργοποιούν τα προ-αποπτωτικά μέλη, BAK1 ή/και BAX. Η ενεργοποίηση αυτή πραγματοποιείται είτε άμεσα, μέσω αλλαγών στη στερεοδιαμόρφωση των πρωτεϊνών, είτε έμμεσα, μέσω εξουδετέρωσης των BCL2 αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Έπειτα από τις διαμορφωτικές αλλαγές που υφίστανται οι πρωτεΐνες BAK1 και BAX εισάγονται πλήρως στη εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, ολιγομερίζονται και σχηματίζουν κανάλια διαπερατά από πρωτεΐνες, οδηγώντας σε απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων (Σχήμα 1.10) [67-69].



**Σχήμα 1.10:** Σχηματική απεικόνιση της επαγωγής του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης από τα μέλη της BCL2 οικογένειας. Μέσω ενός ειδικού σήματος ενεργοποιούνται οι BH3-μόνο πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργοποιούν με τη σειρά τους τα προ-αποπτωτικά μέλη BAX/BAK1, αλλά και σταματούν τη δράση των αντι-αποπτωτικών μελών. Η ενεργοποίηση των BAX/BAK1 προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών δημιουργώντας κανάλια διαπερατά σε πρωτεΐνες στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Οι προ-αποπτωτικοί παράγοντες απελευθερώνονται και προκαλείται ενεργοποίηση του κυτοχρώματος c, της APAF-1 και της κασπάσης-9, και ενεργοποιούνται καταρροϊκά άλλα μέλη της οικογένειας των κασπασών με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης [70].

#### 1.4 Το πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα ή πιο σωστά το σύστημα ουβικουτίνης/πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System, UPS) είναι μια απαραίτητη κυτταρική ρυθμιστική μηχανή που παίζει ρόλο σε πρωτεολυτικές και μη διεργασίες που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο, τη κυτταρική σηματοδότηση, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA, την χρωματινική αναδιαμόρφωση, καθώς και πληθώρα άλλων κυτταρικών λειτουργιών [71, 72].

#### 1.4.1 Δομή του πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα, γνωστό και ως πρωτεάσωμα 26S, αποτελεί έναν ATP-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό μηχανισμό με μοριακό βάρος ~2.4MDa και συνίσταται από ένα 20S σύμπλεγμα κυλινδρικού σχήματος (Core Particle, CP) και ένα ή δύο ρυθμιστικά 19S συμπλέγματα (Regulatory Particles, RP) (Σχήμα 1.11). Το ετερογενές αυτό σύμπλοκο εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στο πυρήνα [73].

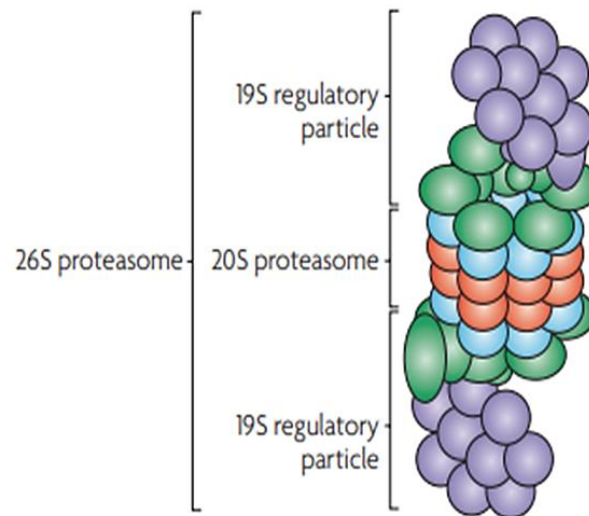
Το σύμπλεγμα 20S έχει μοριακό βάρος 700kDa και η βασική του λειτουργία είναι η αποικοδόμηση μικρών πεπτιδίων και μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Σημαντικό να αναφέρουμε πως το καταλυτικό αυτό κέντρο του πρωτεασώματος είναι αυστηρά διατηρημένο εξελικτικά. Η δομή του αποτελείται από μια κοιλότητα κυλινδρικού σχήματος με τέσσερις δακτυλίους, καθένας από τους οποίους συνίσταται από επτά διαφορετικές υπομονάδες [74]. Οι δύο εξωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από α-τύπου υπομονάδες ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ), οι οποίες αλληλεπιδρούν με το 19S ρυθμιστικό σύμπλεγμα και έχουν δράση ενδοριβονουκλεάσης. Οι υπομονάδες σχηματίζουν μια κλειστή πύλη που εμποδίζει τη πρόσβαση μη κατάλληλα ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών στους εσωτερικούς δακτυλίους. Οι δύο εσωτερικοί δακτύλιοι απαρτίζονται από β-τύπου υπομονάδες ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ) και παρουσιάζουν πρωτεολυτική ενεργότητα [75-77]. Ειδικότερα, οι υπομονάδες  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  και  $\beta 5$  εμφανίζουν ενεργότητα κασπάσης (C-L), θρυψίνης (T-L) και χυμοθρυψίνης (CT-L) αντίστοιχα. Η υπομονάδα  $\beta 1$  κόβει πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυτελικό άκρο βασικών καταλοίπων, η  $\beta 2$  υπομονάδα επιδρά στο καρβοξυτελικό άκρο των βασικών καταλοίπων και η  $\beta 5$  στο αντίστοιχο άκρο καταλοίπων υδρόφοβης φύσεως. Το αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής δράσης είναι ο σχηματισμός πεπτιδίων μικρού μήκους, 4-14 καταλοίπων αμινοξέων, τα οποία στη συνέχεια ανακυκλώνονται από το κύτταρο [78, 79].

Το σύμπλοκο 19S αποτελείται από 19 υπομονάδες οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες και οργανώνονται σε δύο επιμέρους υπομονάδες τη βάση και το κάλυμμα. Η βάση αποτελείται από έξι ATPάσες τύπου AAA, τις RPT1-RPT6 και από τρεις υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες, τις RPN1, RPN2 και RPN13. Από την άλλη, το κάλυμμα αποτελείται από εννέα υπομονάδες, τις RPN3, RPN5-RPN9, RPN11, RPN12 και RPN15. Η σύνδεση μεταξύ βάσης και καλύμματος γίνονται με τη βοήθεια του μορίου RPN10 και έτσι έχουμε το σχηματισμό του 19S ρυθμιστικού συμπλόκου. Το σύμπλοκο έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει τη σημασμένη με ουβικουϊτίνη πρωτεΐνη, να αφαιρεί την αλυσίδα της



πολυουβικιτίνης, να αποπτυχώνει τις πρωτεΐνες και να τις οδηγεί στο καταλυτικό πυρήνα [79, 80].

Εκτός από το 26S πρωτεάσωμα υπάρχουν και άλλοι τύποι ενζυμικά ενεργού πρωτεασώματος, όπως είναι το ανοσοπρωτεάσωμα. Βασική του λειτουργία είναι η παραγωγή σωστού μήκους πεπτιδίων για την αντιγονοπαρουσίαση τύπου MHC1. Το ανοσοπρωτεάσωμα δημιουργείται με αντικατάσταση των β καταλυτικών υπομονάδων β1, β2 και β5 σε β1i (Lmp2), β2i (Mec1-1) και β5i (Lmp7) αντίστοιχα [81].



**Σχήμα 1.11:** Σχηματική απεικόνιση 26S πρωτεασώματος. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από τη καταλυτική 20S υπομονάδα και τις δύο ρυθμιστικές 19S υπομονάδες (τροποποιημένη εικόνα) [82].

#### 1.4.2 Λειτουργία πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα στοχεύει σε πρωτεΐνες που είναι κατεστραμμένες, εσφαλμένα αναδιπλωμένες ή οξειδωμένες. Επιπλέον, διαδραματίζει κύριο ρόλο στη διάσπαση

ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, στη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων καθώς και στην απόπτωση. Οι πρωτεΐνες-υποστρώματα μεταφέρονται στην υπομονάδα 20S και αποικοδομούνται σε πεπτίδια ποικίλου μήκους. Ο μηχανισμός της αποικοδόμησης είναι συντηρημένος για όλους τους τύπους των καταλυτικά ενεργών β υπομονάδων. Ωστόσο, πέρα από τη καλά χαρακτηρισμένη πρωτεολυτική δράση το πρωτεάσωμα παρουσιάζει δράση ΑΤΡάσης και είναι υπεύθυνο για το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών, αλλά και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Επίσης έχει παρατηρηθεί δράση RNAάσης που εμπλέκεται στον έλεγχο της συρραφής και των επιπέδων έκφρασης του mRNA, ενώ τέλος έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει τα μόρια ουβικουΐτίνης από τις πρωτεΐνες ώστε να ακολουθήσει η αποικοδόμηση τους [83, 84].

Βάση αυτών που αναφέρονται παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η λειτουργία του πρωτεασώματος είναι ευέλικτη και επιπλέον το καθιστά πολύ σημαντικό για την έρευνα πάνω στον καρκίνο. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε πολλούς καρκινικούς κυτταρικούς τύπους σε σχέση με τους φυσιολογικούς, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη που μελετάται στη παρούσα εργασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πως η λειτουργία του πρωτεασώματος προκαλεί ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και μέσω αυτού έχουμε αυξημένη έκφραση των AR, συνεπώς η τροποποιημένη έκφραση των AR συμβάλει στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον η καταστροφή ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη κακοηθειών μεταβάλλοντας τα επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη κυτταρική διαίρεση αλλά το πρωτεάσωμα καταστρέφει και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη καρκινογένεση. Έτσι με βάση όλα τα παραπάνω γεννήθηκε η ιδέα της στόχευσης του πρωτεασώματος ως πιθανό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας [85, 86].

### **1.4.3 Μικρά μόρια αναστολείς του πρωτεασώματος**

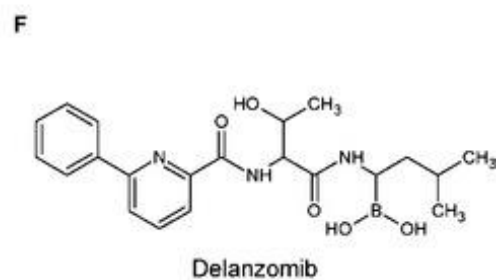
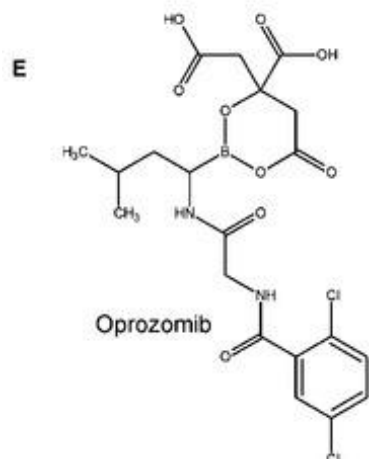
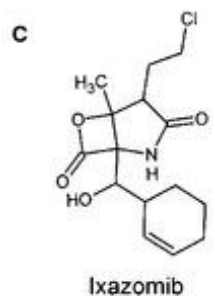
Οι αναστολείς του πρωτεασώματος είναι μικρά μόρια, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την φυσιολογική λειτουργία του πρωτεασώματος και έτσι συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ μπορούν και να καταστέλλουν καρκινικούς όγκους. Ο κυτταρικός θάνατος έχει αποδειχθεί πως οφείλεται σε αυξημένη απόπτωση μέσω

ενεργοποίησης του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού, αλλά και του εξωγενούς. Τα μόρια αυτά φέρουν μια ομάδα ομοιοπολικά συνδεδεμένη, το φαρμακοφόρο, όπου μπορεί να προσδεθεί στις καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος ομοιοπολικά ή μη και να καταστείλει τη φυσιολογική λειτουργία του (Σχήμα 1.12) [87]. Έτσι, οι πρωτεασωματικοί αναστολείς χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσης τους, δηλαδή ομοιοπολική σύνδεση ή μη. Οι μη ομοιοπολικοί αναστολείς δε χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη, ενώ τρεις από τους οκτώ δομικά διαφορετικούς ομοιοπολικούς αναστολείς έχουν εγκριθεί από τον FDA (Food and Drug Administration) και βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια κλινικής ανάπτυξης (Πίνακας 2) [88].

**Πίνακας 2:** Παρουσιάζονται οι αναστολείς του πρωτεασώματος, με τη δραστική ομάδα που επιδρά έναντι του πρωτεασώματος, ο τρόπος σύνδεσης τους στο πρωτεάσωμα και η υπομονάδα του πρωτεασώματος που στοχεύουν τα φάρμακα [88].

<b>Αναστολέας</b>	<b>Φαρμακοφόρο</b>	<b>Σύνδεση</b>	<b>Υπομονάδα πρωτεασώματος που αναστέλλουν</b>
<b>Bortezomib</b> (Velcade <sup>®</sup> , PS-341)	Βορονικό οξύ	Αντιστρεπτή	β5>β1
<b>Carfilzomib</b> (Kyprolis <sup>®</sup> , PR171)	Εποξυκετόνη	Μη-αντιστρεπτή	β5
<b>Ixazomib</b> (MLN-9708/2238)	Βορονικό οξύ	Αντιστρεπτή	β5>β1
<b>Oprozomib</b> (ONX-0912, PR-047)	Εποξυκετόνη	Μη-αντιστρεπτή	β5

<b>Delanzomib</b> (CEP-18770)	Βορονικό οξύ	Αντιστρεπτή	$\beta 5 > \beta 1$
<b>Marizomib</b> (NPI-0052, Salinosporamide A)	$\beta$ -λακτόνη	Μη-αντιστρεπτή	$\beta 5 > \beta 2 > \beta 1$



**Σχήμα 1.12:** Σχηματική απεικόνιση των σκελετικών δομών των αναστολέων του πρωτεασώματος [88].

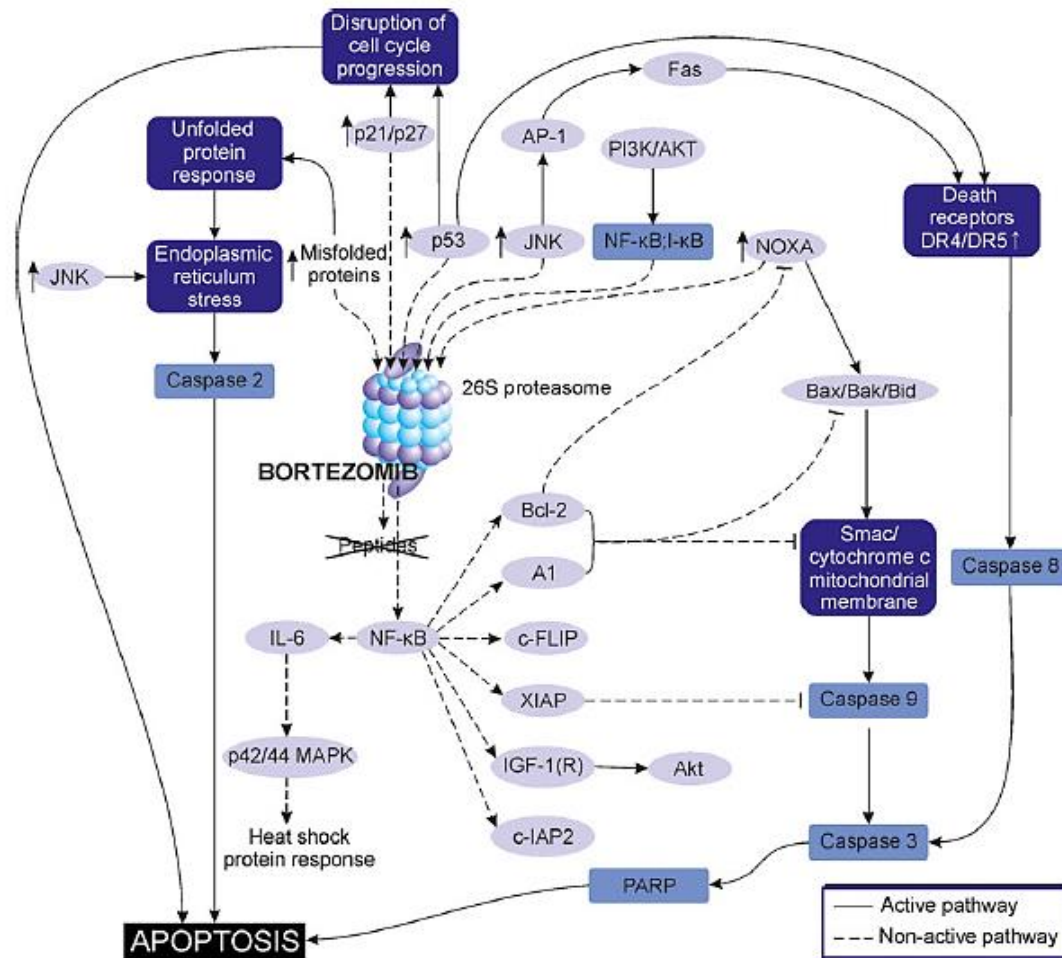
Ο πρώτος αναστολέας του πρωτεασώματος που εγκρίθηκε από τον FDA το 2003 ήταν το Bortezomib, για τη θεραπεία στο πολλαπλό μυέλωμα και στο λέμφωμα κυττάρων μανδύα. Το συγκεκριμένο φάρμακο πιστοποιήθηκε ότι δρα στο μονοπάτι του πρωτεασώματος, βρέθηκαν καλά δοσολογικά σχήματα, συνδυάστηκε με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα με σκοπό να μειωθούν οι παρενέργειες και να ελαττωθεί η ανθεκτικότητα [89, 90]. Επί του παρόντος υπάρχουν πάνω από 200 ανοικτές ή προγραμματισμένες κλινικές δοκιμές που επικεντρώνονται στην αποτελεσματικότητα του Bortezomib και σε άλλους στερεούς όγκους

(<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Bortezomib+&cntry=&state=&city=&dist=>). Ακολούθως αναπτύχθηκαν οι αναστολείς δεύτερης γενιάς, έναντι του πολλαπλού μυελώματος, με το Carfilzomib να παίρνει έγκριση το 2012 από τον FDA και με το Ixazomib το 2015 το οποίο χορηγείται δια στόματος σε σύγκριση με τα δύο προηγούμενα που χορηγούνται ενδοφλέβια ή υποδόρια. Άλλες ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των Marizomib, Oprozomib και Delanzomib βρίσκονται υπό κλινική μελέτη όχι μόνο για το πολλαπλό μυέλωμα αλλά και για άλλους τύπους καρκίνου, όπως και για το καρκίνο του προστάτη που μελετάμε στη παρούσα εργασία [89, 90]. Επιπρόσθετα η παρούσα εργασία έχει επικεντρωθεί στην δράση του Bortezomib και του δεύτερης γενιάς αναστολέα Carfilzomib.

