



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2016

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ  
ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΜΑΥΡΟΕΙΔΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2016**

|



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2016

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΓΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ  
ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΜΑΥΡΟΕΙΔΗΣ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2016**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**Ημερομηνία αίτησης του κ. Μαυροειδή Λεωνίδα: 25-11-2009**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 672<sup>α</sup>/1-12-2009**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Παππάς Περικλής, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μπριασούλης Ευάγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 3-2-2010**

*«Μελέτη συγχρόνησης μετρονομικής βινορελμπίνης και αντιαγγειογενετικών φαρμάκων μοριακής στόχευσης σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου πλακούντα. Διερεύνηση συνέργειας σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 786<sup>ο</sup>/29-3-2016**

<b>Καλόφωνος Χαράλαμπος</b>	Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών
<b>Κωνσταντή Μαρία</b>	Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μαρσέλος Μάριος-Αθανάσιος</b>	Ομότιμος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπριασούλης Ευάγγελος</b>	Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Βασιλόπουλος Γεώργιος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
<b>Παππάς Περικλής</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Χατζημιχαήλ Ελευθερία,</b>	MD/Phd Visiting Scientist, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-6-2016

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας Περικλή Παππά. Παράλληλα, ένα σκέλος της διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υποξίας και Αγγειογένεσης στο Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford υπό την καθοδήγηση του Professor of Oncology Adrian Harris.

Το παρόν πόνημα αποτελεί το επιστέγασμα μίας ενθουσιώδους αλλά και επίπονης ερευνητικής πορείας που δε θα είχε τελεσφορήσει χωρίς τη συνδρομή ορισμένων ανθρώπων.

Ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς τον αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας **Περικλή Παππά**, επιβλέποντα καθηγητή της Διατριβής μου για την ανάθεση του θέματος της Διατριβής, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση του, την υποστήριξη του σε όλες τις φάσεις αυτού του εγχειρήματος αλλά και για το γεγονός ότι με μύησε στην εργαστηριακή έρευνα.

Ευχαριστώ θερμά τον ομότιμο καθηγητή Φαρμακολογίας **Μάριο-Αθανάσιο Μαρσέλο**, μέλος της τριμελούς επιτροπής τη Διατριβής μου και διευθυντή του εργαστηρίου Φαρμακολογίας που μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος του εργαστηρίου και έθεσε στη διάθεση μου την πολύτιμη υλικοτεχνική υποδομή του εργαστηρίου παρέχοντάς μου συνεχή υποστήριξη.

Εκφράζω άπειρη ευγνωμοσύνη στον καθηγητή Ογκολογίας, **Ευάγγελο Μπριασούλη**, μέλος της τριμελούς επιτροπής της διατριβής μου, ιθύνοντα νου της μετρονομικής χημειοθεραπείας με βινορελμπίνη ο οποίος με μύησε στο γνωστικό αντικείμενο της μετρονομικής χημειοθεραπείας και στις αρχές της μεταφραστικής έρευνας. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις πολύτιμες κατευθύνσεις και συμβουλές του και την έμπρακτη και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της Διατριβής μου.

Ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς τον Professor of Oncology at University of Oxford **Adrian Harris** που μου έδωσε τη δυνατότητα να γίνω μέλος του εργαστηρίου του για δύο χρόνια, έθεσε στη διάθεση μου την πλούσια υλικοτεχνική υποδομή του εργαστηρίου του, με μύησε στο γνωστικό αντικείμενο της υποξίας και της αγγειογένεσης και με την καθοδήγησή του συνέβαλε στην εξαγωγή κρίσιμων αποτελεσμάτων για τη Διατριβή μου.

Ευχαριστώ θερμά τη senior scientist του Weatherall Institute of Molecular Medicine **Helen Sheldon** για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές της, την τεχνογνωσία που μου προσέφερε καθώς και για τη φιλία της.

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη σημαντική τους συνδρομή:

Την καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. **Μαρία Κωνσταντή** για την άριστη συνεργασία, τις χρήσιμες συμβουλές της και την πολύτιμη βοήθεια της.

Την αναπληρώτρια καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. **Κατερίνα Αντωνίου** για την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές της και τη βοήθεια της σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε.

Τη συνάδελφο μου ιατρό και διδάκτορα της ιατρικής κ. **Ειρήνη Μπιζιώτα** για τις κατευθύνσεις που μου έδωσε, για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην εκμάθηση βασικών εργαστηριακών τεχνικών κατά το ξεκίνημα της διατριβής μου καθώς και για τη φιλία της.

Τη διδάκτορα της ιατρικής κ. **Αικατερίνη Τουλούπη** για την άψογη συνεργασία, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και τη φιλία της.

Το διδάκτορα της ιατρικής κ. **Ευάγγελο Δασκαλόπουλο** και την υποψήφια διδάκτορα της ιατρικής κ. **Φωτεινή Μάλιου** για την άριστη συνεργασία, τη βοήθεια τους σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε και τη φιλία τους.

Τις κυρίες Ακυλίνα Μπαλωμένου, Όλγα Τσουμάνη και Μαριάνθη Σωτηροπούλου για την αρωγή τους σε θέματα που άπτονταν των αρμοδιοτήτων τους και για το φιλικό κλίμα που δημιουργούσαν.

Τα μέλη του εργαστηρίου του Adrian Harris, **Ji-Liang Li** (senior scientist), **Simon Wigfield** (senior scientist), **Esther Bridges** (senior scientist), **Karim Bensaad** (senior scientist), **Dylan Jones** (senior scientist), **Massimo Masiero** (postdoc), **Alan McIntyre** (postdoc), **Dean Singleton** (postdoc), **Simon Lord** (Clinical Fellow), **Christos Zois** (postdoc), **Elena Favaro** (DPhil student), **Ioanna Ledaki** (DPhil student), **Ulrike Harjes** (DPhil student), **Jon Williams** (DPhil student), **David Favara** (DPhil student), **Sofia Santos** (DPhil student), **Peter Thomas** (Lab Technician) για τη πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές τους και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους. Ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου Νεονέλη Μαυροειδή και Γαρυφαλλιά Μαυροειδή για την ενθάρρυνση τους, την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και την αμέριστη στήριξη τους σε όλες τις φάσεις αυτού του επίπονου εγχειρήματος. Τέλος ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς την αδερφή μου ιατρό και διδάκτορα της ιατρικής Βασιλική Μαυροειδή για την υποστήριξη και την αγάπη της, τις πολύτιμες συμβουλές της και τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της Διατριβής μου.