### **Bortezomib**

Το Bortezomib είναι ένα διπεπτίδιο βορονικού οξέος, το οποίο συνδέεται αντιστρεπτά με τη β5 υπομονάδα, που εμφανίζει ενεργότητα χημειοθρυσίνης, καθώς επίσης αναστέλλει τη δράση θρυσίνης που εμφανίζει η υπομονάδα β1 του 26S πρωτεασώματος. Η αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος οδηγεί σε μη κατακερματισμό ουβικουϊτινιλιωμένων πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έμμεση καταστολή της δράσης μορίων που παίζουν καίριο ρόλο σε σηματοδοτικές πορείες υπεύθυνες για τη κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση [91, 92]. Επιπλέον είναι γνωστό πως το Bortezomib είναι ισχυρός ενεργοποιητής τριών ξεχωριστών αποπτωτικών μονοπατιών. Πραγματοποιείται

ενεργοποίηση της ενδογενούς μιτοχονδριακής οδού, που η ενεργοποίηση αυτή μεσολαβείται από τη κασπάση-9 και της εξωγενούς που μεσολαβείται από τη κασπάση-8 και τους υποδοχείς θανάτου, ενώ παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα τη c-Jun N-τερματικής κινάσης. Τρίτον παρατηρείται ενεργοποίηση της οδού απόκρισης στο ER στρες που μεσολαβείται από τη κασπάση-2. Χαρακτηριστικά, οι διεργασίες μέχρι την ενεργοποίηση του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού είναι η συσσώρευση της BAX προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης και η μετατόπιση της από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, γεγονός που οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές. Οι επικείμενες αλλαγές προκαλούν αναστολή του αντι-αποπτωτικού BCL-2 καθώς και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, με τελικό σημείο την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 [88]. Πέρα από την αυξημένη ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών η δράση του Bortezomib επηρεάζει και τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος εμπλέκεται άμεσα με τις περισσότερες πορείες μεταγωγής σήματος. Φυσιολογικά ο NF-κB διατηρείται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα και σε σύμπλοκο με τον αναστολέα των πρωτεϊνών της οικογένειας κB, IκB. Σε συνθήκες στρες ο IκB φωσφορυλιώνεται, ουβικουϊτινιλιώνεται και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα, αφήνοντας τον NF-κB ελεύθερο να δράσει. Η αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος συνεπάγεται με αναστολή ενεργοποίησης του NF-κB και τελικώς βασικές πρωτεΐνες δεν παράγονται, πράγμα που οδηγεί σε μείωση της κυτταρικής επιβίωσης (Σχήμα 1.13) [93].



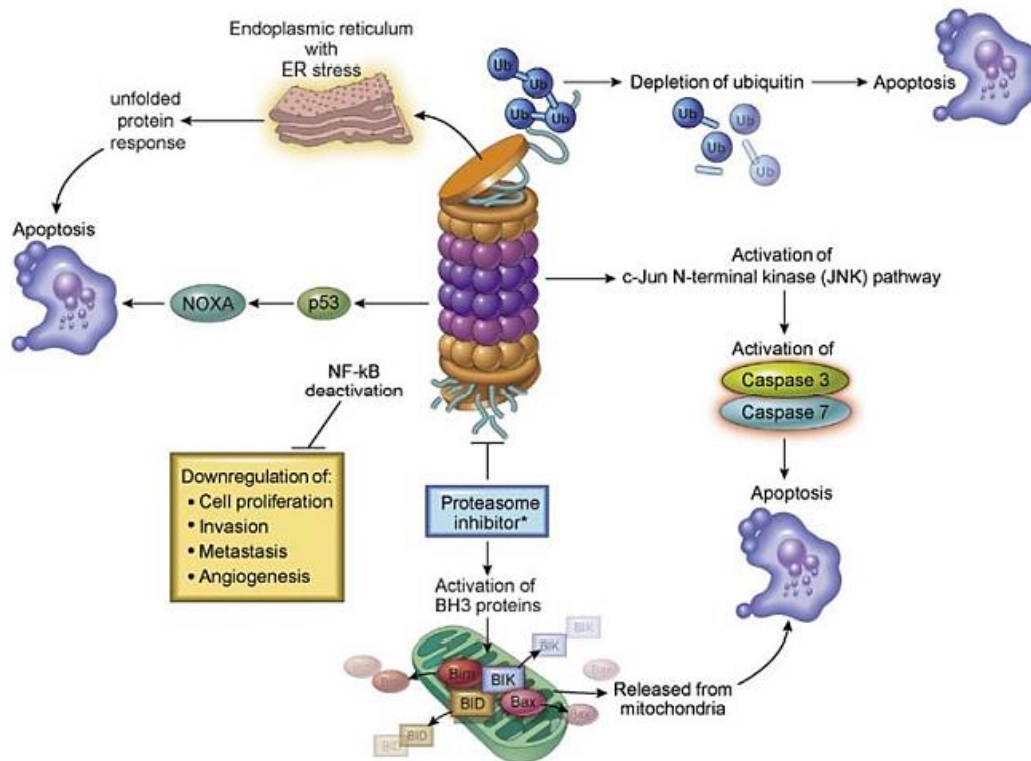
**Σχήμα 1.13:** Απεικόνιση μηχανισμού αντικαρκινικής δραστηριότητας του Bortezomib, μέσω αναστολής του πρωτεασώματος που προκαλεί την συσσώρευση πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την διαταραχή σηματοδοτικών μονοπατιών, του κυτταρικού κύκλου αλλά και στην επαγωγή της απόπτωσης. [88]

### Carfilzomib

Το Carfilzomib είναι μη αντιστρεπτός πρωτεασωμικός αναστολέας εποξυκετόνης με υψηλή εξειδίκευση προς τη δράση χημειοθρυψίνης της υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος, μάλιστα με υψηλότερη εξειδίκευση σε σχέση με το Bortezomib. Στη περίπτωση μη αντιστρεπτής σύνδεσης έχουμε σοβαρή μείωση των επιπέδων της πρωτεασωμικής δραστηριότητας και η επαναφορά είναι εφικτή μόνο με εκ νέου σχηματισμό των υπομονάδων του πρωτεασώματος [94]. Η επίδραση του Carfilzomib σε καρκινικά κύτταρα

προκαλεί ενεργοποίηση του εξωγενούς και του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού, με σημαντική αύξηση στα επίπεδα της κασπάσης-3, 7, 8 και 9. Επιπλέον, έχουμε ενεργοποίηση της JNK που συσχετίζεται με το προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και ακόμα έχει παρατηρηθεί αποπόλωση της μιτοχondριακής μεμβράνης με επακόλουθο την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Επιπρόσθετα, εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης NOXA, μια προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας BCL-2 που αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη p53 στο σημείο της βλάβης του DNA, ωστόσο η αναστολή του πρωτεασώματος μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της NOXA ανεξαρτήτως της p53. Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) φυσιολογικά διαθέτει ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου για τον εντοπισμό λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και τις στοχεύει με σκοπό την αποικοδόμηση τους από το πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες που το κύτταρο παράγει μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών, όπως συμβαίνει όταν έχουμε αναστολή του πρωτεασώματος, έχουμε το λεγόμενο ER stress, το οποίο προκαλεί ενεργοποίηση μηχανισμών για διατήρηση της ομοιόστασης του ER, όπως είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η ενεργοποίηση της απόπτωσης (Σχήμα 3.4) [95, 96]. Αξίζει να σημειωθεί, πως κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι στο Bortezomib ανταποκρίνονται στη θεραπεία με Carfilzomib και το αντίστροφο. Το προφίλ τοξικότητας είναι διαφορετικό σε σχέση με αυτό του Bortezomib, πιο συγκεκριμένα είναι λιγότερο τοξικό με σπάνια καρδιακή και πνευμονική τοξικότητα. Το Carfilzomib έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό και στην συνδυαστική θεραπεία τόσο σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη ή πομαλιδομίδη, όσο και με δεξαμεθαζόνη [95].





**Σχήμα 1.14:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των αναστολέων του πρωτεασώματος. Η αναστολή του πρωτεασώματος οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών. Η αναστολή του NF-κB οδηγεί σε καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετάστασης και της αγγειογένεσης, η ενεργοποίηση του JNK οδηγεί σε απόπτωση και η συσσώρευση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αλλά και η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης NOXA επάγουν την απόπτωση. Τέλος το ER stress που προκαλείται από το πλεόνασμα των ουβικουϊτινιλωμένων πρωτεϊνών επάγει και αυτό την απόπτωση [96].

## ΣΚΟΠΟΣ

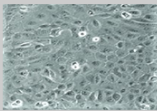
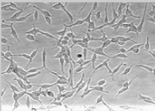
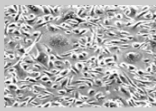
Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην αλλαγή των επιπέδων έκφρασης μορίων mRNA αποπτωτικών γονιδίων, υπό την επίδραση αναστολέων του πρωτεασώματος. Οι νέες προσεγγίσεις στη χρήση των αναστολέων του πρωτεασώματος για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, αλλά κυρίως η σημαντική επίδραση που έχουν στη ρύθμιση διάφορων κυτταρικών διαδικασιών, μας οδήγησαν στη μελέτη τους και πιο συγκεκριμένα στη μελέτη του τρόπου δράσης τους στην έκφραση αποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας BCL2, σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Αρχικός στόχος αποτέλεσε να βρεθούν καρκινικές σειρές με διαφορετικές ιδιότητες, ώστε να διερευνηθούν τυχόν διαφορές στην έκφραση γονιδίων και να συσχετισθούν με τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών. Έτσι, επιλέχθηκαν κυτταρικές σειρές με διαφορετικό τύπο καρκίνου του προστάτη, καθώς και διαφορετικής προέλευσης (πρωτοπαθής ή μεταστατικός όγκος). Γνωρίζοντας ότι τα καρκινικά κύτταρα αποτελούν συχνά μοντέλα για τη διερεύνηση των διάφορων λειτουργιών, όπως παρουσιάζεται και στην συγκεκριμένη εργασία, έγινε προσπάθεια επιλογής κυτταρικών σειρών οι οποίες να προσεγγίζουν τη πλειοψηφία των ασθενών.

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά επιλεγμένων ανθρώπινων κυτταρικών σειρών καρκίνου του προστάτη.

Κυτταρική σειρά/χαρακτηριστικά	DU-145	LNCaP	PC3
Εικόνα στο μικροσκόπιο			
Τύπος	Καρκίνωμα	Καρκίνωμα	Αδενοκαρκίνωμα, Στάδιο IV
Τύπος μορφολογίας	Επιθηλιακός	Επιθηλιακός	Μεσεγχυματικός
Ασθενής	Καυκάσιος άνδρας 69 ετών	Καυκάσιος άνδρας 50 ετών	Καυκάσιος άνδρας 64 ετών
AR	-	+	-
Μεταστατική Ικανότητα	Μέτρια	Χαμηλή	Υψηλή
Θρεπτικό καλλιέργειας	DMEM Low + 10% FBS* + 1% Penicillin-Streptomycin	RPMI + 10% FBS* + 1% Penicillin-Streptomycin	RPMI + 10% FBS* + 1% Penicillin-Streptomycin
Πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας	Ατμόσφαιρα: αέρας 95% με CO <sub>2</sub> 5%. Θερμοκρασία: 37°C	Ατμόσφαιρα: αέρας 95% με CO <sub>2</sub> 5%. Θερμοκρασία: 37°C	Ατμόσφαιρα: αέρας 95% με CO <sub>2</sub> 5%. Θερμοκρασία: 37°C

Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη που επιλέχθηκαν και καλλιεργήθηκαν είναι τα DU 145, LNCaP και PC-3. Ανάλογα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε σειράς χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός τύπος θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με κατάλληλη σύσταση. Για τη σειρά DU 145 χρησιμοποιήθηκε DMEM low glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) το οποίο περιέχει 2 mM L-γλουταμίνη, 10% FBS (βόειος εμβρυϊκός ορός, Fetal Bovine Serum) 100 U/mL πενικιλίνη και 0,1 mg/mL στρεπτομυκίνη. Για τις σειρές LNCaP και PC-3 χρησιμοποιήθηκε RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute - 1640), το οποίο περιέχει 10% FBS και διάλυμα πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης και L-γλουταμίνης σε ποσοστό 1%. Όλες οι σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C, σε συνθήκες υγρασίας και με 5% περιεκτικότητα CO<sub>2</sub>.

## **2.2 Προσδιορισμός κυτταρικής επιβίωσης**

Ο προσδιορισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνάρτηση με το χρόνο είναι το πρωταρχικό ζητούμενο. Ως απώτερος σκοπός είναι η παρατήρηση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των mRNA μέσω επαγωγής της απόπτωσης, έτσι είναι απαραίτητη η μέτρηση της κυτταρικής επιβίωσης. Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός μας χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικές μέθοδοι και τα αντίστοιχα πρωτόκολλα και μετρήθηκε το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

### **2.2.1 Σουλφοροδαμίνη B (SRB)**

Η χρωματομετρική μέθοδος με την χρήση της σουλφοροδαμίνης B αξιοποιεί την ικανότητα της σουλφοροδαμίνης B να προσδένεται σε πρωτεϊνικά στοιχεία των κυττάρων, που έχουν προηγουμένως μονιμοποιηθεί. Συγκεκριμένα, προσδένεται σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα κάτω από ασθενείς όξινες συνθήκες για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας. Η SRB επαναδιαλυτοποιείται κάτω από βασικές συνθήκες. Αξίζει να αναφερθεί, ότι δεν έχει τη δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου χρειάζεται αρχικά επίστρωση σε τετραπλέτες μικροπλακιδίων 96 θέσεων με διαφορετικό, σταθερά αυξανόμενο αριθμό κυττάρων, 100μL. Επιάζουμε για 16 ώρες στους 37°C σε συνθήκες υγρασίας και με 5% περιεκτικότητα CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια αφαιρούμε το θρεπτικό, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 75μL από το αντιδραστήριο TCA (20% w/v), και επιάζουμε για 1 ώρα στους 4°C. Ακολούθως, κάνουμε

πλύση με νερό βρύσης 4 φορές και αφήνουμε το μικροπλακίδιο για στέγνωμα περίπου 1 ώρα, αφού περάσει ο χρόνος αυτός προσθέτουμε 100μL διαλύματος σουλφοροδαμίνης B (0,057% w/v) και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Επιπλέον, ξεπλένουμε με διάλειμμα οξικού οξέος (1% v/v) 4 φορές και αφήνουμε για στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα, έπειτα προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι διάλυμα Tris base (10mM, pH=10.5) και ανακινούμε για 10 λεπτά. Τέλος, φωτομετρούμε στα 492nm.

### **2.2.2 Trypan Blue**

Η χρωστική Trypan Blue χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε ένα εναιώρημα κυττάρων. Ο προσδιορισμός της κυτταρικής επιβίωσης με αυτή την χρωστική βασίζεται στο γεγονός ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ακεραία πλασματική μεμβράνη και έτσι η χρωστική δεν μπορεί να την διαπεράσει και να εισχωρήσει στο κύτταρο. Αντίθετα, νεκρά κύτταρα τα οποία έχουν διαρρηγμένη πλασματική μεμβράνη βάφονται μπλε καθώς η χρωστική εισχωρεί στο εσωτερικό τους.

Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου γίνεται για το προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης κυττάρων. Επιστρώσαμε τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με επιφάνεια 25 cm<sup>2</sup> και έγινε επώαση για 16h στους 37°C σε συνθήκες υγρασίας και με 5% περιεκτικότητα CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια προσθέσαμε 3mL θρυψίνη, επώασαμε για 10-15min στους 37°C , έγινε επαναιώρηση των κυττάρων που είχαμε στρώσει προσθέτοντας 6mL από το θρεπτικό που χρησιμοποιείται για κάθε κυτταρική σειρά και τέλος πολύ καλή ανάδευση. Από το μίγμα αυτό πήραμε 100μL και τα αναμίξαμε με 100μL αντιδραστήριου Trypan Blue, έγινε εναπόθεση ένα αιμοκυτταρόμετρο ροής και μετρήσαμε στο μικροσκόπιο με σκοπό να βρούμε τη τελική συγκέντρωση των κυττάρων.

### **2.3 Επίδραση στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη με τους αναστολείς του πρωτεασώματος**

Για τα δύο φαρμακευτικά σκευάσματα, Carfilzomib και Bortezomib επιθυμούμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση που ο κάθε παράγοντας μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς στο 50% στις 72h. Για το λόγο αυτό, από την αρχική συγκέντρωση των σκευασμάτων, Car<sub>ρχ</sub>=0,1mM, και με τον αντίστοιχο διαλύτη για

την κάθε προχωρήσαμε σε διάφορες αραιώσεις. Το αραιωμένο φαρμακευτικό σκεύασμα, στη συνέχεια, το προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο για τη κάθε κυτταρική σειρά και εφαρμόζουμε τις μεθόδους για το προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης, τόσο σε μικρή κλίμακα με τη χρήση του αντιδραστήριου σουλφοροδαμίνης B, όσο και σε μεγάλη κλίμακα με τη χρήση του αντιδραστήριου Trypan Blue. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκε η επιθυμητή συγκέντρωση για κάθε παράγοντα στο θρεπτικό υλικό της κάθε κυτταρικής σειράς και τροφοδοτήθηκαν με το συγκεκριμένο «τροποποιημένο» θρεπτικό υλικό μετά τη πρώτη επώαση για 16h που αναφέρθηκε παραπάνω. Όταν προστεθεί το «τροποποιημένο» θρεπτικό υλικό ακολουθεί εκ νέου επώαση για 16h και στη συνέχεια εφαρμογή των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής επιβίωσης, τόσο σε μικρή κλίμακα με τη σουλφοροδαμίνη B, αλλά και σε μεγάλη κλίμακα. Τέλος οι μέθοδοι αυτοί εφαρμόστηκαν σε τρεις χρόνους, στις 24h, στις 48 h και στις 72 h από την εφαρμογή του παράγοντα.

## **2.4 Απομόνωση ολικού RNA**

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιείται με χρήση του αντιδραστήριου TRIzol<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Germany). Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών σε ομογενοποίημα ιστών και κυττάρων, πρόκειται για ένα όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης καιφαινόλης που προκαλεί τη λύση των κυττάρων και την αποδιάταξη των ανώτερων πρωτεϊνικών δομών.

Αρχικά, τόσο τα κύτταρα που έχουμε επιδράσει με παράγοντα, όσο και αυτά που δεν έχουμε επιδράσει διαλυτοποιούνται σε 1mL TRIzol<sup>TM</sup> και επωάζονται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η προσθήκη 0,2mL χλωροφορμίου, έντονη ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έπεται φυγοκέντρηση στα 12000 g, για 15min, στους 4°C με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών διακριτών φάσεων: τη κατώτερη οργανική φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες, τη μεσόφαση όπου εκεί περιέχεται το DNA και την ανώτερη υδατική φάση που βρίσκεται το RNA. Απομονώνουμε την διαυγή υδατική φάση και προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης με τον όγκο της υδατικής φάσης (~ 0,5mL), επωάζουμε μέσα σε πάγο για 15min και φυγοκεντρούμε στα 12000 g, για 15min, στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης αποχύνουμε το υπερκείμενο, κάνουμε πλύση στο ίζημα με 1mL αιθανόλη 75% με έντονη ανάδευση και φυγοκεντρούμε εν νέου στα 7500

g , για 5min, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 0,02mL DEPC-H<sub>2</sub>O (diethylpyrocarbonate-H<sub>2</sub>O). Το απομονωμένο ολικό RNA φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C.

## 2.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και έλεγχος της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού RNA

Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν την ιδιότητα να απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα φωτός, με μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης τα 260 nm. Έτσι, προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά η συγκέντρωση του ολικού RNA, με χρήση φασματοφωτομέτρου Micro-volume UV-Vis BioSpec-nano. Συγκεκριμένα, 1μL απομονωμένου ολικού RNA φωτομετρήται σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Στα 280 nm απορροφούν οι δακτύλιοι των αρωματικών αμινοξικών καταλοίπων. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA γίνεται με χρήση του παρακάτω τύπου:

$$C_{\text{RNA}} (\text{ng}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 40$$

όπου: A<sub>260</sub> : η απορρόφηση του RNA στα 260 nm (σε O.D.),

40 : η συγκέντρωση στην οποία αντιστοιχεί 1 O.D. διαλύματος RNA (σε ng/μL RNA).

Η καθαρότητα του απομονωμένου RNA δίνεται από το λόγο A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> και με βάση το αντιδραστήριο TRIzol G<sup>TM</sup>, που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση ικανοποιητικοί είναι οι λόγοι που κυμαίνονται μεταξύ 1,8 και 2,2.

## 2.6 Αντίστροφη μεταγραφή

### 2.6.1 Αρχή Μεθόδου

Ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή των δειγμάτων με σκοπό τη σύνθεση μονόκλωνου DNA (cDNA). Για τη σύνθεση μονόκλωνου DNA (cDNA) έχοντας ως καλούπι RNA, πραγματοποιείται μια διαδικασία που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT). Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε ένα εξειδικευμένο ιικό ένζυμο, την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RTase), που είναι πολυμεράση και δημιουργεί συμπληρωματικά μόρια DNA έχοντας ως εκμαγείο το RNA. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται *in vivo*, κατά κύριο λόγο σε ρετροϊούς, ενώ για την *in vitro*

προσέγγιση θεωρείται απαραίτητη η χρήση τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων και ενός εκκινητή. Χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικές κατηγορίες εκκινητών: τα τυχαία εξαμερή, τα ολιγομερή δεοξυθυμίδινης (oligo-dT) και εκκινητής ειδικός για συγκεκριμένο γονίδιο.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίδινης, που βασίζονται στη πολυαδενυλίωση που υφίστανται κατά την ωρίμανση τους όλα τα ευκαρυωτικά mRNA. Η χρήση των συγκεκριμένων εκκινητών αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης, καθώς οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των mRNA, επιτρέποντας τη δημιουργία μορίων cDNA μόνο από τα mRNA μετάγραφα.

### **2.6.2 Συνθήκες για την επίτευξη της αντίστροφης μεταγραφής**

Το RNA απομονώθηκε από τις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές, όπου σε κάποια δείγματα έχουμε επιδράσει με παράγοντα και σε κάποια όχι, ωστόσο η επεξεργασία είναι ακριβώς η ίδια. Πιο συγκεκριμένα, στα 10  $\mu\text{L}$  όλων των δειγμάτων και των κυτταρικών σειρών που περιείχαν 2  $\mu\text{g}$  ολικού RNA και σε ένα αρνητικό μάρτυρα που περιείχε 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  ελεύθερο RNAσών, προστέθηκαν 1  $\mu\text{L}$  Oligo dT-Adaptor Primer (Cτελ= 0,1 mM) και 1  $\mu\text{L}$  από 10 mM dNTPs (Cτελ.,καθενός= 1 mM) και έγινε επώαση στους 65 °C για 5 λεπτά και ύστερα γρήγορη τοποθέτηση τους σε πάγο. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται ο υβριδισμός του oligo-dT adaptor στην πολυ(A) ουρά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4  $\mu\text{L}$  από το 5X Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (Cτελ= 50 mM Tris-HCl με pH= 8,3, και 40 mM KCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 2  $\mu\text{L}$  από 0,1 M DTT Cτελ= 1 mM), 20 u αναστολέα RNAσών, 100 u M-MLV RT (M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση, M-MLV reverse transcriptase) και 1  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  ελεύθερο RNAσών, σε τελικό όγκο 20  $\mu\text{L}$ . Ακολούθησε το στάδιο του πολυμερισμού στους 37 °C για 52 λεπτά και τέλος ένα στάδιο αποδιάταξης της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 70 °C για 15 λεπτά, καθώς και απότομη ψύξη με τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο.



## **2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)**

### **2.7.1 Αρχή Μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη και χρησιμοποιούμενη στο πεδίο της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στοχεύει στον ταχύ πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, μέσω ενζυμικής κατεργασίας και χωρίς μεσολάβηση ζωντανών οργανισμών. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι: η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, η πρόσδεση των εκκινητών στο εκμαγείο DNA και τέλος, η επιμήκυνση, με απώτερο σκοπό τον πολλαπλασιασμό του μορίου. Τα βήματα αυτά αποτελούν ένα κύκλο, ο οποίος πραγματοποιείται με τη βοήθεια του θερμοκυκλοποιητή. Προκειμένου να επιτευχθούν τα παραπάνω βήματα χρειάζεται ρύθμιση της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, θερμοκρασία που επιλέγεται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA είναι 95°C, ενώ η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για τη πρόσδεση των εκκινητών είναι ανάλογη της αλληλουχίας τους και κυμαίνεται συνήθως μεταξύ από 58-62 °C. Τέλος ο πολυμερισμός πραγματοποιείται στους 72 °C και ο χρόνος του είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με το μήκος της αλληλουχίας που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι απαραίτητη η χρήση τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, το ένζυμο DNA πολυμεράση, ένα ζεύγος εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος) και ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα. Οι όγκοι που θα προσθέσουμε από τα παραπάνω συστατικά είναι ανάλογοι με τις τελικές συγκεντρώσεις που επιθυμούμε στο τελικό όγκο της αντίδρασης. Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ζεύγη εκκινητών για τα μέλη της οικογένειας *BCL2* και πιο συγκεκριμένα για τα γονίδια *BCL2*, *BCLXL*, *BCL2L2*, *BCL2A1*, *BAX*, *BAK1*, *BIM* και *BCL2L12*.

### **2.7.2 Γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes)**

Τα γονίδια σταθερής έκφρασης εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού υπό φυσιολογικές και υπό παθο-φυσιολογικές συνθήκες, ενώ είναι απαραίτητα για τη διατήρηση των βασικών λειτουργιών των κυττάρων. Η σταθερή έκφραση τους τα καθιστά εις θέσιν να χρησιμοποιούνται ως μέτρο σύγκρισης μεταξύ των διάφορων αποτελεσμάτων μελέτης mRNA ενός ή περισσότερων γονιδίων σε διαφορετικά δείγματα. Αναλυτικότερα, τα γονίδια σταθερής έκφρασης χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του

cDNA, και άρα πιστοποιούν έμμεσα τη ποιότητα του RNA που απομονώθηκε και την απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο σταθερής έκφρασης *HPRT1* (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1).

### 2.7.3 Σχεδιασμός εκκινητών PCR

Ο σχεδιασμός ειδικών εκκινητών είναι πολύ σημαντικός για την επιτυχή ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR. Οι εκκινητές θα πρέπει να πολλαπλασιάζουν αποκλειστικά και μόνο την επιθυμητή αλληλουχία, έτσι ώστε να μην οδηγούμαστε σε παραγωγή παραπροϊόντων, επιπλέον θα πρέπει να αποφευχθεί ο σχηματισμός ετεροδιμερών που μειώνει την απόδοση της αντίδρασης. Για όλα τα παραπάνω κατά το σχεδιασμό εκκινητών πρέπει να τηρηθούν τα εξής κριτήρια:

- Οι εκκινητές να έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτίδια, ώστε να παρουσιάζουν αυξημένη ειδικότητα προς την επιθυμητή αλληλουχία.
- Τα 3'-άκρα των εκκινητών να αποφεύγεται να έχουν περισσότερες από 2-3 G ή C, για να μη προκύψει μη επιθυμητός υβριδισμός σε περιοχές πλούσιες σε GC.
- Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πρέπει να αποφευχθούν, για να μην έχουμε ολίσθηση του εκκινητή πάνω στην αλυσίδα-εκμαγείο.
- Περιορισμένη δυνατότητα σχηματισμού δευτεροταγούς δομής, λόγω εσωτερικής συμπληρωματικότητας.

### 2.7.4 Εκκινητές PCR για τον έλεγχο έκφρασης γονιδίου αναφοράς *HPRT1*

Για το πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου γονιδίου χρησιμοποιήθηκε πρόσθιος εκκινητής, που είναι συμπληρωματικός με μια αλληλουχία του εξωνίου 2, ενώ ο ανάστροφος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε είναι συμπληρωματικός με μια αλληλουχία του εξωνίου 3 (Πίνακας 4). Το μήκος του προϊόντος PCR που προκύπτει είναι 151 bp.

**Πίνακας 4:** Ιδιότητες εκκινητών για το γονίδιο του HPRT1

Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Tm (°C)
HPRT1 Ex2F	TGGAAAGGGTGTTTATTCTCAT	23	56
HPRT1 Ex3R	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA	22	59

### 2.7.5 Εκκινητές PCR για τα μέλη της οικογένειας BCL2

Πριν σχεδιαστούν εκκινητές για τα μέλη της οικογένειας BCL2, έγινε έρευνα στη πλατφόρμα The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) για το ποια από τα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν υψηλή έκφραση στο καρκίνο του προστάτη. Επιπλέον, έγινε χρήση της κυτταρικής σειράς HL-60, που παρουσιάζει υψηλή έκφραση των γονιδίων της οικογένειας BCL2 για να ελεγχθεί εάν οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί σωστά. Όπως αναφέρθηκε στη παρούσα εργασία επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν τα γονίδια *BCL2*, *BCLXL*, *BCL2L2*, *BCL2A1*, *BAX*, *BAK1*, *BIM* και *BCL2L12*. Με τη χρήση του λογισμικού Primer Blast, σχεδιάστηκαν ζεύγη ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων cDNA (Πίνακας 5). Τα μήκη των προϊόντων που προκύπτουν αναφέρονται στο κομμάτι των αποτελεσμάτων.

**Πίνακας 5:** Ιδιότητες εκκινητών για τα μέλη της οικογένειας BCL2.

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Tm (°C)
<i>BCL2</i>	BCL2 Ex2REAL F	TCGCCCTGTGGATGACTGA	19	62
	BCL2 Real R	CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA	22	61
<i>BCLX</i>	BCLX Ex2L real F	CGTGGAAGCGTAGACAAGGA	21	60
	BCLX Ex4L R	TCCAAGGCTCTAGGTGGTCA	20	61
<i>BCL2L2</i>	BCL2L2 Ex3 real F	GTGGATGGTGGCCTACCT	18	61
	BCL2L2 Ex4 real R	CCGTCCCCGTATAGAGCTG	19	61
<i>BCL2A1</i>	BCL2A1 Ex1 real F	GATAAGGCCAAAACGGAGGCTG	21	59
	BCL2A1 Ex2 real R	CTTCTTGTGGGCCACTGAC	19	59
<i>BAX</i>	BAX EX.4F Real	CCGAGAGGTCTTTTCCGAG	20	59
	BAX EX.4/5R Real	GTGCACAGGGCCTTGAGC	18	64
<i>BAK</i>	BAK ex3F	GGTCACCTTACCTCTGCAACCT	22	62

	BAK ex4R	CATAGGCATTCTCTGCCGTGGG	22	64
<i>BIM</i>	BIM ex2F	CTTTTGACACAGACAGGAGCCC	22	62
	BIM ex3R	TGGGCGCATATCTGCAGGTT	20	63
<i>BCL2L2</i>	BCL2L2 Ex3 real F	GTGGATGGTGGCCTACCT	18	61
	BCL2L2 Ex4 real R	CCGTCCCCGTATAGAGCTG	19	61

### 2.7.6 Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μL cDNA προερχόμενο από 2μg RNA, 1μL από κάθε εκκινητή, πρόσθιο και ανάστροφο, τελικής συγκέντρωσης 0,4μM και 2,5μL Buffer με τελική συγκέντρωση Mg 1,5mM. Επιπλέον, προστέθηκαν 0,5μL dNTPs, με συγκέντρωση 10nM το καθένα από τα 4 νουκλεοτίδια και τελική συγκέντρωση του καθενός 0,2mM, προστέθηκε ακόμα 0,2μL πολυμεράσης (200 units) και τέλος όγκος DEPC-H<sub>2</sub>O, μέχρι να φτάσει η αντίδραση σε τελικό όγκο 25μL. Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής: για τη θερμική αποδιάταξη επώασαμε στους 95°C για 3min, στη συνέχεια εφαρμόσαμε 35 κύκλους με 95 °C για 30sec, 60 °C για 30sec για τη πρόσδεση των εκκινητών, 72°C για 1,5 min, και τέλος ένα στάδιο επιμήκυνσης σε 72°C για 2 min.

## 2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου – Real-time PCR

### 2.8.1 Αρχή Μεθόδου

Η Real-time PCR είναι μια παραλλαγή της απλής μεθόδου PCR, όπου ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας DNA και η ανίχνευση της γίνονται ταυτόχρονα. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται τόσο ποσοτικά, όσο και ημιποσοτικά. Η μέθοδος αξιοποιεί μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, που παρεμβάλλονται μεταξύ οποιοδήποτε δίκλωνου DNA ή σε σημασμένους ιχνηθέτες (probes), οι οποίοι αποτελούνται

από ολιγονουκλεοτίδια σημασμένα με φθορίζοντα ιχνηθέτη, είναι εξειδικευμένοι έναντι συγκεκριμένης αλληλουχίας και εντοπίζονται μόνο μετά τον υβριδισμό με τη συμπληρωματική αλληλουχία.

Η πορεία της συγκεκριμένης μεθόδου περιλαμβάνει μια σειρά θερμοκρασιακών αλλαγών που επαναλαμβάνονται 25-50 φορές. Οι κύκλοι που πραγματοποιούνται περιλαμβάνουν τα ακόλουθα στάδια: το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας DNA και πραγματοποιείται στους 95°C, το επόμενο στάδιο πραγματοποιείται μεταξύ 68-72°C και επιτρέπει το πολυμερισμό από τη DNA πολυμεράση. Το τρίτο στάδιο συνήθως παραλείπεται λόγω του μικρού μεγέθους των τμημάτων και εξαιτίας της ικανότητας του ενζύμου να αυξάνει τον αριθμό των τμημάτων κατά την αλλαγή του σταδίου υβριδισμού και αποδιάταξης. Τέλος πραγματοποιείται η μέτρηση της χρωστικής, σε μια σύντομη φάση με αυξημένη θερμοκρασία, πχ 80 °C, και διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα σε κάθε κύκλο, για τη μείωση του σήματος που μπορεί να προκληθεί από τα διμερή εκκινητών. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι, κάθε κύκλου εξαρτώνται από αρκετούς παράγοντες, όπως είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται, τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, καθώς και από τη συγκέντρωση δισθενών ιόντων και διδεοξυ-νουκλεοτιδίων στην αντίδραση. Η χρωστική που χρησιμοποιείται προσδένεται στα δίκλιωνα μόρια DNA στη PCR, συνεπώς μια αύξηση στο DNA προϊόν οδηγεί σε ευθέως ανάλογη αύξηση της έντασης του φθορισμού. Ωστόσο, η χρωστική προσδένεται σε όλους τους τύπους δίκλωνου DNA χωρίς εκλεκτικότητα, άρα μπορεί να προσδεθεί και σε διμερή που έχουν κάνει οι εκκινητές. Το γεγονός αυτό, οδηγεί σε δυσκολία παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης της αναμενόμενης αλληλουχίας στόχου.

Στη PCR πραγματικού χρόνου είναι δυνατή τη ταυτοποίηση εξειδικευμένων, πολλαπλασιασμένων θραυσμάτων DNA μέσω ανάλυσης των θερμοκρασιών τήξης (melting temperature,  $T_m$ ). Η ανάλυση αυτή βασίζεται σε PCR με χρωστικές έναντι των δίκλωνων DNA, με συνηθέστερη τη SYBR Green. Η αντίδραση προετοιμάζεται ως συνήθως, έχουμε προσθήκη της χρωστικής και λαμβάνει χώρα σε ένα μηχάνημα real-time PCR και έπειτα από κάθε κύκλο, η ένταση της χρωστικής μετριέται με έναν ανιχνευτή. Σε αντίθεση με την απλή PCR, η μέθοδος αυτή δε χρησιμοποιεί ηλεκτροφορητικές τεχνικές για την αναπαράσταση των αποτελεσμάτων, αφού είναι μια τεχνική κινητικής και η ποσοτική PCR ειδικότερα, αξιολογείται σε ένα διακριτό τελικό σημείο. Ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται μόνο σε

περίπτωση που η Real-time PCR αφήνει κάποιες αμφιβολίες σχετικά με τη ταυτοποίηση του προϊόντος. Αξίζει να σημειωθεί, πως η ανίχνευση του προϊόντος δε πραγματοποιείται κατά τους πρώτους κύκλους της αντίδρασης, αλλά κατά τη εκθετική φάση παραγωγής του προϊόντος ενδιαφέροντος. Στη φάση αυτή έχουμε συσσώρευση του προϊόντος της αντίδρασης, με αποτέλεσμα να ξεπεράσει το σήμα του υποβάθρου, φτάνοντας έτσι σε μια εκθετική φάση όπου τα αντιδραστήρια είναι σε περίσσεια και καταναλώνονται ταχύτατα. Αφού έχουν ολοκληρωθεί κάποιοι κύκλοι και η απόδοση έχει μεγιστοποιηθεί με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του προϊόντος σε κάθε κύκλο, η εκθετική φάση διαδέχεται τη γραμμική. Κατά τη φάση αυτή, προκαλείται σταδιακή μείωση της απόδοσης της αντίδρασης, αφού έχουμε μερική αποικοδόμηση του προϊόντος και κατά το τελευταίο στάδιο παρατηρείται μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας των μορίων της DNA πολυμεράσης.

#### **2.8.2 Συνθήκες ποσοτικής Real-time PCR για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των γονιδίων της οικογένειας BCL2.**

Στην αντίδραση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης η χρωστική SYBR Green, η οποία έχει περιγραφεί προηγουμένως. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε και η χρωστική ROX, η οποία χρησιμοποιείται ως χρωστική παθητικής αναφοράς, για την κανονικοποίηση του σήματος της SYBR Green και έχει αμετάβλητο σήμα φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Αυτή η κανονικοποίηση είναι απαραίτητη για τη διόρθωση των διαφορών του φθορισμού σε περιπτώσεις προσθήκης διαφορετικής ποσότητας χρωστικής στις μοναδιαίες αντιδράσεις. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), ο οποίος φέρει κατάλληλη υποδοχή για μικροπλακίδια 96 θέσεων. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για το πολυμερισμό ονομάζεται KAPA SYBR FAST DNA polymerase, που αποτελεί μια ανασυνδυασμένη Taq πολυμεράση που προέρχεται από την *Escherichia coli*, και διαθέτει υψηλή καθαρότητα και πολύ υψηλή ενεργότητα πολυμερισμού. Η συγκεκριμένη πολυμεράση παραμένει αδρανής μέχρι να φτάσει η θερμοκρασία 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα στο ένζυμο να δράσει όταν το DNA είναι πλήρως αποδιαταγμένο, ενώ αποφεύγεται και η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων.