“By seeking and blundering we learn”

Johann Wolfgang Von Goethe



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<b>1.1 ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Ορισμός της μετρονομικής χημειοθεραπείας.....	3
1.1.2 Ο ρόλος της μετρονομικής χημειοθεραπείας στη θεραπευτική του καρκίνου...	4
1.1.3 Τα επιστημονικά ερείσματα του πρωτοκόλλου της μετρονομικής χημειοθεραπείας.....	5
1.1.4 Βέλτιστη μετρονομική δόση και φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες.....	6
1.1.5 Αντί-αγγειογενετικοί συνδυασμοί.....	8
1.1.6 Η πλειοτροπική δράση της μετρονομικής χημειοθεραπείας.....	9
1.1.7 Οι παράγοντες αντί-μικροσωληνίσκων στη μετρονομική χημειοθεραπεία.....	10
1.1.8 Μετρονομική χημειοθεραπεία με βινορελμπίνη.....	14
<b>1.2 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Ο ρόλος της αγγειογένεσης στον καρκίνο.....	16
1.2.2 Υποξία: το εναρκτήριο λάκτισμα της αγγειογένεσης.....	16
1.2.3 Αγγειογένεση με εκβλάστηση (sprouting angiogenesis).....	20
1.2.4 Μοριακή σηματοδότηση της αγγειογένεσης με εκβλάστηση.....	20
1.2.4.1 VEGF σηματοδότηση.....	20
1.2.4.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch.....	24
1.2.4.3 Θεωρία της αγγειογένεσης με εκβλάστηση: Οδηγό ενδοθηλιακό κύτταρο (tip cell), ενδοθηλιακό κύτταρο μίσχου (stalk cell) και ενδοθηλιακό κύτταρο φάλαγγας (phalanx cell).....	27
1.2.5 Θεραπευτικοί χειρισμοί έναντι της αγγειογένεσης.....	29
1.2.5.1 Αναστολείς εκκρινόμενων προ-αγγειογενετικών παραγόντων.....	29
1.2.5.2 Αναστολείς τυροσινικών κινασών.....	29
1.2.5.3 Αναστολείς κατώτερων τελεστών της σηματοδότησης.....	30
1.2.6 Αντίσταση στις αγγειογενετικές θεραπείες.....	31
1.2.6.1 Υπερδραστηριότητα εναλλακτικών μονοπατιών αγγειογένεσης.....	31
1.2.6.2 Εναλλακτικοί μηχανισμοί αγγειογένεσης.....	32
1.2.6.2.α. Αγγειογένεση με εγκολεασμό (intussusceptive angiogenesis).....	32
1.2.6.2.β. Ενδοθηλιακή προσομοίωση καρκινικών κυττάρων (vasculogenic mimicry).....	32
1.2.6.2.γ. Υποκλοπή της κυκλοφορίας των αγγείων του φυσιολογικού ιστού (vessel co-option).....	32

1.2.6.2.δ. De novo αγγειογένεση (vasculogenesis).....	33
1.2.6.3 Αύξηση του μεταστατικού δυναμικού και της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων.....	33
1.2.6.4 Ο ρόλος των κυττάρων του στρώματος.....	34
1.2.6.5 Ο ρόλος των Bone Marrow Derived Cells (BMDCs).....	34
1.2.6.6 Η επίδραση των μικροκυστιδίων exosomes στην αγγειογένεση.....	34
1.2.6.7 Η επαγόμενη από την αντί-αγγειογενετική θεραπεία υποξία.....	36
<b>1.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....</b>	<b>37</b>
1.3.1 Εξωγενές και ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι.....	37
1.3.2 Ο ρόλος των δραστικών μορφών οξυγόνου στην απόπτωση.....	43
1.3.3 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της MAPK/ERK.....	45
1.3.4 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt/PKB.....	48
1.3.5 Υποξία και απόπτωση.....	51
<b>1.4 ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>53</b>
 <b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
<b>2.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....</b>	<b>56</b>
2.1.1 Καλλιέργεια Ενδοθηλιακών Κυττάρων Προερχόμενων από Ομφαλική Φλέβα (HUVEC), διαλύματα και φάρμακα.....	56
2.1.2 Απομόνωση HUVEC.....	57
2.1.3 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού (cell proliferation assay).....	58
2.1.4 Δοκιμασία Μετανάστευσης (cell migration assay).....	58
2.1.5 Δοκιμασία σχηματισμού ενδοθηλιακών σωλήνων (tube formation).....	59
2.1.6 Δοκιμασία εκκρεμούς σταγόνας (Hanging drop assay).....	60
2.1.7 Διαμόλυνση (transfection) κυττάρων με siRNA ολιγονουκλεοτίδια.....	61
<b>2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ mRNA.....</b>	<b>63</b>
2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	63
2.2.2 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) και σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	64
2.2.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).....	64
<b>2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....</b>	<b>66</b>
2.3.1 Απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών.....	66
2.3.2 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	67
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Running).....	68
2.3.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	69

2.3.5 Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης (blocking) και επώαση με αντισώματα.....	70
2.3.6 Ανίχνευση πρωτεϊνών.....	72
2.3.7 Ποσοτικοποίηση.....	73
<b>2.4 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (flow cytometry).....</b>	<b>74</b>
2.4.1 Ανάλυση της απόπτωσης.....	74
2.4.2 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου.....	75
2.4.3 Ανάλυση των επιπέδων ανιόντος του σουπεροξειδίου στο μιτοχόνδριο.....	75
<b>2.5 ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (indirect immunofluorescence).....</b>	<b>77</b>
<b>2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>78</b>

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

<b>3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ <i>in vitro</i>.....</b>	<b>81</b>
3.1.1 Η επίδραση της βινορελμπίνης στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC.....	81
3.1.2 Η επίδραση της βινορελμπίνης στη μετανάστευση (migration) των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC.....	83
3.1.3 Η επίδραση της βινορελμπίνης στη δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων (tube formation).....	85
3.1.4 Απουσία τοξικότητας της μετρονομικής βινορελμπίνης στη σύντομη έκθεση των 6 hrs.....	87
3.1.5 Η επίδραση της βινορελμπίνης στη δημιουργία ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων (sprouting).....	88
<b>3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ (VRL) ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....</b>	<b>91</b>
3.2.1 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στη μεταγραφή των γονιδίων Hey1 και Hes1.....	92
3.2.2 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στην πρωτεϊνική έκφραση του Notch1 και Notch Intracellular Domain (NICD).....	93
3.2.3 Η επίδραση του αναστολέα της γάμμα-σεκρετάσης DBZ στην έκφραση του mRNA του Hey1 υπό την επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης.....	94
3.2.4 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης σε μονοπάτια που διασταυρώνονται με το μονοπάτι του Notch.....	95

3.2.5 Η επίδραση των αναστολέων της σηματοδότησης του NFκB και της JNK στο mRNA του HEY1 υπό την επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης της βινορελμπίνης.....	96
3.2.6 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στην έκφραση του mRNA του VEGFR2.....	98
3.2.7 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στην πρωτεϊνική έκφραση και φωσφορυλίωση του VEGFR2.....	99
<b>3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ.....</b>	<b>101</b>
3.3.1 Η επίδραση της υποξίας στην αντί-μεταναστευτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης.....	101
3.3.2 Η επίδραση της υποξίας στο σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων.....	102
3.3.3 Η επίδραση της υποξίας στο σχηματισμό ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων.....	104
3.3.4 Η επίδραση της υποξίας στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης.....	105
<b>3.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ.....</b>	<b>107</b>
3.4.1 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στον κυτταρικό κύκλο των HUVEC.....	107
3.4.2 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στην απόπτωση των HUVEC.....	109
3.4.3 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στις πρωτεΐνες Bcl-2, Bax και το λόγο Bcl-2/Bax.....	111
3.4.4 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στο μιτοχονδριακό σουπεροξειδίο.....	113
<b>3.5 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ.....</b>	<b>115</b>
3.5.1 Ο ρόλος του sunitinib.....	115
3.5.2 Ο ρόλος του αναστολέα της γ-σεκρατάσης DBZ.....	116
3.5.3 Ο ρόλος της καταστολής της έκφρασης του HIF1a.....	117
3.5.4 Ο ρόλος της αναστολής της ERK κινάσης.....	118
3.5.5 Ο ρόλος της αναστολής της AKT κινάσης.....	120
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>124</b>

<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>137</b>
<b>6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>139</b>
<b>7. ABSTRACT.....</b>	<b>142</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>144</b>