Για την ενίσχυση τμημάτων cDNA των γονιδίων της οικογένειας BCL2, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο KAPA™ SYBR® FAST qPCR master mix (2X) (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA), στο οποίο προσθέτουμε πριν την ανάμιξη των προϊόντων την παθητική χρωστική ROX (KAPA Biosystems). Πιο συγκεκριμένα, σε 0,5μL cDNA προερχόμενο από 2μg RNA προσθέτουμε 5μL KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) και ROX (Cτελ=1X), 1μL από κάθε εκκινητή (Πίνακας 4), πρόσθιο και ανάστροφο (Cτελ=200nM) και DEPC-H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 10 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, ξεκινούσε με θέρμανση στους 95°C για 3min για αποδιάταξη του DNA και ενεργοποίηση της πολυμεράσης, ακολουθούν 40 κύκλοι, όπου αποτελούνται από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του σχηματισμένου PCR προϊόντος στους 95°C για 3sec και ένα στάδιο υβριδισμού των εκκινητών στο υπόστρωμα και πολυμερισμού στους 60°C για 30sec. Το τελευταίο στάδιο, μετά την ολοκλήρωση των κύκλων, περιελάμβανε τη καμπύλη τήξης του δίκλωνου DNA που είχε σχηματιστεί.

## **2.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

### **2.9.1 Αρχή Μεθόδου**

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια εύκολη και γρήγορη διαδικασία διαχωρισμού προϊόντων νουκλεϊκών οξέων, με βάση το μέγεθος τους. Βασίζεται στο αρνητικό φορτίο που φέρουν τα νουκλεϊκά οξέα και μπορούν να κινούνται προς το θετικά φορτισμένο πόλο, παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος. Η αγαρόζη, που χρησιμοποιούμε δημιουργεί πόρους στο πήκτωμα αντιστρόφως ανάλογους με τη συγκέντρωση της και επιτρέπουν το διαχωρισμό των μορίων, αφού ανάλογα με το μέγεθος διέρχονται από το πήκτωμα με μεγαλύτερη ή μικρότερη ευκολία. Παράλληλα με το δείγμα στο πήκτωμα προστίθεται ένας μάρτυρας (ladder), οι ζώνες του οποίου έχουν γνωστό μέγεθος και μέσω αυτού μπορούμε να προσδιορίσουμε τα μήκη των άγνωστων ζωνών του δείγματος και με βάση αυτό να αποκτήσουμε μια πρώτη εικόνα για το μήκος του κάθε προϊόντος.



### **2.9.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντα των γονιδίων της οικογένειας BCL2**

Ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος που αναμένεται, κατασκευάσαμε πήκτωμα κατάλληλης συγκέντρωσης. Αναμίξαμε την σκόνη αγαρόζης με Tris/Βορικό/EDTA Buffer 1X (TBE) και πραγματοποιήθηκε διάλυση της αγαρόζης στους 100°C για 4min. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη αναλογία 1:10.000 της χρωστικής ουσίας, βρωμιούχο αιθίδιο, η οποία εκπέμπει στο υπεριώδες και τέλος ηλεκτροφορήσαμε στα 170 ή 180 V, με την χρήση διαλύματος TBE 0,5X.

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην αρχή της πειραματικής πορείας πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός ώστε να διευκρινιστούν τα απαραίτητα βήματα, για τον προσδιορισμό τόσο του ρυθμού πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς, όσο και της ανασταλτικής συγκέντρωσης (inhibition concentration,  $IC_{50}$ ) του καθενός από τους δύο φαρμακευτικούς παράγοντες, η οποία μειώνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς στο 50% στις 72 ώρες. Για όλα τα παραπάνω έπρεπε να κατασκευασθούν πρότυπες καμπύλες οπτικής απορρόφησης προς τον αριθμό των κυττάρων οι οποίες βοήθησαν να προσδιοριστεί αδρά η βέλτιστη συγκέντρωση που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί κατά την επίστρωση των κυττάρων.

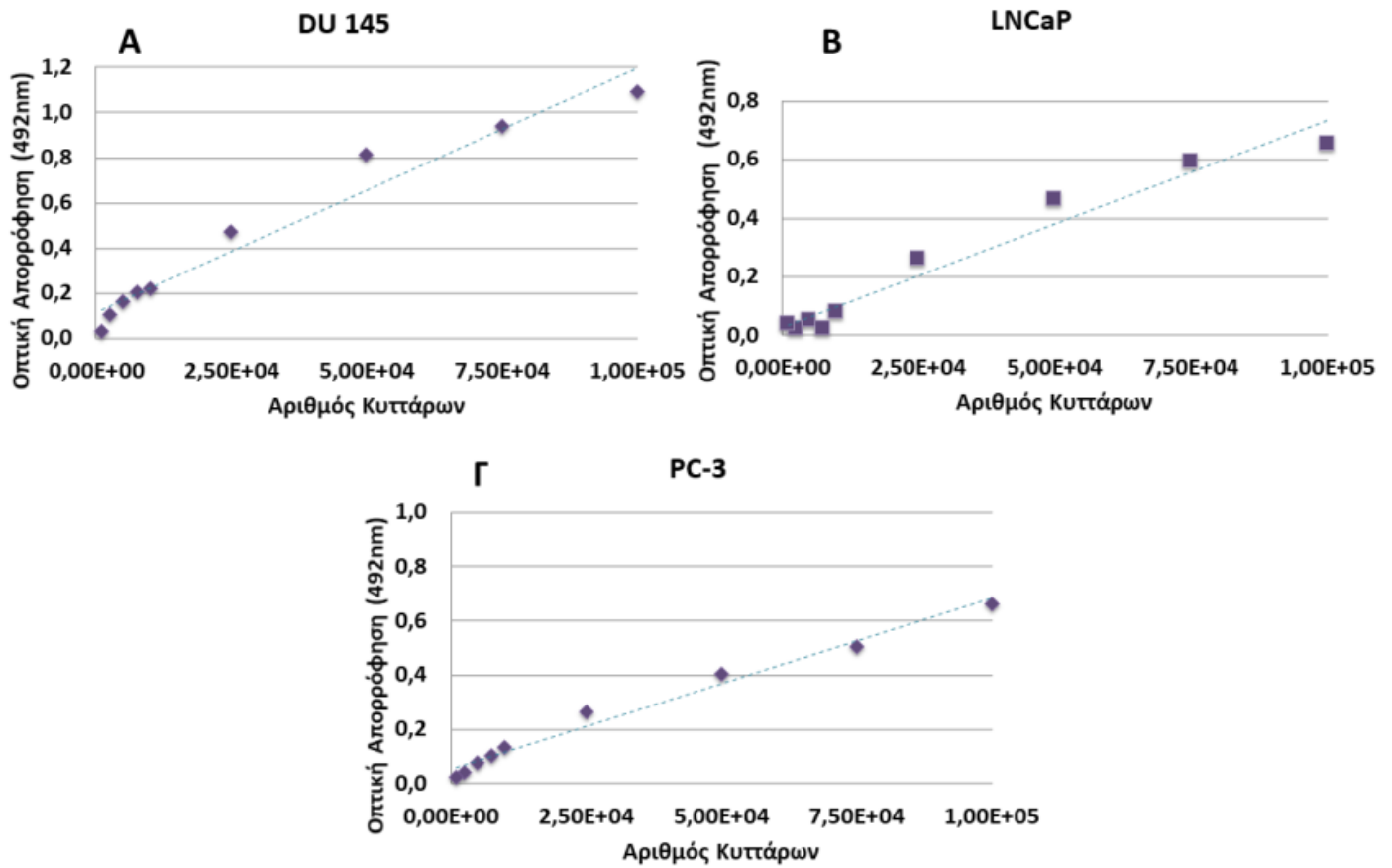
Ακολούθησε, χρήση του αντιδραστηρίου SRB, σε μικρή κλίμακα (μικροπλακίδια των 96 θέσεων σε τετραπλέτες), με σκοπό το προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης επίστρωσης, στην οποία στις 72 ώρες η καλλιέργεια θα αυξανόταν με εκθετικό ρυθμό και στη συνέχεια η συγκέντρωση δοκιμάστηκε και σε μεγάλη κλίμακα (φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με επιφάνεια  $25\text{ cm}^2$ ) με την χρήση του αντιδραστηρίου Trypan Blue.

Αφού πραγματοποιήθηκαν αυτά τα βήματα για κάθε κυτταρική σειρά, ακολούθησε σε τετραπλέτες και σε μικροπλακίδια των 96 θέσεων και με την χρήση του SRB, επίδραση με μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων των δύο φαρμακευτικών παραγόντων ώστε να προσδιοριστεί ένα μικρότερο εύρος συγκεντρώσεων που στις 72 ώρες θα έχουμε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο 50%. Μετά τον προσδιορισμό των βέλτιστων συγκεντρώσεων των δύο παραγόντων σε μικρή κλίμακα, έπρεπε να προσδιοριστεί η τελική συγκέντρωση σε μεγάλη κλίμακα (φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με επιφάνεια  $25\text{ cm}^2$ ).

#### **Μέτρηση οπτικής απορρόφησης (OD) ως προς τον αριθμό των κυττάρων**

Έγινε χρήση του αντιδραστηρίου SRB σε μικροπλακίδια των 96 θέσεων, για την κατασκευή καμπυλών οπτικής απορρόφησης προς τον αριθμό των κυττάρων για τις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη. Αρχικά, έγινε επίστρωση κυττάρων σε τετραπλέτες με αριθμό  $1,00E+03$ ,  $2,50E+03$ ,  $5,00E+03$ ,  $7,50E+03$ ,  $1,00E+04$ ,  $2,50E+04$ ,  $5,00E+04$ ,  $7,50E+04$  και  $1,00E+05$  και πραγματοποιήθηκε μέτρηση στις 24 ώρες. Αυτό το βήμα επιτελέστηκε με σκοπό να προσδιοριστεί αδρά η συγκέντρωση των κυττάρων στην οποία τα κύτταρα από την κάθε κυτταρική σειρά θα βρισκόντουσαν σε εκθετική φάση

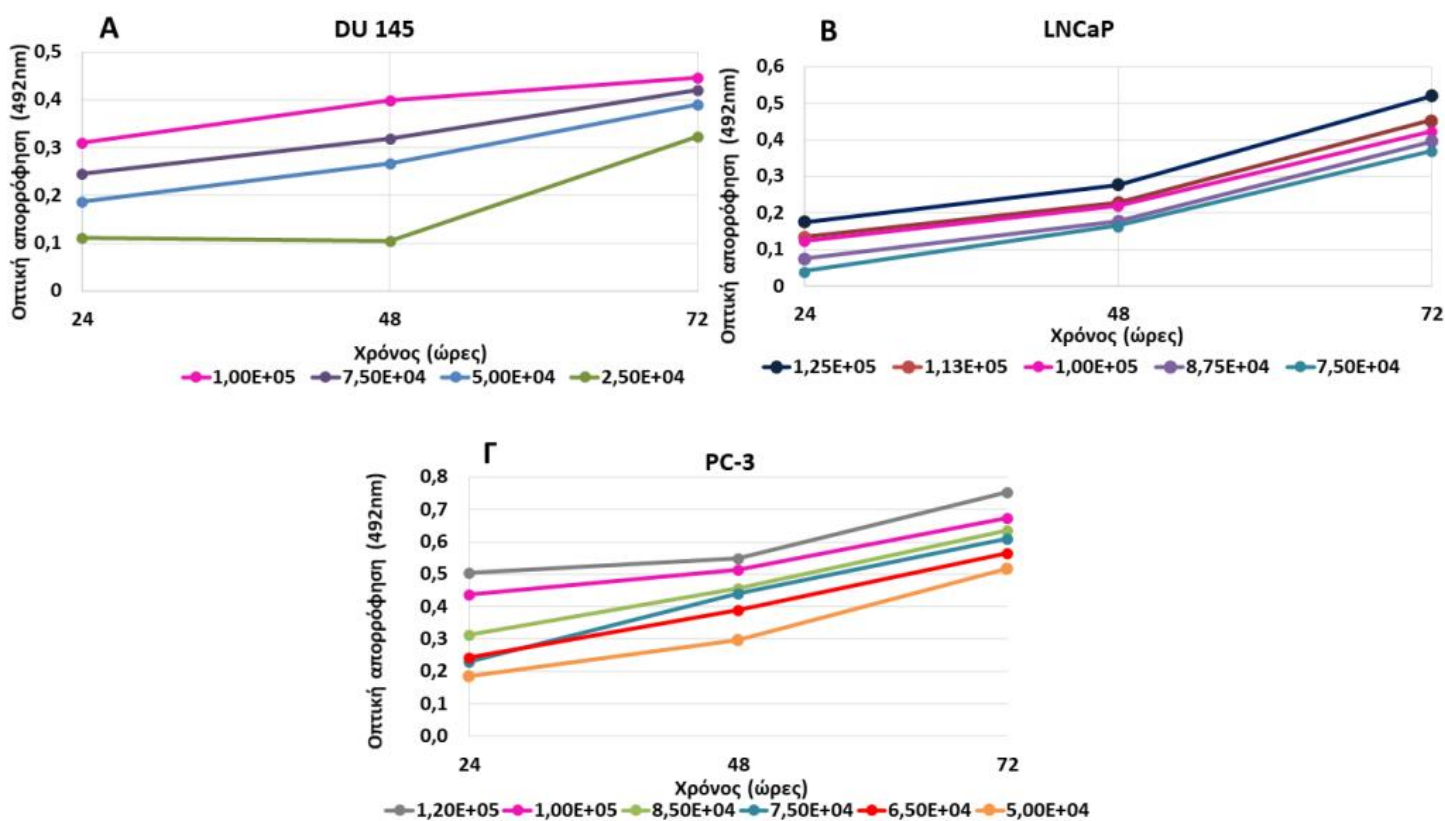
πολλαπλασιασμού στις 72 ώρες και θα ήταν όσο το δυνατόν περισσότερα. Οι χαρακτηριστικές καμπύλες παρατίθενται στη συνέχεια (Σχήμα 3.1).



**Σχήμα 3.1:** Καμπύλες παλινδρόμησης για τις κυτταρικές σειρές: A) DU 145, B) LNCaP, Γ) PC-3.

### Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικών σειρών σε μικρή κλίμακα.

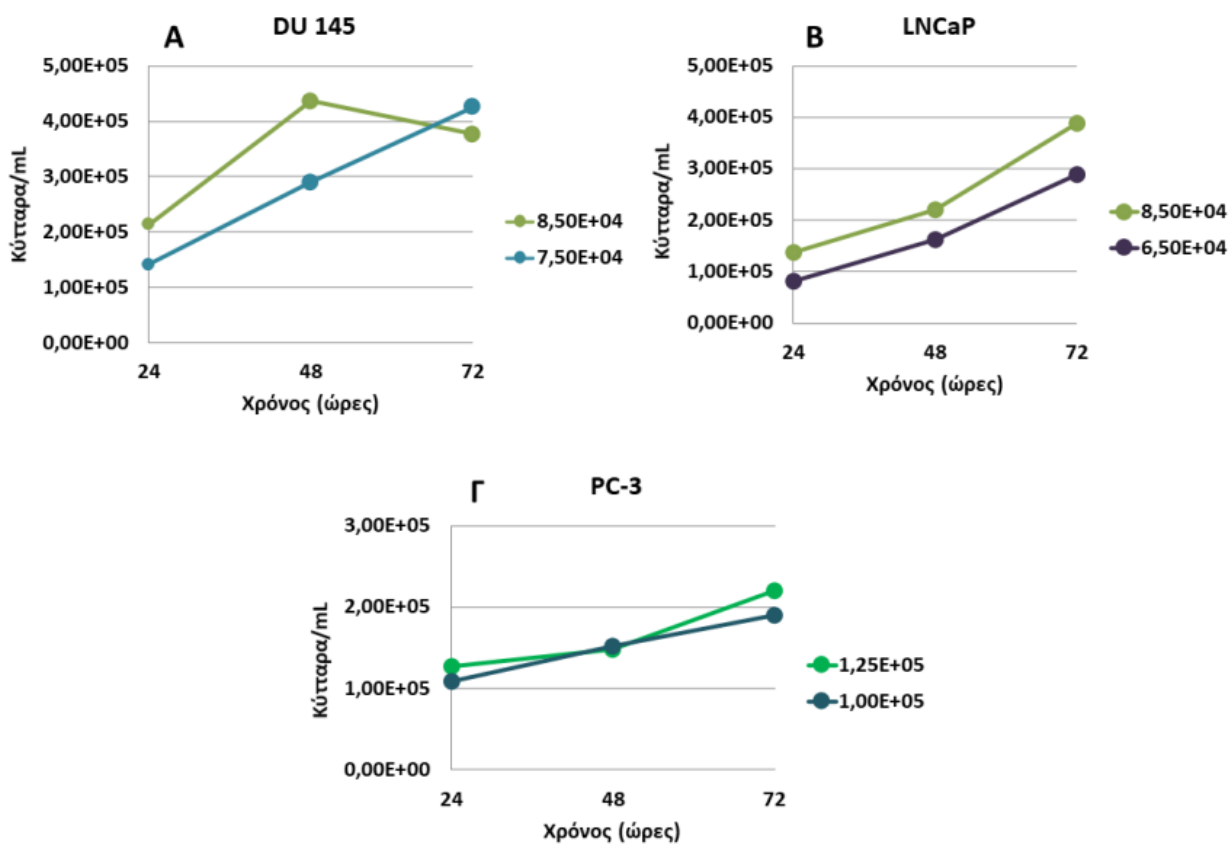
Σε επόμενο βήμα, πραγματοποιήθηκε επίστρωση μικροπλακιδίων 96 θέσεων για συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για κάθε κυτταρική σειρά, με μικρότερο εύρος και προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων για κάθε κυτταρική σειρά στις 24, 48 και στις 72 ώρες, σε τετραπλέτες, με την χρήση του αντιδραστηρίου SRB (Σχήμα 3.2). Με βάση τα αποτελέσματα, αποφασίστηκε η δοκιμή σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με επιφάνεια 25 cm<sup>2</sup>, αφού σκοπός ήταν να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων ανά mL σε μεγάλη επιφάνεια ώστε να προσδιορίζονται αποτελέσματα τα οποία είναι πιο κοντά στην *in vivo* κατάσταση αλλά και για να υπάρχει μεγάλος αριθμός κυττάρων για τα μετέπειτα στάδια.



**Σχήμα 3.2:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών, σε μικρή κλίμακα, για διάφορες συγκεντρώσεις αρχικής επίστρωσης, όπου: A) DU 145, B) LNCaP, Γ) PC-3.

### Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικής σειράς σε μεγάλη κλίμακα

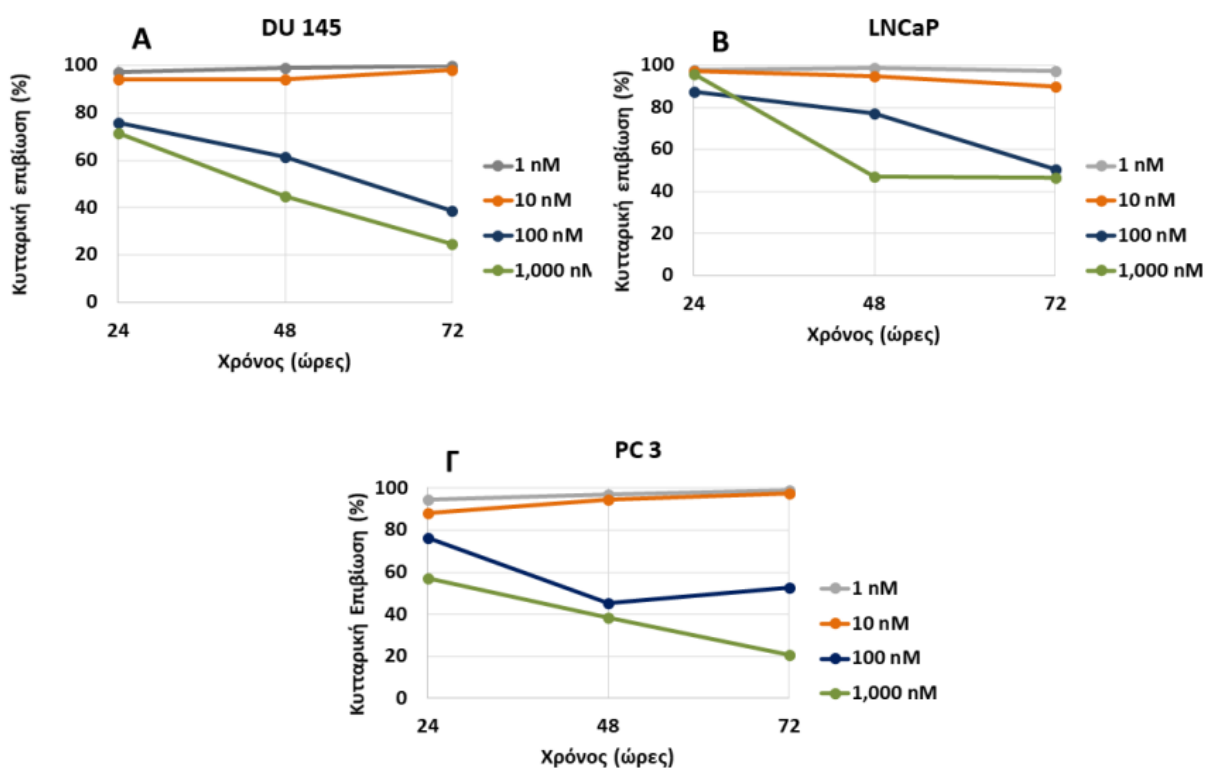
Στο στάδιο αυτό, αποφασίστηκε η τελική συγκέντρωση κυττάρων ανά mL, για τη κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά, σύμφωνα με την οποία, στο προηγούμενο στάδιο μικρής κλίμακας και συγκεκριμένα στις 72 ώρες παρατηρείται εκθετική αύξηση της καλλιέργειας, ενώ υπάρχει ο μέγιστος αριθμός κυττάρων στην καλλιέργεια. Έγινε χρήση του αντιδραστηρίου Trypan Blue. Διερευνήθηκαν δύο συγκεντρώσεις για κάθε κυτταρική σειρά,  $8,50E+04$  και  $7,50E+04$  κύτταρα/mL για τη κυτταρική σειρά DU 145,  $8,50E+04$  και  $6,50E+04$  κύτταρα/mL για τη κυτταρική σειρά LNCaP και τέλος,  $1,25E+05$  και  $1,00E+05$  κύτταρα/mL για τη κυτταρική σειρά PC-3. Έπειτα, από τις καμπύλες που σχεδιάστηκαν (Σχήμα 3.3) επιλέχθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις:  $7,50E+04$  κύτταρα/mL για τη κυτταρική σειρά DU 145,  $8,50E+04$  κύτταρα/mL για τη κυτταρική σειρά LNCaP και  $1,00E+05$  κύτταρα/mL για τη κυτταρική σειρά PC-3.



**Σχήμα 3.3:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών μεγάλης κλίμακας για διάφορες συγκεντρώσεις αρχικής επίστρωσης, όπου: Α) DU 145, Β) LNCaP, Γ) PC-3.

**Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικής σειράς υπό την επίδραση παράγοντα, σε μικρή κλίμακα**

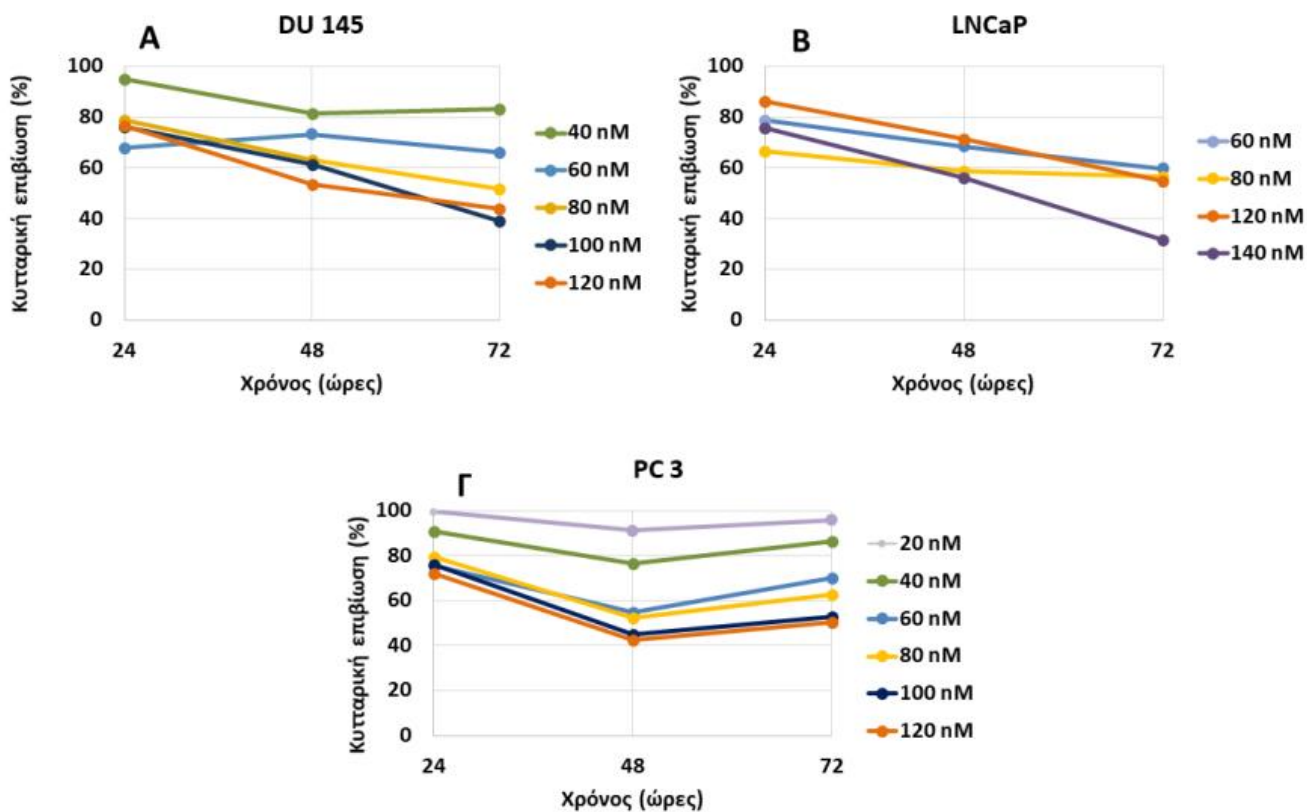
Προχωρώντας, για της συγκεντρώσεις επίστρωσης που προσδιορίστηκαν σε κάθε κυτταρική σειρά, έπρεπε να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση φαρμάκου η οποία στις 72 ώρες καλλιέργειας θα μείωνε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού στο 50% σε σχέση με καλλιέργεια στην οποία δεν έχει χορηγηθεί παράγοντας. Έτσι, αρχικά έγινε αδρή δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων (1000nM, 100nM, 10nM και 1nM) για το Carfilzomib σε μικροπλακίδια των 96 θέσεων και σε τετραπλέτες, με την χρήση του αντιδραστηρίου SRB, ώστε τα επόμενα πειράματα να γίνουν εντός του επιθυμητού εύρους συγκεντρώσεων (Σχήμα 3.4).



**Σχήμα 3.4:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών έπειτα από την επίδραση με

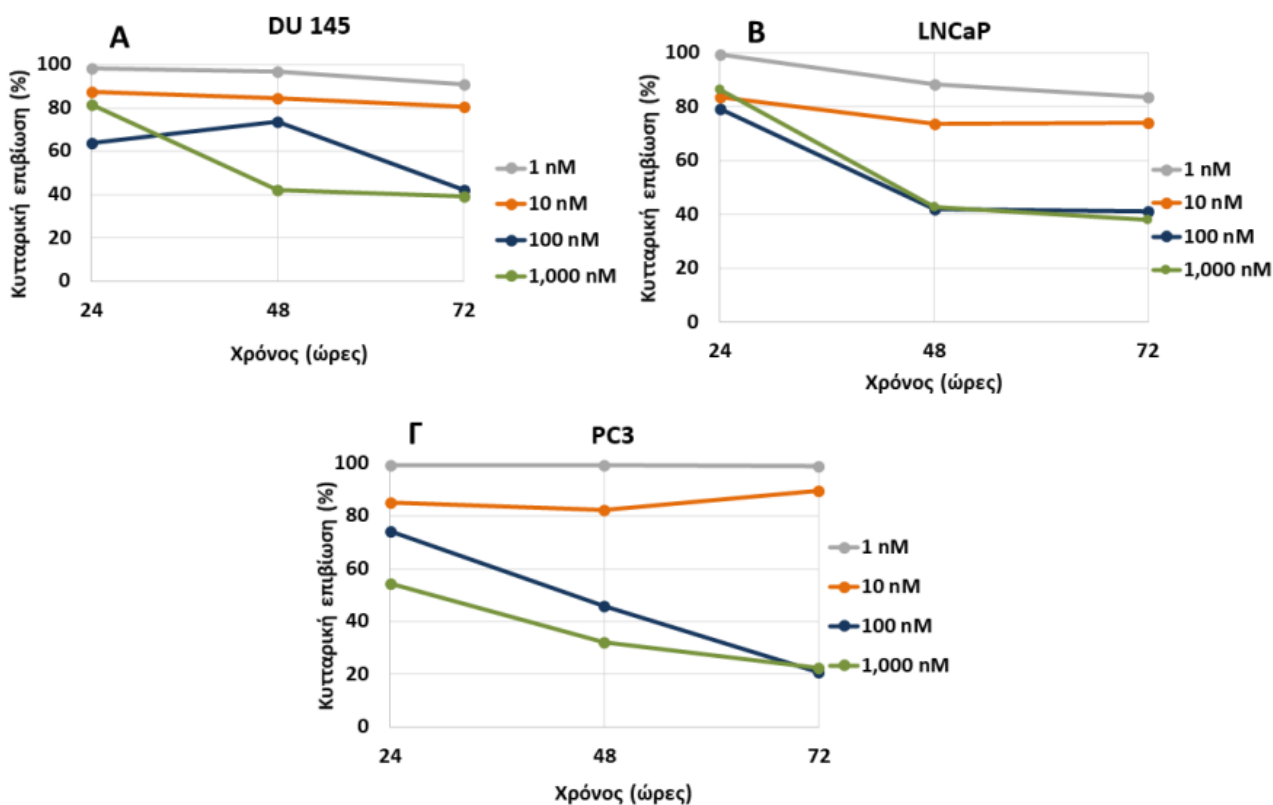
δοκιμαστικές συγκεντρώσεις Carfilzomib σε μικρή κλίμακα. Α) DU 145, Β) LNCaP, Γ) PC-3.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, ακολούθησε δοκιμή συγκεντρώσεων σε πιο στενό εύρος, και συγκεκριμένα μεταξύ 100-10nM φαρμακευτικού παράγοντα.



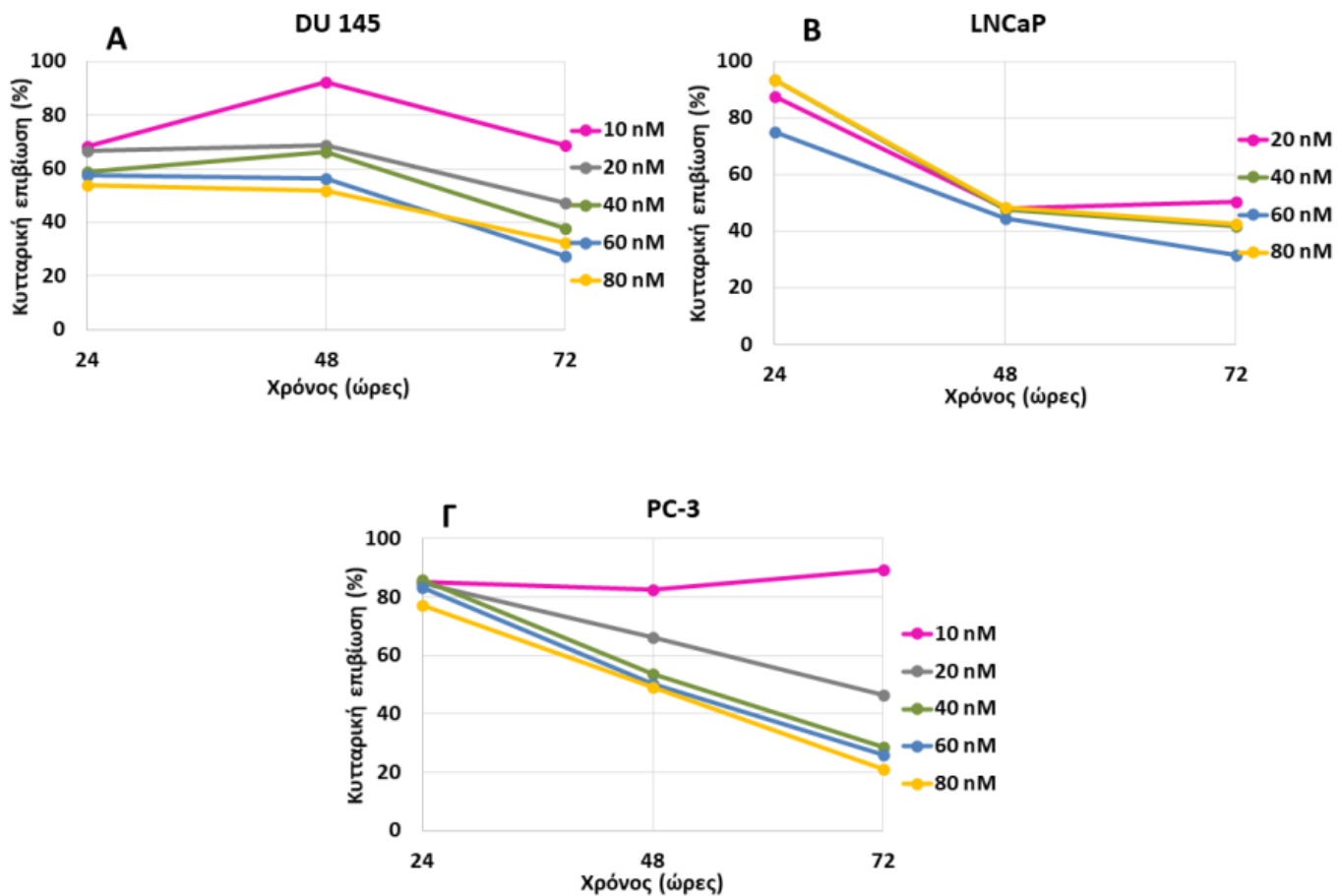
**Σχήμα 3.5:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών υπό την επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις από το Carfilzomib σε μικρή κλίμακα. Α) DU 145, Β) LNCaP, Γ) PC-3.

Ομοίως, ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία και για το Bortezomib. Παρακάτω, παρατίθενται τα αρχικά γραφήματα, για την αδρή δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (Σχήμα 3.6) και παρατίθενται επίσης, γραφήματα με δοκιμή συγκεντρώσεων σε πιο στενό εύρος, κυρίως ανάμεσα στα 100-10nM (Σχήμα 3.7). Τέτοιες δοκιμές εφαρμόστηκαν και στις τρεις κυτταρικές σειρές.



**Σχήμα 3.6:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών έπειτα από την επίδραση με δοκιμαστικές συγκεντρώσεις Bortezomib σε μικρή κλίμακα. Α) DU 145, Β) LNCaP, Γ) PC-3.



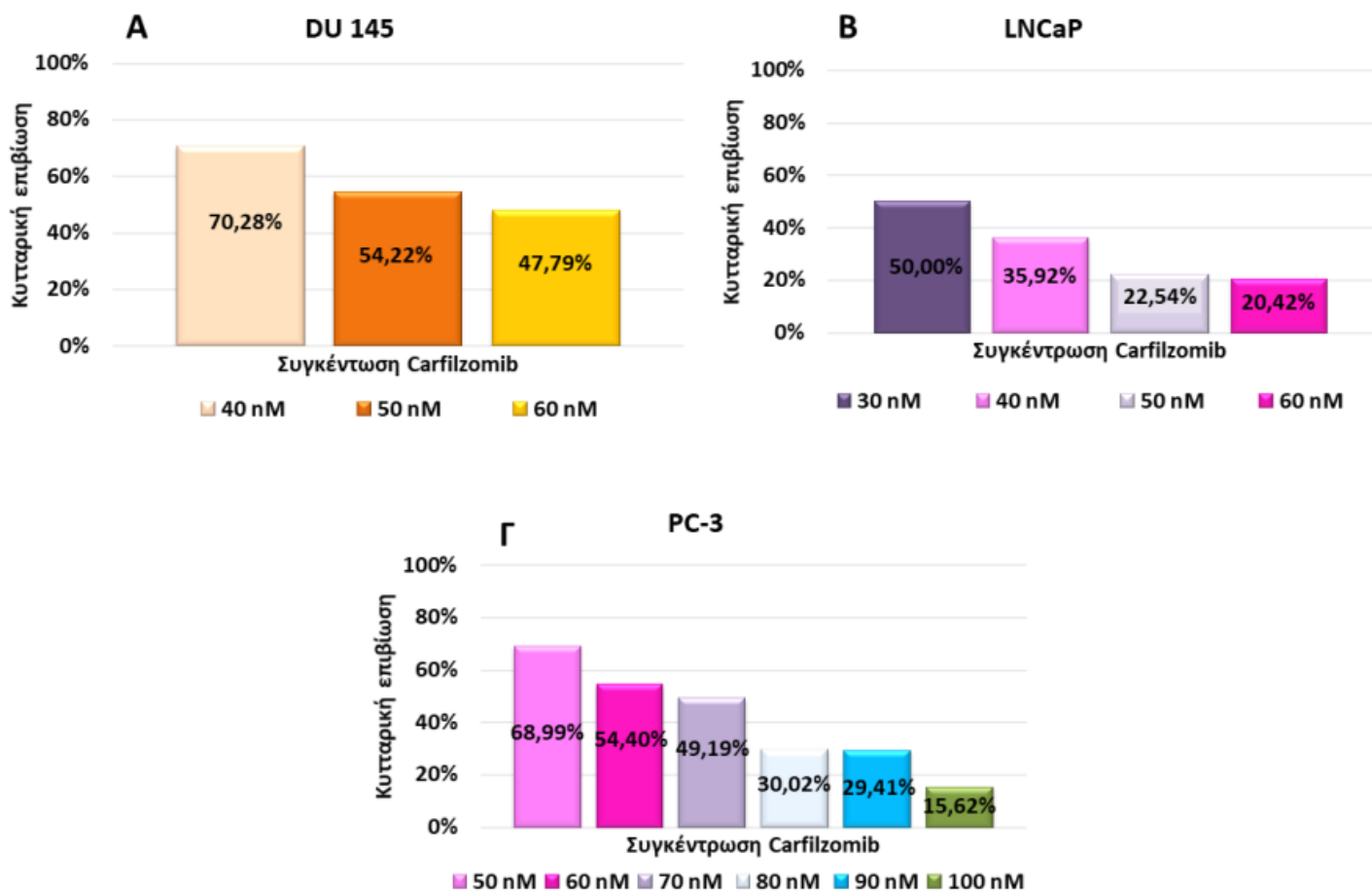


**Σχήμα 3.7:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών υπό την επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις από το Bortezomib σε μικρή κλίμακα A) DU 145, B) LNCaP, Γ) PC-3.