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

**MTD:** maximum tolerated dose, μέγιστη ανεκτή δόση

**VEGF:** vascular endothelial growth factor

**HUVEC:** human umbilical vein endothelial cells

**VEGFR2:** vascular endothelial growth factor receptor 2

**CEPs:** circulating endothelial progenitors

**CECs:** circulating endothelial cells

**MTAs:** microtubule targeting agents

**VDAC:** voltage-dependent anion channel

**MPT:** mitochondrial pore transition

**$\Delta\Psi_m$ :** mitochondrial membrane potential

**BCL-2:** B-cell lymphoma 2

**Bax:** BCL-2-associated X protein

**MCL-1:** myeloid cell leukemia 1

**JNK:** c-Jun N-terminal kinase

**MTOC:** microtubule organizing center

**bFGF:** Basic fibroblast growth factor

**SDF-1:** stromal cell-derived factor-1

**HIF1 $\alpha$ :** hypoxia inducible factor 1 $^{\alpha}$

**TSP1:** thrombospondin-1

**IL-8:** Interleukin 8

**FIH-1:** factor inhibiting HIF-1

**DLL4:** Delta like ligand 4

**NICD:** Notch Intracellular Domain

**Hes1:** hairy and enhancer of split 1

**Hey1:** Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1

**ERK:** Extracellular signal-Regulated Kinases

**Akt:** Protein kinase B

**VRL:** Vinorelbine

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

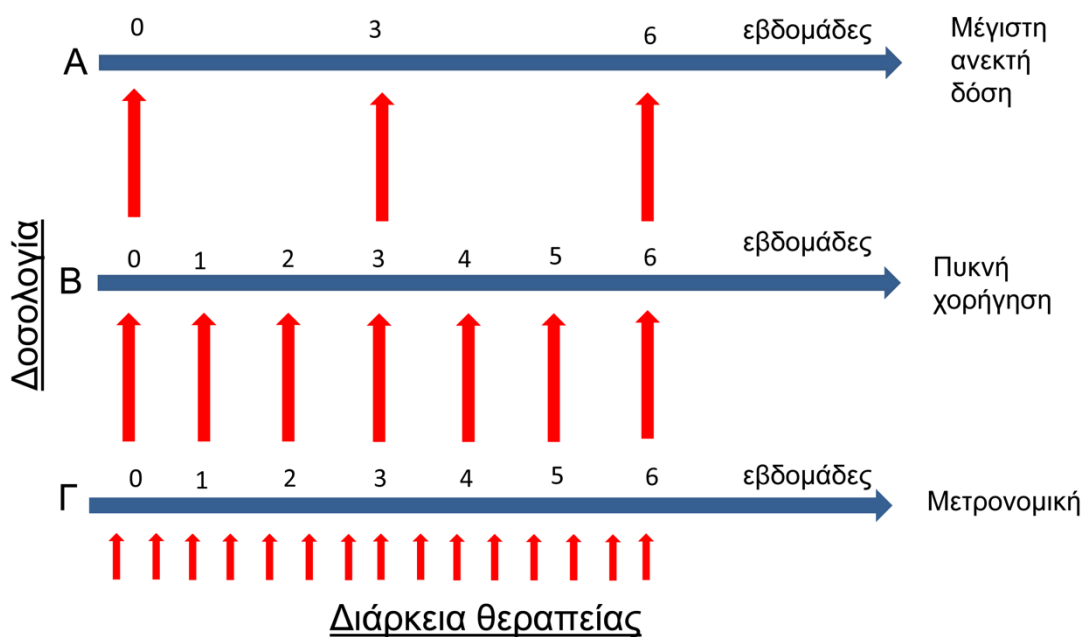




# 1.1 ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

## 1.1.1 Ορισμός της μετρονομικής χημειοθεραπείας

Μετρονομική χημειοθεραπεία ορίζεται η συχνή και ανά τακτά χρονικά διαστήματα χορήγηση χαμηλών υποτοξικών δόσεων κυτταροτοξικών φαρμάκων για παρατεταμένο χρονικό διάστημα με κύριο σκοπό την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων των όγκων και ως εκ τούτου την καταστολή της νεοαγγείωσης του καρκίνου (1). Η μετρονομική χημειοθεραπεία βρίσκεται στον αντίποδα του συμβατικού μοντέλου χημειοθεραπείας της μέγιστης ανεκτής δόσης (MTD: maximum tolerated dose). Το μοντέλο της MTD αποσκοπεί στη μεγιστοποίηση του αποπρωτικού αποτελέσματος επί των καρκινικών κυττάρων με τη χορήγηση υψηλών δόσεων κυτταροτοξικών φαρμάκων. Ωστόσο απαιτεί την παρουσία διαλειμμάτων μεταξύ των κύκλων της χορηγούμενης χημειοθεραπείας (συνήθως τρεις εβδομάδες) προκειμένου ο οργανισμός να αναρρώσει από τις τοξικές επιδράσεις των φαρμάκων (1). Από την άλλη πλευρά, δεν πρέπει να υπάρχει σύγχυση με τη χημειοθεραπεία πυκνής χορήγησης (dose dense chemotherapy) όπου τα χημειοθεραπευτικά να μην χορηγούνται στη μέγιστη ανεκτή δόση, αλλά συχνότερα από ότι στη συμβατική χημειοθεραπεία με αποτέλεσμα την ανάγκη υποστήριξης των ασθενών με αυξητικούς παράγοντες αιμοποιητικών κυττάρων (Εικ. 1) (1).



**Εικ.1.1 Πρωτόκολλα χημειοθεραπείας.** Καταδεικνύεται η σχέση των τριών πρωτοκόλλων χημειοθεραπείας Α. Μέγιστη ανεκτή δόση, Β. Πυκνή χορήγηση, Γ. Μετρονομική

χημειοθεραπεία με τη δοσολογία (κάθετος άξονας) και το χρονικό σχεδιασμό της θεραπείας (οριζόντιος άξονας).

### **1.1.2 Ο ρόλος της μετρονομικής χημειοθεραπείας στη θεραπευτική του καρκίνου**

Αν εξαιρέσουμε ορισμένες αιματολογικές νεοπλασίες, μεγάλο ποσοστό καρκίνων του όρχεως και κάποιες παιδικές νεοπλασίες η συμβατική χημειοθεραπεία αδυνατεί να επιφέρει ίαση στην πλειονότητα των προχωρημένων μορφών επιθηλιακών καρκίνων. Στις καλύτερες των περιπτώσεων παρατείνει την επιβίωση ή το διάστημα ελεύθερο νόσου. Αν και οι περισσότεροι όγκοι ανταποκρίνονται αρχικά στη χημειοθεραπεία σμικρυνόμενοι, στην πορεία υποτροπιάζουν και γίνονται ανθεκτικοί. Αυτό εξηγείται από τη φυσική εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων μέσω γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών με επιλογή ανθεκτικών κλώνων στα κυτταροτοξικά φάρμακα που διατηρούν εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι κλώνων χημειοευαίσθητων κυττάρων (2). Συνεπώς, η καθολική εκρίζωση των καρκινικών κυττάρων δε μοιάζει ρεαλιστική λύση και ενδεχομένως χρειάζεται επαναστοχοθέτηση της χημειοθεραπείας προς την κατεύθυνση διατήρησης του καρκίνου σε καθεστώς αδράνειας (3-5).

Από την άλλη οι στοχευμένες θεραπείες δεν έχουν επιφέρει θεαματικά αποτελέσματα χορηγούμενες ως μονοθεραπεία. Η συγχορήγηση τους με χημειοθεραπευτικά συντελεί στην απώλεια του πλεονεκτήματος της χαμηλής τοξικότητας. Οπότε η χημειοθεραπεία παραμένει στην πρώτη γραμμή θεραπείας του καρκίνου γεγονός που απαιτεί καλύτερο σχεδιασμό πρωτοκόλλων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες παρενέργειες.