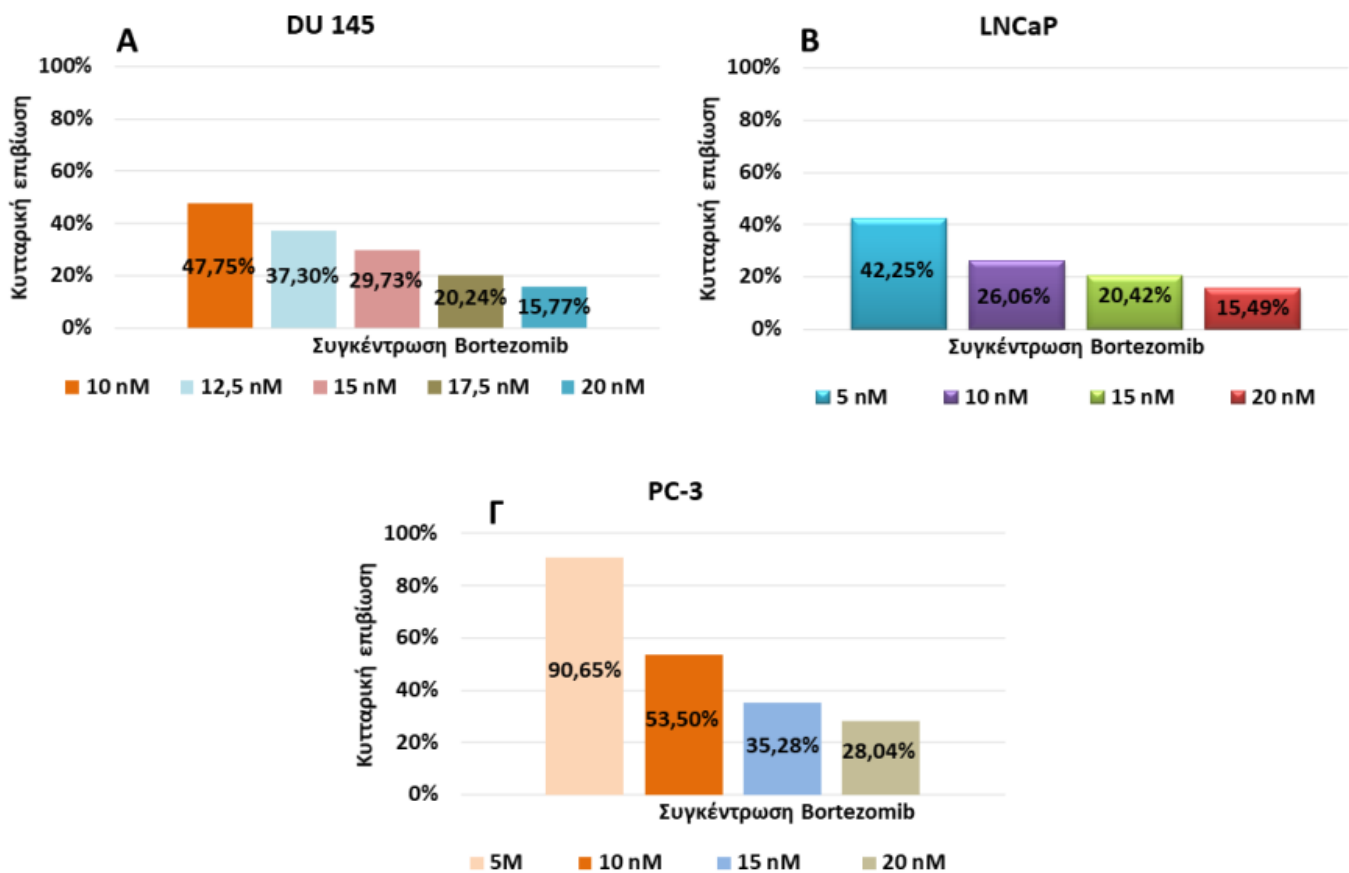
**Καμπύλη ανάπτυξης κυτταρικής σειράς υπό την επίδραση παράγοντα, σε μεγάλη κλίμακα**

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, έχουμε καταλήξει σε αρχικές συγκεντρώσεις επίστρωσης κυττάρων ανά mL καθώς και σε συγκεντρώσεις για κάθε φαρμακευτικό παράγοντα που προκαλούν μείωση της κυτταρικής επιβίωσης στις 72 ώρες. Έτσι, εφαρμόζουμε τις συγκεντρώσεις που έχουν επιλεγεί στη μεγάλη κλίμακα, με σκοπό τον τελικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης φαρμάκου που προκαλεί μείωση της κυτταρικής επιβίωσης κατά 50%. Πιο συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση επιλέξαμε κάποιες συγκεντρώσεις με τις οποίες σε μικρή κλίμακα έδιναν ένα ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης κοντά στο 50%,

όμως σε μεγάλη κλίμακα δεν έδωσαν το ίδιο αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών επιλέγοντας συγκεντρώσεις που στη μικρή κλίμακα έδιναν ποσοστό επιβίωσης γύρω στο 30% και για τους δύο φαρμακευτικούς παράγοντες (Σχήμα 3.8, 3.9).

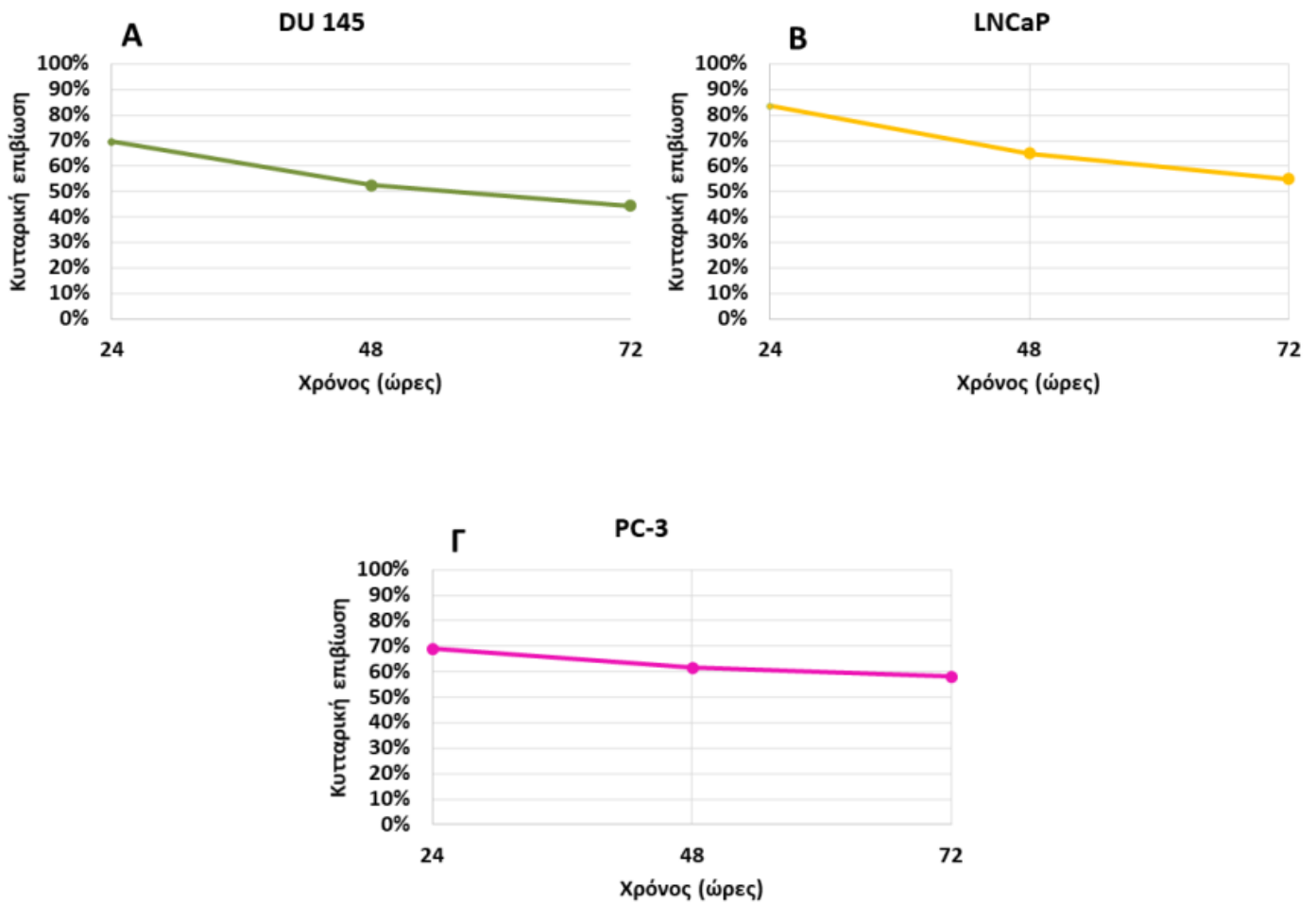


**Σχήμα 3.8:** Απεικόνιση του ποσοστού επιβίωσης ανάλογα με τη συγκέντρωση Carfilzomib που χρησιμοποιήθηκε, σε μεγάλη κλίμακα στις 72 ώρες A) DU 145, B) LNCaP, Γ) PC-3.

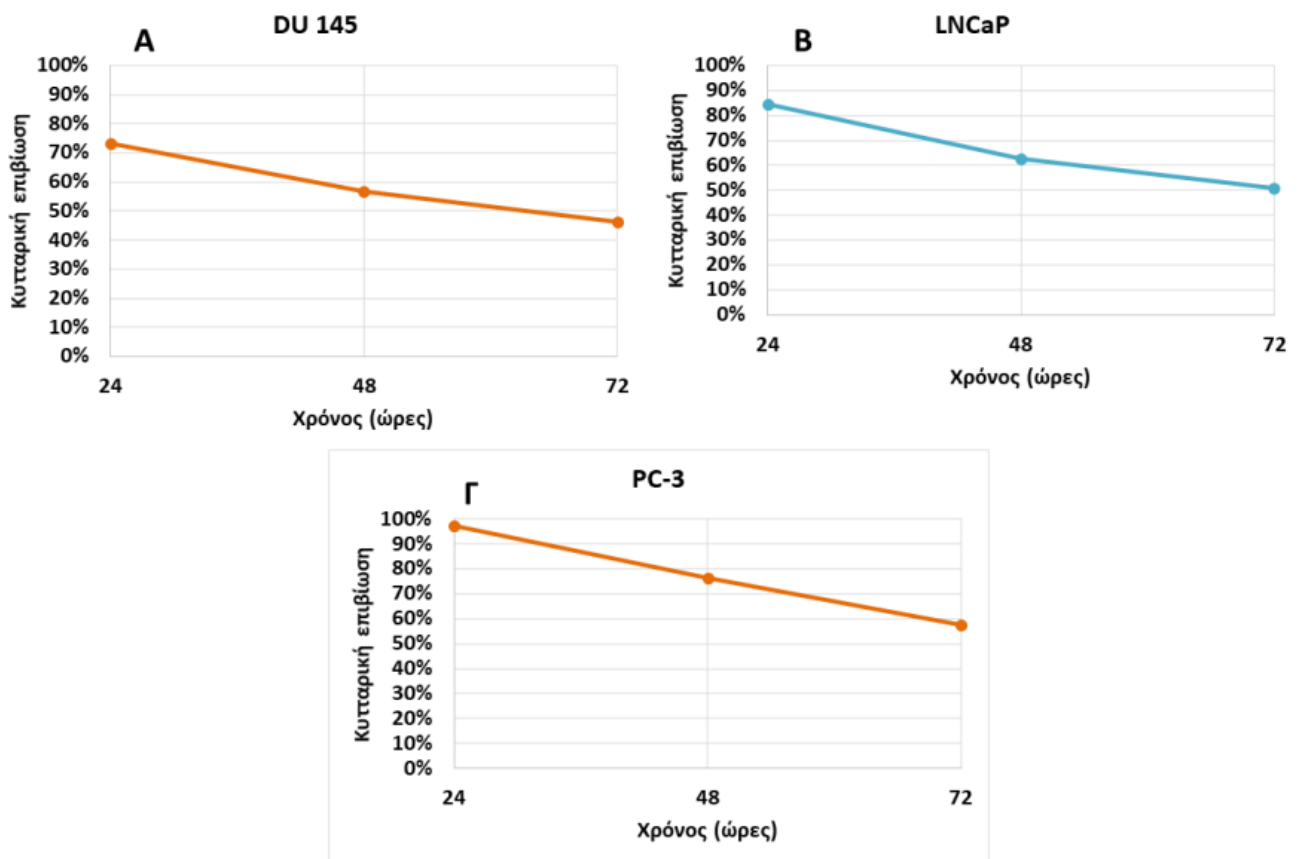


**Σχήμα 3.9:** Απεικόνιση του ποσοστού επιβίωσης ανάλογα με τη συγκέντρωση Bortezomib που χρησιμοποιήθηκε, σε μεγάλη κλίμακα στις 72 ώρες Α) DU 145, Β) LNCaP, Γ) PC-3.

Από τις συγκεντρώσεις που επιλέξαμε, μια ήταν αυτή που έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα για κάθε κυτταρική σειρά και για κάθε φάρμακο. Συνεπώς, προχωρήσαμε σε επαλήθευση αυτής με χρήση του αντιδραστηρίου Trypan Blue και στα χρονικά διαστήματα 24, 48 και 72 ώρες. Πράγματι, παρατηρήσαμε πως για της επιλεγμένες συγκεντρώσεις Carfilzomib και Bortezomib στις 72 ώρες έχουμε μείωση της κυτταρικής επιβίωσης κατά 50%. Για τη κυτταρική σειρά DU 145 επιλέχθηκε η συγκέντρωση 50nM για το Carfilzomib και 10nM για το Bortezomib, για τη κυτταρική σειρά LNCaP επιλέχθηκε η συγκέντρωση 30nM για το Carfilzomib και 5nM για το Bortezomib, ενώ τέλος για τη κυτταρική σειρά PC-3 επιλέχθηκε η συγκέντρωση 60nM για το Carfilzomib και 10nM για το Bortezomib.



**Σχήμα 3.10:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών σε σχέση με το χρόνο, υπό την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα Carfilzomib, σε μεγάλη κλίμακα. Α) DU 145 με 50nM Carfilzomib Β) LNCaP με 30nM Carfilzomib Γ) PC-3 με 60nM Carfilzomib.



**Σχήμα 3.11:** Καμπύλες ανάπτυξης κυτταρικών σειρών σε σχέση με το χρόνο, υπό την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα Bortezomib, σε μεγάλη κλίμακα. Α) DU 145 με 10nM Bortezomib Β) LNCaP με 5nM Bortezomib Γ) PC-3 με 10nM Bortezomib.

Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζονται αναλυτικά οι τελικές βέλτιστες συγκεντρώσεις επίστρωσης κυττάρων στο mL, καθώς και οι συγκεντρώσεις που προκαλούν μείωση του πολλαπλασιαστικού ρυθμού στις 72 ώρες.

**Πίνακας 5:** Τελικές συγκεντρώσεις επίστρωσης κυττάρων στο mL και συγκεντρώσεις φαρμακευτικών παραγόντων ανά κυτταρική σειρά.

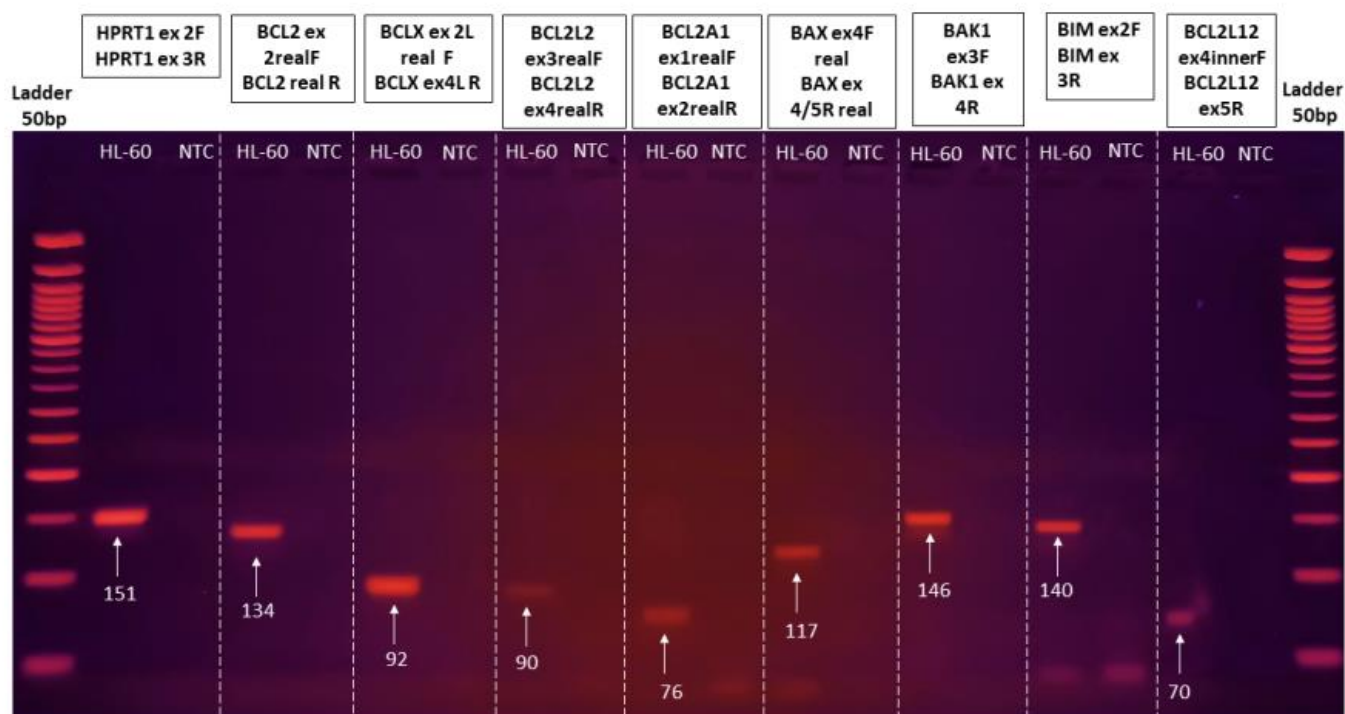
Κυτταρική σειρά	DU 145	LNCaP	PC-3
Συγκέντρωση κυττάρων (κύτταρα στο mL)	7,50 X 10 <sup>4</sup>	8,50 X 10 <sup>4</sup>	1,00 X 10 <sup>5</sup>
Συγκέντρωση Carfilzomib (nM)	50	30	60
Συγκέντρωση Bortezomib (nM)	10	5	10

Με βάση όλα τα παραπάνω, σε επόμενο στάδιο πρέπει να προσδιορίσουμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας *BCL2*, που έχουμε επιλέξει, σε καρκινικές σειρές καρκίνου του προστάτη υπό την επίδραση των φαρμακευτικών παραγόντων Carfilzomib και Bortezomib. Συνεπώς, ακολουθήσαμε τα βήματα της επίστρωσης της προσδιορισμένης συγκέντρωσης κυττάρων ανά mL και της επίδρασης με τους φαρμακευτικό παράγοντα για της κυτταρικές σειρές DU 145, PC-3 και LNCaP. Ακριβώς στις 72 ώρες επιδράσαμε με το αντιδραστήριο TRItidy G<sup>TM</sup> για τις κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν, τόσο σε αυτές που υπέστησαν επεξεργασία με τα δύο φάρμακα, όσο και σε αυτές που δεν επιδράσαμε με κανένα παράγοντα. Επιπλέον, με TRItidy G<sup>TM</sup> επιδράσαμε και στη κυτταρική σειρά HL-60. Ακολούθησε, απομόνωση των RNA και αντίστροφη μεταγραφή αυτών.