Τέλος η δημιουργία νέων αγγείων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη των όγκων και οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες έχουν εισαχθεί δυναμικά στη θεραπευτική του καρκίνου. Οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες αναστέλλουν κατά βάση το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF. Ωστόσο εναλλακτικά μονοπάτια αγγειογένεσης ενεργοποιούνται με αποτέλεσμα οι όγκοι να αποκτούν ανθεκτικότητα. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα χημειοθεραπευτικά ασκούν πλειοτροπική αντιαγγειογενετική δράση μη εξαρτώμενη αποκλειστικά από ειδικό σηματοδοτικό μονοπάτι.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν αφενός την αντιενδοθηλιακή δράση ορισμένων αντινεοπλασματικών φαρμάκων, αφετέρου την αδυναμία τους να εκρίζωσουν το σύνολο των καρκινικών κυττάρων ορισμένοι μελετητές πρότειναν τον

επαναπροσδιορισμό του στόχου της χημειοθεραπείας προς την κατεύθυνση της αντι-αγγειογένεσης (6). Αυτό το νέο μοντέλο χημειοθεραπείας με το ευνοϊκό προφίλ τοξικότητας θα μπορούσε να καλύψει το θεραπευτικό κενό μεταξύ συμβατικής χημειοθεραπείας, στοχευμένων θεραπειών και παραγόντων έναντι του VEGF (vascular endothelial growth factor).

### **1.1.3 Τα επιστημονικά ερείσματα του πρωτοκόλλου της μετρονομικής χημειοθεραπείας**

Πρώτος ο Kerbel το 1991 πρότεινε ένα μοντέλο χημειοθεραπείας που θα στόχευε τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντί των χημειοανθεκτικών καρκινικών (7). Η απόπτωση των ενδοθηλιακών θα επέφερε έμμεσο αντισυμβατικό αποτέλεσμα μέσω καταστολής της αγγειογένεσης καθώς η περιορισμένη διάθεση θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου θα οδηγούσε στην υποστρόφη των όγκων (8). Επιπλέον τα ενδοθηλιακά θα είχαν το πλεονέκτημα της σταθερής ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία σε αντιδιαστολή με τα γενωμικώς ασταθή καρκινικά που θα ανέπτυσσαν ανθεκτικούς κλώνους (9).

Τα χημειοθεραπευτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων των νεοαγγείων αφήνοντας ανέπαφα τα αδρανή των ώριμων αγγείων. Ωστόσο μόνο όταν χορηγούνται αδιάλειπτα παράγεται αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα.

Η εξήγηση δόθηκε το 2000 από τους Browder και συνεργάτες από την ομάδα του J. Folkman που μελέτησαν την επίδραση της κυκλοφωσφαμίδης σε όγκους μυών από ανθεκτικά στην κυκλοφωσφαμίδα καρκινικά κύτταρα (10). Οι ερευνητές χορήγησαν κυκλοφωσφαμίδα στη μέγιστη ανεκτή δόση και έδωσαν ένα περιθώριο 3 εβδομάδων στον οργανισμό για να παρέλθει η τοξικότητα. Η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων έφτασε στο μέγιστο επτά ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης του φαρμάκου, αλλά η κυτταρική επιβίωση επανήλθε στο φυσιολογικό τη δωδέκατη ημέρα. Στο μεσοδιάστημα μεταξύ των κύκλων χημειοθεραπείας ο όγκος συνέχισε να αναπτύσσεται χωρίς να ανταποκρίνεται στις επόμενες δόσεις. Αντιθέτως όταν η κυκλοφωσφαμίδα χορηγήθηκε ανά 6 ημέρες σε δόση 1/3 της μέγιστης ανεκτής η απόπτωση μεγιστοποιήθηκε 4 φορές εντός του διαστήματος των 3 εβδομάδων και ο όγκος παρουσίασε στασιμότητα (10). Συνεπώς η αγγειογενετική δραστηριότητα φαίνεται να ανακτάται στα διαλείμματα της συμβατικής χημειοθεραπείας, ενώ στην περίπτωση της συνεχούς χορήγησης των κυτταροτοξικών το αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα παραμένει. Επιπλέον ο συνδυασμός κυκλοφωσφαμίδης με

αντιαγγειογενετικό παράγοντα ήταν αποτελεσματικότερος από κάθε φάρμακο χωριστά. Η προσθήκη TNP-470 προκάλεσε εκρίζωση του 84% των ξενοεμφυτευμάτων από χημειοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis (10).

Παρόμοια ευρήματα παρουσιάσθηκαν από τους Klement και συνεργάτες το ίδιο έτος από την ομάδα του Kerbel (11). Η βινμπλαστίνη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC σε μη τοξικές συγκεντρώσεις για τα SK-N-MC κύτταρα νευροβλαστώματος, ενώ η συνεχής χορήγηση σε μύες κατέστειλε την ανάπτυξη ξενοεμφυτευμάτων από χημειοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα SK-N-MC. Ο συνδυασμός μάλιστα με τον αντιαγγειογενετικό βιολογικό παράγοντα DC101, που αποτελεί αντίσωμα έναντι του VEGFR2 υποδοχέα, λειτούργησε συνεργιστικά προκαλώντας την πλήρη καταστολή της ανάπτυξης του όγκου.

Παράλληλα οι Hanahan και συνεργάτες έδωσαν την ονομασία «μετρονομική χημειοθεραπεία» σε αυτό το νέο πρωτόκολλο (12). Ο όρος προήλθε από τη συσκευή του «μετρονόμου» που παράγει σταθερούς και ρυθμικούς παλμούς και εξυπηρετεί τους μουσικούς να ακολουθούν το “tempo” του μουσικού κομματιού που παίζουν. Κατ’ αντιστοιχία με τη συσκευή του μετρονόμου τα φάρμακα στη μετρονομική χημειοθεραπεία χορηγούνται σε ώσεις, αλλά ανά πολύ μικρά τακτά χρονικά διαστήματα.

Οι Hanahan και συνεργάτες υποστήριξαν ότι η μετρονομική χημειοθεραπεία θα έδινε λύση στο πρόβλημα των παρενεργειών των κυτταροτοξικών φαρμάκων ενώ μετά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μύες (10, 11) ο συνδυασμός με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες άξιζε να δοκιμαστεί και σε ασθενείς (12). Ωστόσο η εισαγωγή του πρωτοκόλλου στην κλινική πράξη απαιτεί προσδιορισμό της βέλτιστης δόσης χημειοθεραπευτικών και επιλογή ιδανικών αντιαγγειογενετικών συνδυασμών και σχημάτων θεραπείας (12).

#### **1.1.4 Βέλτιστη μετρονομική δόση και φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες**

Ως βέλτιστη μετρονομική δόση ορίζεται η ατοξική δόση με το μέγιστο αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα. Ωστόσο ο εμπειρικός σχεδιασμός πρωτοκόλλων χημειοθεραπείας συνιστά πρόβλημα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης βιολογικής δόσης. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι στη μετρονομική χημειοθεραπεία η βέλτιστη δόση δεν είναι προφανής όπως συμβαίνει με τη συμβατική χημειοθεραπεία όπου εξ ορισμού χρησιμοποιείται η μέγιστη ανεκτή από πλευράς παρενεργειών.

Το πρόβλημα έγκειται στο ότι τα αντιαγγειογενετικά φάρμακα δεν ακολουθούν απαραίτητα το κλασικό φαρμακολογικό μοντέλο ανταπόκρισης της σιγμοειδούς

καμπύλης (13). Σύμφωνα με αυτό τα φάρμακα ασκούν είτε ανασταλτική είτε διεγερτική επίδραση μετά από συγκεκριμένο ουδό συγκέντρωσης με γραμμικό τρόπο μέχρι να επέλθει plateau. Σε αυτό άλλωστε στηρίζεται η ανάπτυξη των συμβατικών πρωτοκόλλων χημειοθεραπείας με τη δόση να αυξάνεται κλιμακωτά αποσκοπώντας στην απόπτωση του μέγιστου αριθμού καρκινικών κυττάρων.

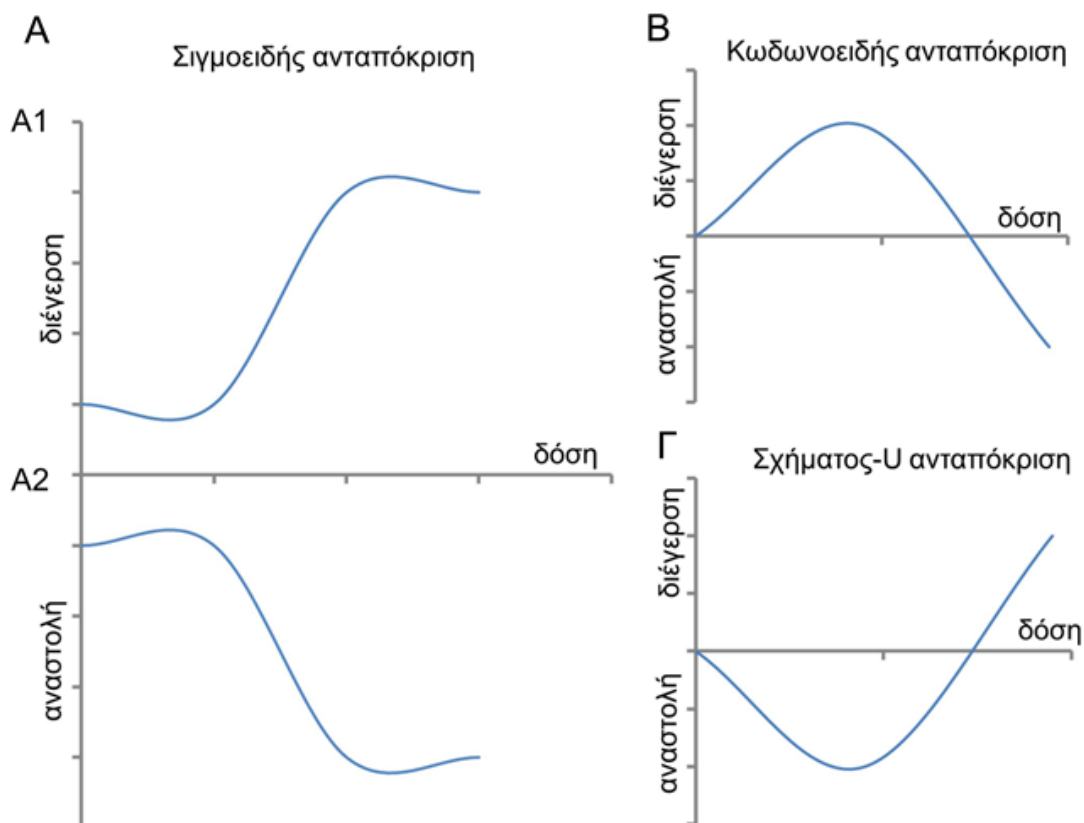
Από την άλλη αξίζει να σημειωθεί το φαρμακολογικό μοντέλο της «όρμεσης» (13). Σε αυτή την περίπτωση η ανταπόκριση μπορεί να είναι είτε κωδωνοειδής (bell shaped), είτε σχήματος U (U shaped). Στη bell shaped ανταπόκριση το φάρμακο ασκεί διεγερτική επίδραση στις μικρές συγκεντρώσεις. Καθώς η συγκέντρωση αυξάνεται η διεγερτική επίδραση χάνεται και γίνεται ανασταλτική. Απεναντίας στη U shaped ανταπόκριση το φάρμακο ασκεί ανασταλτική επίδραση στις μικρές συγκεντρώσεις η οποία εξασθενεί, ενώ η δόση αυξάνεται και μεταπίπτει σε διεγερτική στην περαιτέρω αύξηση. Αυτό το μοντέλο χαρακτηρίζει τη δράση ορισμένων αντιαγγειογενετικών παραγόντων (14).

Συνεπώς, η επιλογή της βέλτιστης δόσης στην αντιαγγειογενετική θεραπεία δεν είναι απλή υπόθεση καθώς υψηλές δόσεις δε συνεπάγονται απαραίτητα μεγαλύτερο ανασταλτικό αποτέλεσμα ενώ μικρές δόσεις μπορεί να έχουν ακόμη και διεγερτική επίδραση για την αγγειογένεση (14). Ως εκ τούτου κρίνεται αναγκαία η εισαγωγή φαρμακοδυναμικών βιοδεικτών για την εξατομικευμένη παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην αντιαγγειογενετική μετρονομική χημειοθεραπεία.

Τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (CEPs) και κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα (CECs) θα μπορούσαν να επιτελέσουν ρόλο βιοδείκτη καθώς τα επίπεδα τους στο αίμα φαίνεται να συσχετίζονται με ανταπόκριση στη μετρονομική χημειοθεραπεία σε προ-κλινικά μοντέλα καρκίνου. Οι Bertolini και συνεργάτες έδειξαν ότι η συμβατική χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη προκάλεσε κινητοποίηση των CEPs από το μυελό των οστών ενώ η μετρονομική μείωσε τα επίπεδα τους σε μύες με λέμφωμα (15). Η μείωση των CEPs και η συνεπακόλουθη αναστολή της de novo δημιουργίας αγγείων (vasculogenesis) φαίνεται να είναι ένας επιπρόσθετος μηχανισμός δράσης της μετρονομικής χημειοθεραπείας (15). Επιπλέον οι Shaked και συνεργάτες έδειξαν ότι η βέλτιστη μετρονομική δόση από πλευράς αντινεοπλασματικού αποτελέσματος της κυκλοφωσφαμίδης, βινορελμπίνης και βινμπλαστίνης συσχετίζεται με πτώση των επιπέδων των CEPs σε μύες με διαφορετικούς τύπους ξένο-εμφυτευμάτων (16).

Τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν δώσει ορισμένα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και σε κλινικές μελέτες. Οι Mancuso και συνεργάτες έδειξαν ότι κατά τη συνδυαστική μετρονομική χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη και μεθοτρεξάτη σε ασθενείς με καρκίνο μαστού η αύξηση των αποπτωτικών CECs συνδέεται με

παράταση του διαστήματος ελεύθερου νόσου και της συνολικής επιβίωσης (17). Επίσης οι Strijbos και συνεργάτες έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων CECs και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη που έλαβαν δοσεταξέλη (18). Οπότε η χρήση των CEPs και CECs μπορεί να είναι ένας χρήσιμος προβλεπτικός και προγνωστικός δείκτης για την αντιαγγειογενετική μετρονομική χημειοθεραπεία (19, 20).



**Εικ. 1.2 Φαρμακολογικά μοντέλα.** Α. Σιγμοειδής ανταπόκριση. Α1 διεγερτική επίδραση, Α2 ανασταλτική επίδραση. Β. Κωδωνοειδής ανταπόκριση. Γ. Σχήματος U ανταπόκριση.