### **Ταυτοποίηση έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας *BCL2* στη κυτταρική σειρά HL-60**

Αφού πραγματοποιήσαμε τα παραπάνω βήματα έπρεπε να διαπιστωθεί η λειτουργικότητα των εκκινητών για τα γονίδια *BCL2*, *BCLXL*, *BCL2L2*, *BCL2A1*, *BAX*, *BAK1*, *BIM* και *BCL2L12*, καθώς και το αν δίνουν το επιθυμητό προϊόν. Για αυτή τη διαδικασία επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά HL-60, στην οποία τα γονίδια αυτά έχουν υψηλά

ποσοστά έκφρασης και εφαρμόστηκε συμβατική PCR αντίδραση (Σχήμα 3.12). Πράγματι, όλες οι ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση δίνουν το αναμενόμενο μήκος προϊόντος και τα ζεύγη των εκκινητών μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις κυτταρικές σειρές προστάτη, για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων, που επιλέχθηκαν προς μελέτη, υπό την επίδραση Carfilzomib και Bortezomib, σε σχέση με τις ίδιες σειρές που δεν έχουν υποστεί επίδραση.



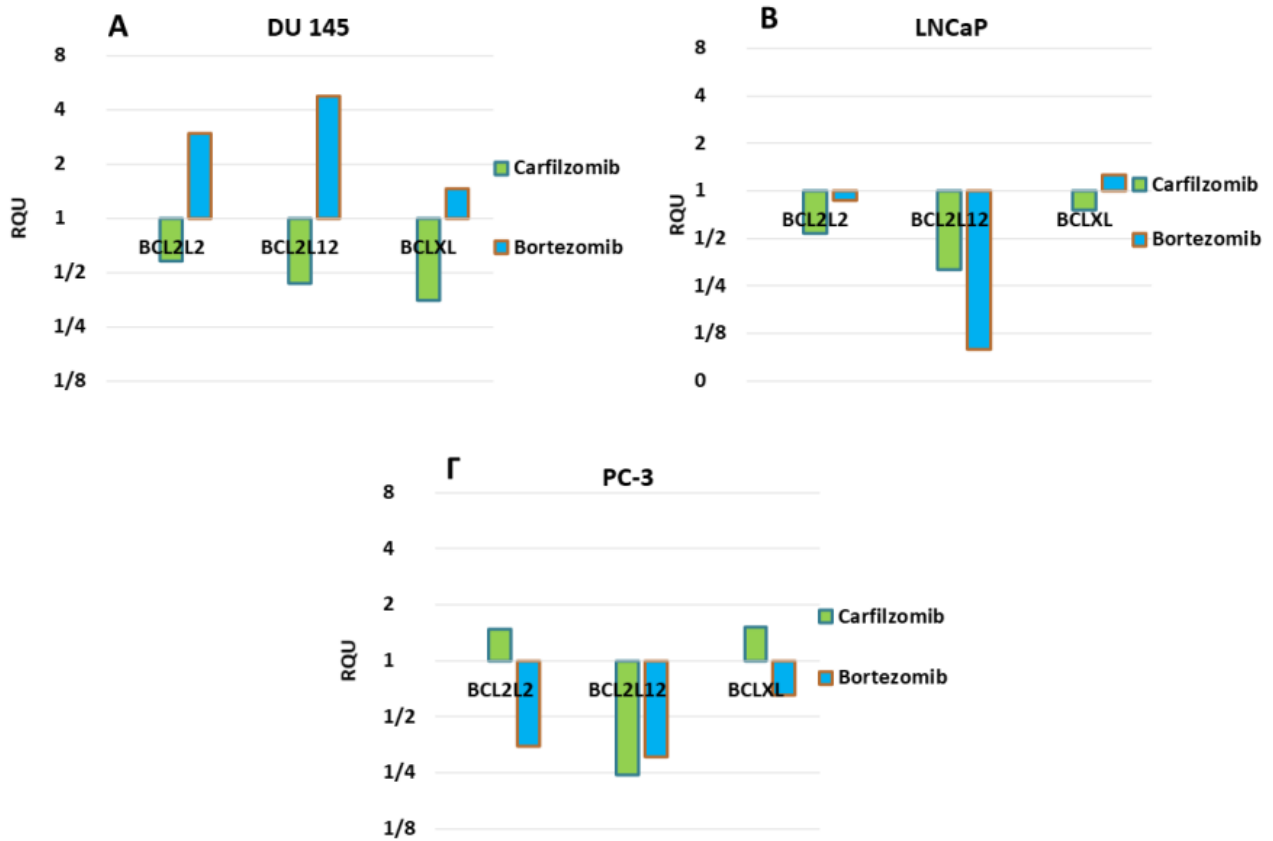
**Σχήμα 3.12:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στο επάνω μέρος περιγράφονται τα ζεύγη των εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκαν, για κάθε γονίδιο, επιπλέον αναγράφεται το αναμενόμενο μήκος κάθε προϊόντος και τα δείγματα που έχουν χρησιμοποιηθεί που είναι το PCR προϊόν από τη κυτταρική σειρά HL-60 καθώς και το αρνητικό control (NTC).

### Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας BCL2

Προχωρώντας, πρέπει να προσδιορίσουμε τα επίπεδα έκφρασης των *BCL2*, *BCLXL*, *BCL2L2*, *BCL2A1*, *BAX*, *BAK1*, *BIM* και *BCL2L12*, στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του

προστάτη που έχουμε επιδράσει με τους φαρμακευτικούς παράγοντες σε σχέση, πάντα, με τις ίδιες κυτταρικές σειρές, στις οποίες δεν έχουν προστεθεί. Εφαρμόσαμε real-time PCR για όλα τα γονίδια, ωστόσο μόνο για τα γονίδια *BCL2L2*, *BCL2L12* και *BCLXL* εξάγαμε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (Σχήμα 3.13). Κατά την ενίσχυση των υπολοίπων στόχων προέκυψαν διμερή εκκινήτων, με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα για την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων και των τριών προαναφερθέντων μορίων σε εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς DU 145 υπό την επίδραση του Carfilzomib, σε σχέση με εκχυλίσματα από τη κυτταρική σειρά DU 145 που δεν έχουμε επιδράσει με κανένα παράγοντα. Αντιθέτως, υπό την επίδραση του Bortezomib στην ίδια κυτταρική σειρά παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των *BCL2L2*, *BCL2L12* και *BCLXL*, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρουσιάζεται στο αντι-αποπτωτικό *BCL2L12*. Επιπλέον, στη κυτταρική σειρά LNCaP παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCL2L2* και *BCL2L12* υπό την επίδραση και των δύο φαρμακευτικών παραγόντων, σε σύγκριση πάντα με το εκχύλισμα από την κυτταρική σειρά LNCaP όπου δεν είχε γίνει επίδραση με παράγοντα. Τα επίπεδα έκφρασης για το γονίδιο *BCLXL* παρουσιάζονται μειωμένα κατά την επίδραση με Carfilzomib και αυξημένα όταν επιδράσαμε με Bortezomib. Τέλος, στη κυτταρική σειρά PC-3 όταν επιδράσαμε με Carfilzomib εντοπίσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BCL2L2* και *BCLXL* να αυξάνονται, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BCL2L12* να μειώνονται σε σχέση με το control. Υπό την επίδραση με Bortezomib και τα τρία γονίδια της οικογένειας BCL2 παρουσίασαν μείωση των επιπέδων έκφρασης τους.





**Σχήμα 3.13:** Ραβδογράμματα που παρουσιάζουν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας BCL2, *BCL2L2*, *BCL2L12*, *BCLXL*, υπό την επίδραση Carfilzomib και Bortezomib A) DU 145, B) LNCaP, Γ) PC-3.

#### 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους για τη καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνου, είναι η έγκαιρη διάγνωση και η χορήγηση αποτελεσματικής θεραπείας, ακολουθούμενη από παρακολούθηση. Η απόπτωση, μια μορφή κυτταρικού θανάτου εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση της κυτταρικής ομοιόστασης και η απορρύθμιση των φυσιολογικών μηχανισμών διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεση, την εξέλιξη του καρκίνου και την ανταπόκριση των όγκων στις θεραπευτικές παρεμβάσεις. Πολλά μέλη της οικογένειας γονιδίων *BCL2* που σχετίζονται με την απόπτωση, έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται σε διάφορες κακοήθειες και παίζουν κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια της απόπτωσης [97]. Ακόμα, το πρωτεάσωμα ένα ενζυμικό σύμπλεγμα πολλαπλών υπομονάδων παίζει και αυτό κεντρικό ρόλο στην απόπτωση και αποτελεί σημαντικό στόχο για αντικαρκινική θεραπεία [98].

Εμείς ασχοληθήκαμε αρχικά με τους αναστολείς του πρωτεασώματος, Bortezomib και Carfilzomib, που δρουν αναστέλλοντας την φυσιολογική λειτουργία του πρωτεασώματος και έτσι μπορούν και ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο ενώ συνεισφέρουν και στην καταστολή καρκινικών όγκων. Ο κυτταρικός θάνατος έχει αποδειχθεί πως οφείλεται σε αυξημένη απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του ενδογενούς και του εξωγενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού. Τα μικρά μόρια αναστολείς του πρωτεασώματος έχει βρεθεί πως δρουν αποτελεσματικά σε αιματολογικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλού μυελώματος και του λεμφώματος κυττάρων μανδύα βελτιώνοντας την ολική επιβίωση των ασθενών [96]. Επίσης χρησιμοποιούνται σε προχωρημένα στάδια κλινικών δοκιμών, ως αντικαρκινικά φάρμακα σε συμπαγής όγκους. Αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με έρευνες ο αναστολέας πρωτεασώματος δεύτερης γενιάς Carfilzomib παρουσιάζει υπεροχή σε σχέση με τον πρώτης γενιάς Bortezomib, τόσο στην αποτελεσματικότητα όσο και στη τοξικότητα [99]. Αυτό παρατηρήθηκε και στα δικά μας αποτελέσματα, καθώς όταν κληθήκαμε να επιλέξουμε τη συγκέντρωση φαρμακευτικού παράγοντα με την οποία θα επιδράσουμε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές και θα προκληθεί μείωση της κυτταρικής επιβίωσης κατά 50%, παρατηρήσαμε ότι το Bortezomib είναι πολύ πιο δραστικό σε σχέση με το Carfilzomib. Πιο συγκεκριμένα, στις 72 ώρες στη κυτταρική σειρά LNCaP, η οποία παρουσιάζει πολύ χαμηλή μεταστατική ικανότητα η συγκέντρωση του Carfilzomib που επιδράσαμε, ήταν έξι φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη συγκέντρωση του Bortezomib. Επιπρόσθετα, στις

κυτταρικές σειρές DU 145 και PC-3, που παρουσιάζουν μέτρια και υψηλή μεταστατική ικανότητα αντίστοιχα, η συγκέντρωση του Carfilzomib ήταν δέκα φορές πιο μεγάλη σε σχέση με αυτή του Bortezomib.

Οι αναστολείς του πρωτεασώματος επάγουν την αποπτωτική διαδικασία. Στη διαδικασία αυτή παίρνουν μέρος διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL2 που ελέγχουν το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης με ρύθμιση της διαδικασίας διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Έτσι, ήταν ενδιαφέρον να εξετάσουμε την έκφραση μορίων mRNA αποπτωτικών γονιδίων υπό την επίδραση αναστολέων του πρωτεασώματος, εφόσον είναι ένα πεδίο το οποίο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του προστάτη. Σύμφωνα με έρευνες, φαίνεται πως υπό την επίδραση του Bortezomib δεν έχουμε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης BIM, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση της από το πρωτεάσωμα. Επιπλέον, τα επίπεδα της πρωτεΐνης NOXA, που η έκφραση της ρυθμίζεται από τον παράγοντα p53, φαίνονται να αυξάνονται υπό την επίδραση με αναστολείς του πρωτεασώματος [100]. Συνεπώς, οι αναστολείς του πρωτεασώματος φαίνεται να επάγουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL2. Στη παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε κυρίως με αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL2, λόγω χαμηλής έκφρασης των υπολοίπων στις κυτταρικές σειρές που επιλέξαμε να ασχοληθούμε. Οι πρωτεΐνες BCL2 και BCLXL εμφανίζουν αντι-αποπτωτική δράση και εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αλληλεπιδρώντας με τις BAX/BAK. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει μείωση των επιπέδων έκφρασης της BCL2 έπειτα από έκθεση σε Bortezomib, όμως αυτό δε παρατηρείται με συνέπεια. Ακόμα, όσο αφορά τη πρωτεΐνη BCLXL η ρύθμιση της έκφρασης της εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα NF-kB, όπως έχει αναφερθεί υπό την επίδραση αναστολέων του πρωτεασώματος λόγω αναστολής της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης του IκB ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας δεν εκφράζεται, όμως τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της BCLXL δεν είναι ξεκάθαρο αν προέρχονται αποκλειστικά από τη δράση των αναστολέων του πρωτεασώματος [100-102]. Αυτό γίνεται αντιληπτό και από τα αποτελέσματα που εξάγαμε, καθώς παρατηρούμε στις κυτταρικές σειρές DU 145 και LNCaP αύξηση της έκφρασης της BCLXL όταν επιδράσαμε με Bortezomib, ενώ αντίθετα στη κυτταρική σειρά PC-3 παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης. Υπό την επίδραση του Carfilzomib αντίθετα, παρατηρήθηκε

μείωση της έκφρασης της BCLXL στις κυτταρικές σειρές DU 145 και LNCaP και αύξηση στη κυτταρική σειρά PC-3, συνεπώς δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τα επίπεδα έκφρασης της BCLXL υπό την επίδραση αυτών των φαρμακευτικών παραγόντων.

Προχωρώντας, ασχοληθήκαμε και με το γονίδιο της *BCL2L2*, η οποία είναι μια αντι-αποπτωτική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που υφίσταται μετατόπιση στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και η έκφραση της δεν φαίνεται να μεταβάλλεται έπειτα από έκθεση σε αναστολείς του πρωτεασώματος [103]. Αυτό δεν επιβεβαιώνεται από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, παρόλα αυτά παρατηρείται μικρή αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της *BCL2L2* σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα, υπό την επίδραση και των δύο φαρμακευτικών παραγόντων. Ωστόσο, χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση για να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.

Τέλος ασχοληθήκαμε με ένα ακόμα μέλος της οικογένειας BCL2 με αντι-αποπτωτική δράση, το γονίδιο *BCL2L12* για το οποίο δεν υπάρχει βιβλιογραφία σχετική με την επίδραση φαρμακευτικών παραγόντων, όπως το Carfilzomib και Bortezomib. Θεωρητικά θα έπρεπε να παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *BCL2L12*, όμως λόγω απουσίας κάποιου συγκεκριμένου μηχανισμού δράσης των δύο φαρμακευτικών παραγόντων δεν μπορούμε να διαμορφώσουμε άποψη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξάγαμε παρατηρούμε μείωση των επιπέδων έκφρασης για το *BCL2L12* στις τρεις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε υπό την επίδραση Carfilzomib και Bortezomib, με μοναδική εξαίρεση τη κυτταρική σειρά DU 145 υπό τη επίδραση του Bortezomib που εντοπίζεται αυξημένη έκφραση σε σχέση με το τον αντίστοιχο μάρτυρα.

Με βάση τα παραπάνω, καταλήγουμε στη θεώρηση ότι ο αναστολέας του πρωτεασώματος Carfilzomib φαίνεται να συμβαδίζει με τα αναμενόμενα αποτελέσματα από την σχετική βιβλιογραφία. Αυτό επαληθεύεται και από μια μελέτη που στηρίζει ότι ο πρώτης γενιάς αναστολέας του πρωτεασώματος, το Bortezomib είναι αποτελεσματικός στις αιματολογικές κακοήθειες, ωστόσο ο δεύτερης γενιάς αναστολέας το Carfilzomib εμφανίζει μεγαλύτερη επίδραση στους συμπαγείς όγκους λόγω διαφορετικής εκλεκτικότητας και ανασταλτικής ικανότητας ως προς τις υπομονάδες του πρωτεασώματος [104].

Όσο αφορά τα γονίδια που μελετήθηκαν, δεν φαίνεται να υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές, αλλά ούτε και με τη χρήση των δύο

μορίων αναστολέων του πρωτεασώματος. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού της απόπτωσης και προδίδει μια ετερογενή συμμετοχή των γονιδίων της BCL2 οικογένειας στο μηχανισμό αυτό [105].