### 1.1.5 Αντιαγγειογενετικοί συνδυασμοί

Εξ αρχής διαπιστώθηκε η ύπαρξη συνέργειας μεταξύ μετρονομικής χημειοθεραπείας και αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Γι αυτό το λόγο η επιλογή του κατάλληλου αντιαγγειογενετικού συνδυασμού είναι καίριας σημασίας. Η συγχορήγηση μετρονομικής κυκλοφωσφαμίδης με τον αντιαγγειογενετικό παράγοντα TNP-470 ήταν ανώτερος από το κάθε φάρμακο χωριστά σε μύες με ξένο-

εμφυτεύματα Lewis ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στη μελέτη των Browder και συνεργατών (10). Επιπλέον ο συνδυασμός βινμπλαστίνης με αντίσωμα έναντι του VEGFR2 ήταν αποτελεσματικότερος από τη μονοθεραπεία στη μελέτη των Klement και των συνεργατών της σε μύες με ξеноεμφυτεύματα νευροβλαστώματος (11).

Μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο έδωσαν επίσης ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα ο συνδυασμός μετρονομικής κυκλοφωσφαμίδης με bevacizumab απέδειξε την αποτελεσματικότητα του σε ασθενείς με υποτροπιάζων καρκίνο των ωοθηκών (21). Επίσης ο συνδυασμός bevacizumab με μετρονομική κυκλοφωσφαμίδα και καπεσιταμπίνη είχε ως αποτέλεσμα τον παρατεταμένο περιορισμό της νόσου σε ικανό ποσοστό ασθενών με προχωρημένο καρκίνο μαστού (22).

Ωστόσο η επιλογή των κατάλληλων αντιαγγειογενετικών συνδυασμών πρέπει να γίνεται ορθολογικά βάσει συνέργειας σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Αυτός είναι άλλωστε ο σκοπός της παρούσης διατριβής που πραγματεύεται το συνδυασμό της μετρονομικής χημειοθεραπείας με βινορελμπίνη με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες.

### **1.1.6 Η πλειοτροπική δράση της μετρονομικής χημειοθεραπείας**

Ο μηχανισμός δράσης που προεξάρχει στη μετρονομική χημειοθεραπεία είναι η αντιαγγειογένεση. Ειδικότερα καταστέλλεται τόσο η αγγειογένεση από προ-υπάρχοντα αγγεία (angiogenesis), όσο και η de novo ανάπτυξη αγγείων από προγονικά κύτταρα (vasculogenesis) (15, 16).

Η δράση της μετρονομικής χημειοθεραπείας βέβαια φαίνεται να είναι πλειοτροπική. Για παράδειγμα υπάρχουν ενδείξεις για ανοσοδιεγερτική επίδραση. Η ικανότητα διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσολογική επίβλεψη φαίνεται να ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της καρκινογένεσης (tumor hallmark). Έχει δειχθεί ότι η κυκλοφωσφαμίδα, οι ταξάνες και οι ανθρακυκλίνες μειώνουν τον πληθυσμό των T ανοσορυθμιστικών λεμφοκυττάρων ( $T_{reg}$ ) όταν χορηγούνται μετρονομικά. Τα  $T_{regs}$  αναστέλλουν τη δράση των T βοηθητικών, T κυτταροτοξικών και κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer cells: NK) που εκλύουν την ανοσολογική απάντηση έναντι των όγκων. Συνεπώς η ελάττωση των  $T_{regs}$  αυξάνει το αντινεοπλασματικό αποτέλεσμα. Επιπλέον οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων και οι αναστολείς της τοποισομεράσης έχουν τη δυνατότητα να επάγουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος

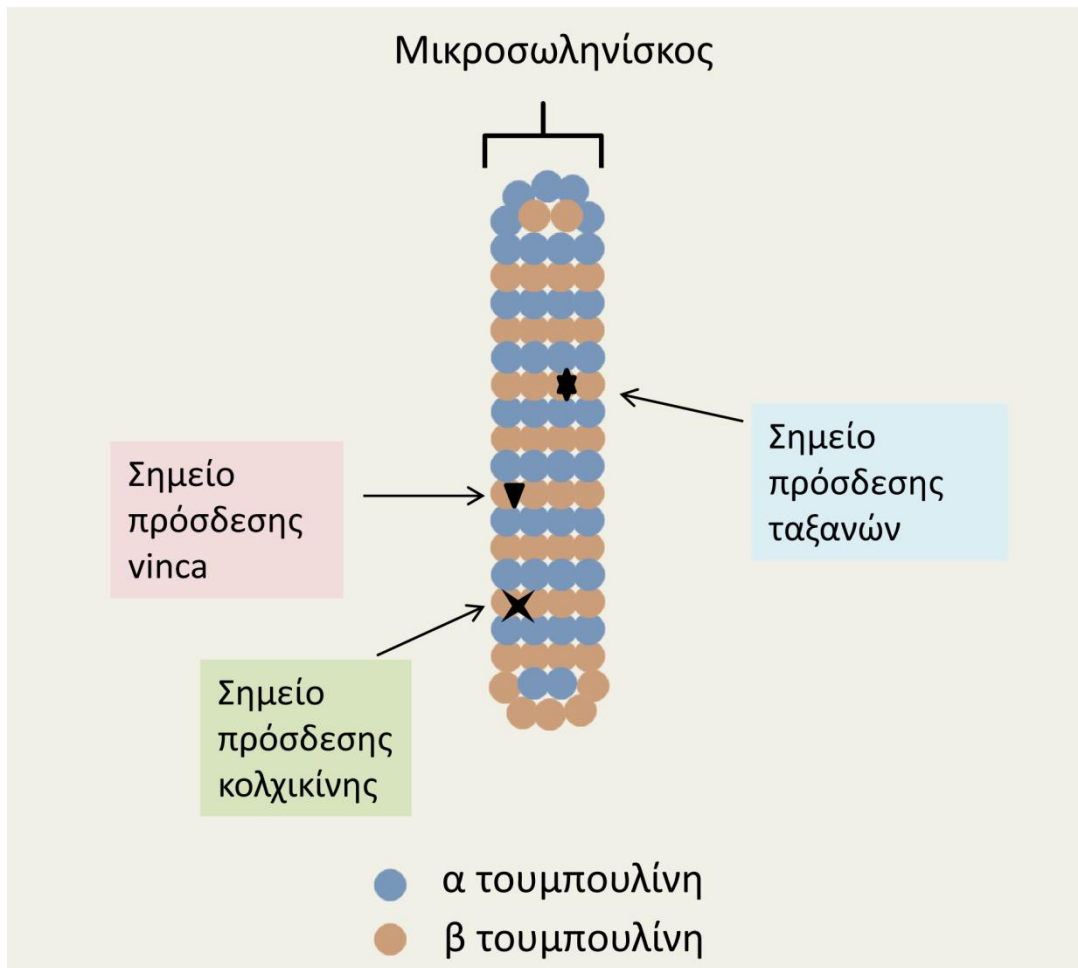


σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις αυξάνοντας την απόκριση έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Από την άλλη οι Pasquier, Kavallaris και Andre πρότειναν την 4D επίδραση (4D: drug-driven dependency/deprivation) ως έναν επιπρόσθετο μηχανισμό που αφορά στην απευθείας δράση στα καρκινικά κύτταρα. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων γίνεται προοδευτικά εξαρτώμενη στη χημειοθεραπεία οπότε ο όγκος υποστρέφει με τη διακοπή της (23). Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε στις εξής πειραματικές ενδείξεις: για παράδειγμα η ανάπτυξη καρκινικών σειρών πνεύμονα έγινε εξαρτώμενη στον παράγοντα αντιμικροσωληνίσκων erothilone-B (24), ενώ καρκινικά κύτταρα μαστού απέκτησαν ανθεκτικότητα στη letrozole μετά από παρατεταμένη θεραπεία ανακτώντας την ευαισθησία τους με τη διακοπή της θεραπείας (25). Η θεωρία της 4D επίδρασης είναι μία ενδιαφέρουσα υπόθεση που χρήζει βέβαια περαιτέρω διερεύνησης.

#### **1.1.7 Οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων στη μετρονομική χημειοθεραπεία**

Οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων (microtubule targeting agents: MTAs) θεωρούνται ως τα κυτταροτοξικά φάρμακα με την ισχυρότερη αντιαγγειογενετική δράση (26-28). Οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων διακρίνονται σε αυτούς που σταθεροποιούν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (microtubule stabilizing agents) με κύριους εκπρόσωπους τις ταξάνες (πακλιταξέλη, δοσεταξέλη) και τις εποθιλόνες, και σε αυτούς που διαταράσσουν και αποπολυμερίζουν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (29). Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν αφενός τα αλκαλοειδή της vinca (vinca alkaloids) που δρουν στο σημείο πρόσδεσης των vinca στη β-τουμπουλίνη και εκπροσωπούνται από τη βινμπλαστίνη, βινκριστίνη, βινορελμπίνη και βινφλουνίνη και αφετέρου οι παράγοντες που δρουν στο σημείο πρόσδεσης της κολχικίνης όπως η κολχικίνη, κομπρεταστατίνη και 2-μεθοξυ-οιστραδιόλη (Εικ. 1.3) (29). Στην κλινική πράξη τόσο οι σταθεροποιητές όσο και οι αποσταθεροποιητές των μικροσωληνίσκων χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές που προκαλούν πολυμερισμό ή αποπολυμερισμό της β-τουμπουλίνης *in vitro* και ασκούν αντineοπλασματική δράση μέσω καταστολής της δυναμικής των μικροσωληνίσκων (30).



**Εικ. 1.3 Θέσεις πρόσδεσης των παραγόντων αντιμικροσωληνίσκων.** Τα σημεία πρόσδεσης των ταξανών, αλκαλοειδών της vinca και κολχικίνης στη β-υπομονάδα της τουμπουλίνης.

Η αντιαγγειογενετική δράση των παραγόντων αντιμικροσωληνίσκων αποδίδεται είτε στην απευθείας, είτε στην έμμεση επίδραση που ασκούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα (26).

Αναφορικά με την απευθείας δράση οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων καταρχήν αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ειδικότερα διαταράσσουν τη λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου που διαχωρίζει τα χρωμοσώματα κατά τη μίτωση εμποδίζοντας έτσι τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση του κυτταρικού κύκλου οδηγώντας σε μιτωτικό μπλοκ (30-32). Στη συνέχεια η μοίρα των κυττάρων έχει ως εξής: είτε αποπίπτουν στη φάση της μίτωσης ή διαιρούνται ανώμαλα σε δύο κύτταρα με διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία) ή εξέρχονται από τη μίτωση χωρίς διαίρεση (33). Στην τελευταία περίπτωση είτε αποπίπτουν στη μεσόφαση, είτε κάνουν στάση (arrest) στη μεσόφαση, είτε προχωρούν στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου (33).

Οι MTAs προκαλούν απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού (34). Ειδικότερα οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων καταστέλλουν την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Για παράδειγμα η έκθεση σε MTAs οδήγησε στην ενεργοποίηση της JNK (c-Jun N-terminal kinase) (35, 36) επάγοντας τη φωσφορυλίωση και τον καταβολισμό των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1) (37) και Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (38-40). Οι μεταβολές στην ισορροπία των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών πρωτεϊνών συντελούν στη διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και τον κυτταρικό θάνατο (41, 42). Η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελεί πιθανώς το εναρκτήριο λάκτισμα της ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού από τους MTAs (37, 43).

Εκτός των άλλων οι MTAs έχουν απευθείας επίδραση στα μιτοχόνδρια (34). Η επώαση μιτοχονδρίων με MTAs οδήγησε στην κατάρρευση της ΔΨm (mitochondrial membrane potential), μιτοχονδριακό οίδημα και απελευθέρωση κυτοχρώματος C. Μάλιστα υποστηρίχθηκε ότι οι μικροσωληνίσκοι συμμετέχουν στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας δεδομένου ότι η μιτοχονδριακή τουμπουλίνη αλληλεπιδρά με τη VDAC (voltage-dependent anion channel) (44, 45) που είναι ρυθμιστικό μέρος του πόρου της μιτοχονδριακής μεμβράνης υπεύθυνη για κυτταρικό θάνατο μέσω MPT (mitochondrial pore transition) (46).

Ρόλο στην πρόκληση απόπτωσης από MTAs έχει και η πρωτεΐνη p53. Τόσο η πακλιταξέλη όσο και η βινφλουνίνη αύξησαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 (39, 47). Αυτή η δράση φαίνεται ότι εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου. Οι Bourgarel-Rey και συνεργάτες διαπίστωσαν επαγωγή του p53 σε καρκινικά κύτταρα μαστού που εκτέθηκαν σε βινορελμπίνη (48). Επιπλέον ο p53 εμπόδισε τη μεταγραφή του Bcl-2 προσδεδεμένος στον εκκινητή του γονιδίου. Το εύρημα αυτό συνιστά ένα επιπρόσθετο μηχανισμό ρύθμισης του Bcl-2 πέραν της JNK μεσολαβούμενης καταστολής του (37).

Οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων επιδρούν σε επιπρόσθετες λειτουργίες της αγγειογένεσης (26, 28). Εν αντιθέσει με τις λοιπές κατηγορίες κυτταροτοξικών που έχουν καθαρά αντιπολλαπλασιαστική δράση οι MTAs φαίνεται ότι καταστέλλουν τόσο τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, όσο και το σχηματισμό τριχοειδικών σχηματισμών. Οι MTAs ασκούν αντιαγγειογενετική δράση σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από αυτές που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα. Οι Pasquier και συνεργάτες παρατήρησαν ότι η πακλιταξέλη ελάττωσε την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνοντας τη δυναμική αστάθεια των μικροσωληνίσκων στη μεσόφαση του

κυττάρου (49). Στο ίδιο μήκος κύματος είναι τα ευρήματα των Pourroy και συνεργατών με τη βινφλουνίνη (50).

Η ανασταλτική επίδραση στη χημειοταξία αποδίδεται μάλλον στις διαταραχές που προκαλούν οι MTAs στη λειτουργία του κεντροσώματος MTOC (51). Το MTOC (microtubule organizing center) είναι το κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων και ο προσανατολισμός του είναι κρίσιμος για τη μετακίνηση του κυττάρου προς την επιδιωκόμενη κατεύθυνση. Κρίσιμο ρόλο σε αυτό παίζουν τα λαμελιπόδια τα οποία εκτείνονται από την κορυφή του μετακινούμενου κυττάρου προς χημειοτακτικούς παράγοντες (π.χ. VEGF, bFGF, κ.α) και αποσύρονται όταν αποτύχει ο σωστός προσανατολισμός του MTOC (52). Ενδεικτικά με τη δράση των MTAs, η δοσεταξέλη κατέστειλε τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε μη τοξικές συγκεντρώσεις επηρεάζοντας την πλαστικότητα των μικροσωληνίσκων και εμπόδισε τον προσανατολισμό του κεντροσώματος προς τη σωστή φορά κατεύθυνσης (53).