Σε επόμενα βήματα, θα μπορούσαμε να απομονώσουμε δείγματα RNA από κυτταροκαλλιέργειες που έχουμε αφήσει το φαρμακευτικό παράγοντα να επιδράσει για 24 και 48 ώρες. Με τον τρόπο αυτό θα έχουμε ολοκληρωμένη εικόνα για την έκφραση των μορίων mRNA αποπτωτικών γονιδίων σε όλο το φάσμα δράσης των φαρμάκων. Επιπλέον, θα πρέπει να ταυτοποιηθεί η απόπτωση στις τρεις κυτταρικές σειρές μετά την επίδραση και με τους δύο παράγοντες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μια σειρά από διαφορετικές τεχνικές όπως η παρατήρηση του DNA laddering όσο και μέσω μέτρησης της ενεργότητας της κασπάσης-3. Επίσης, θα μπορούσαν να γίνουν επαναληπτικά πειράματα για τα γονίδια που ασχοληθήκαμε, αλλά και για όλα τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση και ανήκουν στην BCL2 οικογένεια, αλλά και μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης αυτών, υπό την επίδραση των δύο φαρμακευτικών παραγόντων. Έτσι, θα ήταν εφικτό να εξάγουμε συμπέρασμα για το μηχανισμό με τον οποίο οι αναστολείς του πρωτεασώματος επάγουν την απόπτωση, επιδρώντας στο μιτοχονδριακό μονοπάτι. Θα μπορούσε ακόμη να πραγματοποιηθεί μαζική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων στις τρεις κυτταρικές σειρές που έχουν επιλεγεί, με ή απουσία επίδρασης των δύο φαρμακευτικών παραγόντων, ακολουθούμενη από βιοπληροφορική ανάλυση, με σκοπό να αποσαφηνιστεί πλήρως το ρυθμιστικό δίκτυο στο οποίο εμπλέκονται τα γονίδια της BCL2 οικογένειας σε κάθε κυτταρική σειρά μοντέλο, πριν και έπειτα από την διαταραχή της κυτταρικής επιβίωσης λόγω της επαγωγής της απόπτωσης. Τέλος, η αποσαφήνιση του ρόλου των γονιδίων της BCL2 οικογένειας μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς ήδη υπάρχουν μόρια αναστολείς πρωτεϊνών αυτών των γονιδίων.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Franz, M.C., et al., *Zinc transporters in prostate cancer*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 735-41.
2. Wang, G., et al., *Genetics and biology of prostate cancer*. Genes Dev, 2018. **32**(17-18): p. 1105-1140.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
4. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
5. Rebillard, A., et al., *Prostate cancer and physical activity: adaptive response to oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2013. **60**: p. 115-24.
6. Schatten, H., *Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1095**: p. 1-14.
7. Parnes, H.L., I.M. Thompson, and L.G. Ford, *Prevention of hormone-related cancers: prostate cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(2): p. 368-77.
8. Punglia, R.S., et al., *Impact of age, benign prostatic hyperplasia, and cancer on prostate-specific antigen level*. Cancer, 2006. **106**(7): p. 1507-13.
9. Hsing, A.W. and A.P. Chokkalingam, *Prostate cancer epidemiology*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1388-413.
10. Pine, A.C., et al., *Advances in genetics: widening our understanding of prostate cancer*. F1000Res, 2016. **5**.
11. Nguyen, D.P., J. Li, and A.K. Tewari, *Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6)*. BJU Int, 2014. **113**(6): p. 986-92.
12. Wang, S., et al., *Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer*. Cancer Cell, 2003. **4**(3): p. 209-21.
13. Chen, H., et al., *The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer*. Front Biosci (Landmark Ed), 2016. **21**: p. 1084-91.
14. Wise, H.M., M.A. Hermida, and N.R. Leslie, *Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(3): p. 197-210.
15. Odero-Marrah, V., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1095**: p. 101-110.
16. Mansinho, A., et al., *Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets and Treatment*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1096**: p. 117-133.
17. Blute, M.L., et al., *Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy*. J Urol, 2001. **165**(1): p. 119-25.
18. Hoedemaeker, R.F., A.N. Vis, and T.H. Van Der Kwast, *Staging prostate cancer*. Microsc Res Tech, 2000. **51**(5): p. 423-9.
19. Freedland, S.J., et al., *PSA in the new millennium: a powerful predictor of prostate cancer prognosis and radical prostatectomy outcomes--results from the SEARCH database*. Eur Urol, 2008. **53**(4): p. 758-64; discussion 765-6.
20. Balk, S.P., Y.J. Ko, and G.J. Bubley, *Biology of prostate-specific antigen*. J Clin Oncol, 2003. **21**(2): p. 383-91.
21. Avgeris, M. and A. Scorilas, *Kallikrein-related peptidases (KLKs) as emerging therapeutic targets: focus on prostate cancer and skin pathologies*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(7): p. 801-18.
22. Stephan, C., et al., *PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection*. Eur J Cancer, 2007. **43**(13): p. 1918-26.
23. Esfahani, M., N. Ataei, and M. Panjehpour, *Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(7): p. 2601-11.

24. Zhang, G., et al., *Assessment on clinical value of prostate health index in the diagnosis of prostate cancer*. *Cancer Med*, 2019. **8**(11): p. 5089-5096.
25. Kretschmer, A. and D. Tilki, *Biomarkers in prostate cancer - Current clinical utility and future perspectives*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017. **120**: p. 180-193.
26. Filella, X. and L. Foj, *Novel Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Prognosis*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1095**: p. 15-39.
27. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
28. Obeng, E., *Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review*. *Braz J Biol*, 2021. **81**(4): p. 1133-1143.
29. Wang, Y. and T.D. Kanneganti, *From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021. **19**: p. 4641-4657.
30. Arandjelovic, S. and K.S. Ravichandran, *Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(9): p. 907-17.
31. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck, *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. *Anat Histol Embryol*, 2002. **31**(4): p. 214-23.
32. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(6): p. 663-9.
33. Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. *Cancer Res*, 1997. **57**(10): p. 1835-40.
34. Ghobrial, I.M., T.E. Witzig, and A.A. Adjei, *Targeting apoptosis pathways in cancer therapy*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(3): p. 178-94.
35. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **39**: p. 26-34.
36. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. *Cell*, 1995. **81**(4): p. 495-504.
37. Lavrik, I.N. and P.H. Krammer, *Life and Death Decisions in the CD95 System: Main Pro- and Anti-Apoptotic Modulators*. *Acta Naturae*, 2009. **1**(1): p. 80-3.
38. Fullsack, S., et al., *Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD in death receptor signaling*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(2): p. 122.
39. Krakstad, C. and M. Chekenya, *Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 135.
40. Hitoshi, Y., et al., *Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells*. *Immunity*, 1998. **8**(4): p. 461-71.
41. Scaffidi, C., et al., *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(3): p. 1541-8.
42. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
43. Parsons, M.J. and D.R. Green, *Mitochondria in cell death*. *Essays Biochem*, 2010. **47**: p. 99-114.
44. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-56.
45. Li, Z. and M. Sheng, *Caspases in synaptic plasticity*. *Mol Brain*, 2012. **5**: p. 15.
46. Kuranaga, E., *Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo*. *Genes Cells*, 2012. **17**(2): p. 83-97.
47. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. *Mol Cell*, 2002. **9**(3): p. 459-70.
48. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008. **151**(1): p. 10-27.

49. Kesavardhana, S., R.K.S. Malireddi, and T.D. Kanneganti, *Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis*. *Annu Rev Immunol*, 2020. **38**: p. 567-595.
50. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(4).
51. Larsen, B.D. and C.S. Sorensen, *The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond*. *FEBS J*, 2017. **284**(8): p. 1160-1170.
52. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. *Genes Dev*, 1999. **13**(24): p. 3179-84.
53. Carrington, P.E., et al., *The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8*. *Mol Cell*, 2006. **22**(5): p. 599-610.
54. Degtarev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
55. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. *Nature*, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
56. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. *Science*, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
57. Lamkanfi, M. and T.D. Kanneganti, *Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(1): p. 21-4.
58. Tsujimoto, Y., et al., *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma*. *Science*, 1985. **228**(4706): p. 1440-3.
59. Pepper, C. and P. Bentley, *The role of the Bcl-2 family in the modulation of apoptosis*. *Symp Soc Exp Biol*, 2000. **52**: p. 43-53.
60. Tsujimoto, Y., *Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria*. *J Cell Physiol*, 2003. **195**(2): p. 158-67.
61. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1322-6.
62. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 99-163.
63. Krajewski, S., et al., *Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes*. *Cancer Res*, 1993. **53**(19): p. 4701-14.
64. Hartman, M.L. and M. Czyz, *BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(4): p. 260.
65. Chipuk, J.E., et al., *The BCL-2 family reunion*. *Mol Cell*, 2010. **37**(3): p. 299-310.
66. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(1): p. 49-63.
67. Goping, I.S., et al., *Regulated targeting of BAX to mitochondria*. *J Cell Biol*, 1998. **143**(1): p. 207-15.
68. Kilbride, S.M. and J.H. Prehn, *Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function*. *Oncogene*, 2013. **32**(22): p. 2703-11.
69. Kuwana, T., et al., *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane*. *Cell*, 2002. **111**(3): p. 331-42.
70. Zhang, P., et al., *PROTACs are effective in addressing the platelet toxicity associated with BCL-XL inhibitors*. *Explor Target Antitumor Ther*, 2020. **1**: p. 259-272.
71. Song, C., et al., *Structural Fluctuations of the Human Proteasome alpha7 Homo-Tetradecamer Double Ring Imply the Proteasomal alpha-Ring Assembly Mechanism*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(9).
72. Rousseau, A. and A. Bertolotti, *Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(11): p. 697-712.
73. Bard, J.A.M., et al., *Structure and Function of the 26S Proteasome*. *Annu Rev Biochem*, 2018. **87**: p. 697-724.



74. Maupin-Furlow, J.A., *Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea*. Trends Microbiol, 2013. **21**(1): p. 31-8.
75. Gerards, W.L., et al., *Structure and assembly of the 20S proteasome*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(3): p. 253-62.
76. Heinemeyer, W., P.C. Ramos, and R.J. Dohmen, *The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(13): p. 1562-78.
77. Jung, T. and T. Grune, *Structure of the proteasome*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **109**: p. 1-39.
78. Unno, M., et al., *The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution*. Structure, 2002. **10**(5): p. 609-18.
79. Tanaka, K., *The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles*. Keio J Med, 2013. **62**(1): p. 1-12.
80. Budenholzer, L., et al., *Proteasome Structure and Assembly*. J Mol Biol, 2017. **429**(22): p. 3500-3524.
81. Liu, H.M., et al., *Denervation-Induced Activation of the Standard Proteasome and Immunoproteasome*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166831.
82. Murata, S., H. Yashiroda, and K. Tanaka, *Molecular mechanisms of proteasome assembly*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 104-15.
83. Collins, G.A. and A.L. Goldberg, *The Logic of the 26S Proteasome*. Cell, 2017. **169**(5): p. 792-806.
84. Saeki, Y. and K. Tanaka, *Assembly and function of the proteasome*. Methods Mol Biol, 2012. **832**: p. 315-37.
85. Chen, F.Z. and X.K. Zhao, *Ubiquitin-proteasome pathway and prostate cancer*. Onkologie, 2013. **36**(10): p. 592-6.
86. Ding, F., et al., *The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 886-95.
87. Fricker, L.D., *Proteasome Inhibitor Drugs*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2020. **60**: p. 457-476.
88. Kubiczikova, L., et al., *Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(6): p. 947-61.
89. Thibaudeau, T.A. and D.M. Smith, *A Practical Review of Proteasome Pharmacology*. Pharmacol Rev, 2019. **71**(2): p. 170-197.
90. Manasanch, E.E. and R.Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(7): p. 417-433.
91. Papandreou, C.N. and C.J. Logothetis, *Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5036-43.
92. Vora, P.A., R. Patel, and A. Dharamsi, *Bortezomib - First Therapeutic Proteasome Inhibitor for Cancer Therapy: A Review of Patent Literature*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2020. **15**(2): p. 113-131.
93. Russo, A., et al., *Targeting apoptosis in solid tumors: the role of bortezomib from preclinical to clinical evidence*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(12): p. 1571-86.
94. Crawford, L.J., B. Walker, and A.E. Irvine, *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. J Cell Commun Signal, 2011. **5**(2): p. 101-10.
95. Kortuem, K.M. and A.K. Stewart, *Carfilzomib*. Blood, 2013. **121**(6): p. 893-7.
96. Nunes, A.T. and C.M. Annunziata, *Proteasome inhibitors: structure and function*. Semin Oncol, 2017. **44**(6): p. 377-380.
97. Thomadaki, H. and A. Scorilas, *BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006. **43**(1): p. 1-67.
98. Adams, J., *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treat Rev, 2003. **29 Suppl 1**: p. 3-9.

99. Groen, K., et al., *Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma*. *Cancer Manag Res*, 2019. **11**: p. 2663-2675.
100. Fennell, D.A., A. Chacko, and L. Mutti, *BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib*. *Oncogene*, 2008. **27**(9): p. 1189-97.
101. Okamoto, K., et al., *Reversal of Mutant KRAS-Mediated Apoptosis Resistance by Concurrent Noxa/Bik Induction and Bcl-2/Bcl-xL Antagonism in Colon Cancer Cells*. *Mol Cancer Res*, 2015. **13**(4): p. 659-69.
102. Yang, T.M., et al., *Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **41**(1): p. 14-23.
103. Anstee, N.S., et al., *Impact of elevated anti-apoptotic MCL-1 and BCL-2 on the development and treatment of MLL-AF9 AML in mice*. *Cell Death Differ*, 2019. **26**(7): p. 1316-1331.
104. Roeten, M.S.F., J. Cloos, and G. Jansen, *Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018. **81**(2): p. 227-243.
105. Radha, G. and S.C. Raghavan, *BCL2: A promising cancer therapeutic target*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017. **1868**(1): p. 309-314.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ mRNA ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ, ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ  
ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΚΠΑ

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος και η πέμπτη κύρια αιτία θανάτου στους άνδρες για το έτος 2020, ενώ παρουσιάζει αξιοσημείωτη ετερογένεια στο επίπεδο εξέλιξης της νόσου. Το γεγονός αυτό μας ώθησε στο να αποτελέσει αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Η απόπτωση είναι ένα είδος κυτταρικού θανάτου το οποίο έχει μελετηθεί εις βάθος τα τελευταία χρόνια. Καλείται και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και πληθώρα μορίων εμπλέκονται τόσο στη διαδικασία αυτή καθαυτή όσο και στην ρύθμιση της. Στη διαδικασία αυτή τα μέλη της BCL2 οικογένειας φαίνεται να διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο. Τα μέλη της οικογένειας αυτής εμφανίζουν δομική ομολογία μεταξύ τους και χωρίζονται με βάση τη λειτουργικότητα τους σε δύο κατηγορίες: προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές.

Το πρωτεάσωμα είναι ένα ετερογενές σύμπλοκο, το οποίο εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στο πυρήνα και στοχεύει σε πρωτεΐνες που είναι κατεστραμμένες, εσφαλμένα αναδιπλωμένες ή οξειδωμένες. Επιπλέον, διαδραματίζει κύριο ρόλο στη διάσπαση ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, στη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων καθώς και στην απόπτωση. Έτσι, γεννήθηκε η ιδέα της στόχευσης του πρωτεασώματος ως πιθανό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας.

Οι αναστολείς του πρωτεασώματος είναι μικρά μόρια, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την λειτουργία του πρωτεασώματος και έτσι συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και στην καταστολή καρκινικών όγκων. Ο κυτταρικός θάνατος έχει αποδειχθεί πως οφείλεται σε αυξημένη απόπτωση. Στη παρούσα Διπλωματική εργασία

εστιάσαμε στον αναστολέα πρωτεασώματος πρώτης γενιάς, Bortezomib και στον αναστολέα δεύτερης γενιάς Carfilzomib, οι οποίοι εγκρίθηκαν από τον FDA για τη θεραπεία στο πολλαπλό μυέλωμα και στο λέμφωμα κυττάρων μανδύα, βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές για θεραπεία συμπαγών όγκων, ενώ τέλος φαίνεται να επιδρούν σημαντικά σε πολυάριθμες οδούς κυτταρικής ρύθμισης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης μορίων mRNA αντι-αποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας BCL2, υπό την επίδραση των δύο αναστολέων του πρωτεασώματος, σε καρκινικά κύτταρα προστάτη.

Βασιζόμενη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία και στην ακόλουθη πειραματική πορεία, η οποία περιλάμβανε, τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας και τεχνικές αντίστροφης μεταγραφής, απλής PCR αλλά και Real-time PCR, καταλήξαμε στην παρατήρηση αλλαγής των επιπέδων έκφρασης των αποπτωτικών γονιδίων, ανάλογα με τον αναστολέα που επιδράσαμε στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη. Στη κυτταρική σειρά DU 145 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BCLXL*, *BCL2L12* και *BCL2L2* υπό την επίδραση του Bortezomib και μείωση των επιπέδων των αντίστοιχων γονιδίων υπό την επίδραση Carfilzomib. Επιλέον, στη κυτταρική σειρά LNCaP ανάμεσα στα τρία αυτά αποπτωτικά γονίδια παρατηρήθηκε αύξηση μόνο στα επίπεδα του γονιδίου *BCLXL* υπό την επίδραση του Bortezomib, ενώ υπό την επίδραση του Carfilzomib τα επίπεδα των τριών αποπτωτικών γονιδίων εμφανίστηκαν μειωμένα. Στη κυτταρική σειρά PC-3 και τα τρία αντι-αποπτωτικά γονίδια παρουσιάζουν μείωση στα επίπεδα της έκφρασης τους όταν επιδράσαμε με Bortezomib, ενώ κατά την επίδραση με Carfilzomib παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των *BCL2L2*, *BCLXL* και μείωση στα επίπεδα του γονιδίου *BCL2L12*. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό όσο αφορά τα γονίδια που μελετήθηκαν, ότι δεν φαίνεται να υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές, αλλά ούτε και με τη χρήση των δύο μορίων αναστολέων του πρωτεασώματος. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού της απόπτωσης και προδίδει μια ετερογενή συμμετοχή των γονιδίων της BCL2 οικογένειας στο μηχανισμό αυτό.

**STUDY OF THE mRNA EXPRESSION OF APOPTOSIS-RELATED GENES  
IN HUMAN PROSTATE CANCER CELLS, TREATED WITH PROTEASOME  
INHIBITORS**

CHRISTINA SOTIROPOULOU

MASTER'S THESIS

DEPARTMENT OF BIOLOGY, N.K.U.A.

**ABSTRACT**

Prostate cancer is the second most common cancer and the fifth leading cause of death in men for the year 2020. Apoptosis is a type of cell death that is also called programmed cell death. A variety of molecules are involved with members of the BCL2 family playing a prominent role. The members of this family show structural similarity to each other and are divided into two categories based on their functionality: pre-apoptotic and anti-apoptotic.

The 26S proteasome is the major protease in eukaryotic cells, responsible for protein degradation in both the cytosol and the nucleus and plays fundamentally indispensable roles in regulating almost all major aspects of cellular activities. Moreover, the proteasome proteolytically degrades a plethora of cell proteins implicated in the regulation of basic cellular processes, such as proliferation, differentiation, cell cycle, and apoptosis.

Proteasome inhibitors are small molecules that have the potential to inhibit the proteolytic activity of the proteasome and may act as cell cycle regulators or tumor suppressors. Bortezomib and Carfilzomib are two proteasome inhibitors that have been approved for the treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma, and their effectiveness is being studied for other diseases. Herein, we conduct a study about the change in the expression levels of anti-apoptotic mRNA BCL2 family molecules after treatment with Bortezomib and Carfilzomib in prostate cancer cells.

According to the existing literature and the experimental studies, which included cell culture techniques, reverse transcription, PCR and Real-time PCR techniques, in the present

study we have demonstrated an alteration in the expression levels of anti-apoptotic genes, depending on the proteasome inhibitor which is used and the prostate cell lines which is treated. Overall, in DU 145 and LNCaP cell lines after treatment with Carfilzomib and compared with control, we have demonstrated a significant decrease in the expression levels of *BCLXL*, *BCL2L2* and *BCL2L12* genes. In contrast, in the PC-3 cell line after treatment with Carfilzomib we observed an increase in the expression levels of *BCLXL*, *BCL2L2* and a decrease in the expression levels of the *BCL2L12* gene. In addition, in the cell lines PC-3 and LNCaP after treatment with Bortezomib and compared with control, we have demonstrated a decrease in the expression levels of these antiapoptotic genes, except for *BCLXL* in LNCaP cell line, which had elevated expression levels. Furthermore, we have shown a significant increase in the expression levels of *BCLXL*, *BCL2L2* and *BCL2L12* genes in the cell line DU 145 after the effect of Bortezomib. In conclusion, apropos of the genes studied there is not a specific pattern in the expression level of these genes neither between the different cell lines nor between the two proteasome inhibitors which are studied. The aforementioned information indicates the complexity of the apoptotic mechanism and demonstrates a heterogeneous involvement of the BCL2 family genes in this mechanism.