Επιπλέον οι MTAs επηρεάζουν τη λειτουργία των GTPασών της οικογένειας Rho (54). Ο ρόλος των Rho GTPασών είναι πολύ σημαντικός για τη μετανάστευση (55). Η Cdc42 επάγει το σχηματισμό φιλοποδίων και ρυθμίζει τον προσανατολισμό του MTOC, η Rac1 επάγει το σχηματισμό λαμελιποδίων και η RhoA ρυθμίζει τόσο το σχηματισμό των ινών του στρες ακτίνης (actin stress fibers) όσο και των σημείων πρόσδεσης στην εξωκυττάρια ουσία (FA:focal adhesion). Οι MTAs αναστέλλουν τις Cdc42 και Rac1, αλλά ενεργοποιούν τη RhoA με αποτέλεσμα να διαταράσσεται ο σχηματισμός ινών στρες ακτίνης και σημείων πρόσδεσης στην εξωκυττάρια ουσία γεγονός που προκαλεί σημαντικές επιπτώσεις στη μετακίνηση του ενδοθηλιακού κυττάρου.

Εκτός των άλλων οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων ασκούν έμμεση επίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της ρύθμισης της έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων. Για παράδειγμα η πακλιταξέλη ελάττωσε την έκφραση του VEGF σε όγκους μαστού από διαγονιδιακούς μύες καταστέλλοντας την αγγειογένεση (56), ενώ η δοσεταξέλη και η βινκριστίνη μείωσαν την έκκριση VEGF από T-λευχαιμικά κύτταρα (57). Ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει και η ρύθμιση της έκφρασης του SDF-1 (stromal cell-derived factor-1). Η βινορλεμπίνη μείωσε την επαγόμενη από την υποξία έκκριση SDF-1 σε MRC-5 ινοβλάστες ενώ η αγγειογενετική λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων κατεστάλη μετά την επώαση τους σε θρεπτικά μέσα (conditioned media) που προήλθαν από ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε βινορλεμπίνη (58).

Τα ανωτέρω ευρήματα πιθανώς αποδίδονται στην επίδραση που έχουν οι MTAs στο μεταγραφικό παράγοντα της υποξίας hypoxia-inducible factor (HIF)-1a. Οι Giannakakou και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η 2-μεθοξυ-οιστραδιόλη, η εποθιλόνη-

B, η δοσεταξέλη, η κολχικίνη και η βινκριστίνη ελάττωσαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF1α (59). Η μείωση αυτή αποδόθηκε στην καταστολή της μετάφρασης του mRNA μέσω της διάρρηξης του δικτύου των μικροσωληνίσκων (60). Ωστόσο μένει να εξακριβωθεί εάν αυτό αφορά σε επίδραση μόνο των συμβατικών δόσεων χημειοθεραπείας ή και των μετρονομικών δεδομένου ότι η μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης δεν κατέστειλε την έκφραση του HIF-1α σε ενδοθηλιακά κύτταρα στην υποξία όπως προκύπτει από προσωπικές αδημοσίευτες παρατηρήσεις.

Τέλος οι MTAs αυξάνουν την έκκριση του TSP-1 (thrombospondin-1). Ο TSP-1 προσδένεται είτε στον υποδοχέα του ενδοθηλιακού κυττάρου CD36 προκαλώντας απόπτωση, είτε στον υποδοχέα CD47 για να αναστείλει τη μεταγωγή σήματος από το νιτρικό οξειδίο (NO) (61). Ο Bocci έδειξε ότι μετρονομικές συγκεντρώσεις βινμπλαστίνης, πακλιταξέλης και του αλκυλιωτικού παράγοντα της κυκλοφωσφαμίδης αύξησαν την έκφραση του TSP-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα (62). Τέλος οι Jiang και συνεργάτες παρατήρησαν αύξηση της έκφρασης του TSP-1 σε μύες με μεταστατικό καρκίνο μαστού (62).

### **1.1.8 Μετρονομική χημειοθεραπεία με βινορελμπίνη**

Το αντικείμενο αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι η *in vitro* μελέτη των επιδράσεων της μετρονομικής χημειοθεραπείας με βινορελμπίνη σε πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η βινορελμπίνη είναι ένα αλκαλοειδές της *vinca*, ημισυνθετικό παράγωγο της βινμπλαστίνης (5'-norhydro vinblastine; vinorelbine) με τροποποίηση στον πυρήνα καθαρανθίνης το οποίο προσδίδει μεγαλύτερη λιποφιλικότητα και ευνοϊκό προφίλ τοξικότητας σε σχέση με παλαιότερα αλκαλοειδή της *vinca* (30). Επίσης έχει το πλεονέκτημα της χορήγησης από το στόμα (Navelbine soft caps), γεγονός που το καθιστά ιδανικό φαρμακευτικό παράγοντα σε συνθήκες μακροχρόνιας χορήγησης, όπως στην περίπτωση της μετρονομικής χημειοθεραπείας. Η *per os* πρόσληψη πλεονεκτεί σε σχέση με την έγχυση δια της φλεβικής οδού καθώς προσφέρει ποιότητα ζωής και καλύτερη συμμόρφωση στη θεραπεία.

Κλινικές μελέτες από τους Briasoulis και συνεργάτες έδειξαν ότι η μετρονομική χορήγηση βινορελμπίνης είναι εφικτή προκαλώντας αντινεοπλασματικό αποτέλεσμα με αμελητέα τοξικότητα.

Κατ' αρχήν εξετάσθηκε ένα εύρος δόσεων προκειμένου να καθοριστεί η ασφάλεια της παρατεταμένης συχνής χορήγησης βινορελμπίνης σε μελέτη τύπου φάσης I (63). Η κλιμάκωση των δόσεων βινορελμπίνης από τα 20 mg στα 70 mg

έδειξε ότι δόσεις 20-50 mg είναι ασφαλείς όταν το φάρμακο χορηγείται 3 φορές την εβδομάδα. Η ίδια μελέτη έδειξε αντικειμενικές ανταποκρίσεις ασθενών με προχωρημένο καρκίνο χωρίς ανάπτυξη σοβαρών παρενεργειών.

Ακολούθησε τυχαιοποιημένη μελέτη τύπου φάσης IIA επιλογής της βέλτιστης δόσης που επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου και την επιλογή των 50 mg ως την βέλτιστη (64). Η χορήγηση 50 mg βινoreλμπίνης 3 φορές την εβδομάδα είχε ως αποτέλεσμα παρατεταμένη αντineοπλασματική δράση χωρίς έκδηλη τοξικότητα με διατήρηση σταθερών χαμηλών νανομοριακών συγκεντρώσεων στο αίμα της τάξεως των 2.6 ng/ml. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα χαμηλά επίπεδα του φαρμάκου και των αγγειογενετικών παραγόντων FGF2 και IL-8 στους ασθενείς με ανταπόκριση στη θεραπεία, οι Briasoulis και συνεργάτες υποστήριξαν την αντιαγγειογενετική βάση του πρωτοκόλλου. Επιπλέον υποστηρίχθηκε ότι ο συνδυασμός μετρονομικής βινoreλμπίνης με άλλους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες θα είχε συνεργιστική δράση με διατήρηση του χαμηλού προφίλ τοξικότητας.

## 1.2 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

### 1.2.1 Ο ρόλος της αγγειογένεσης στον καρκίνο

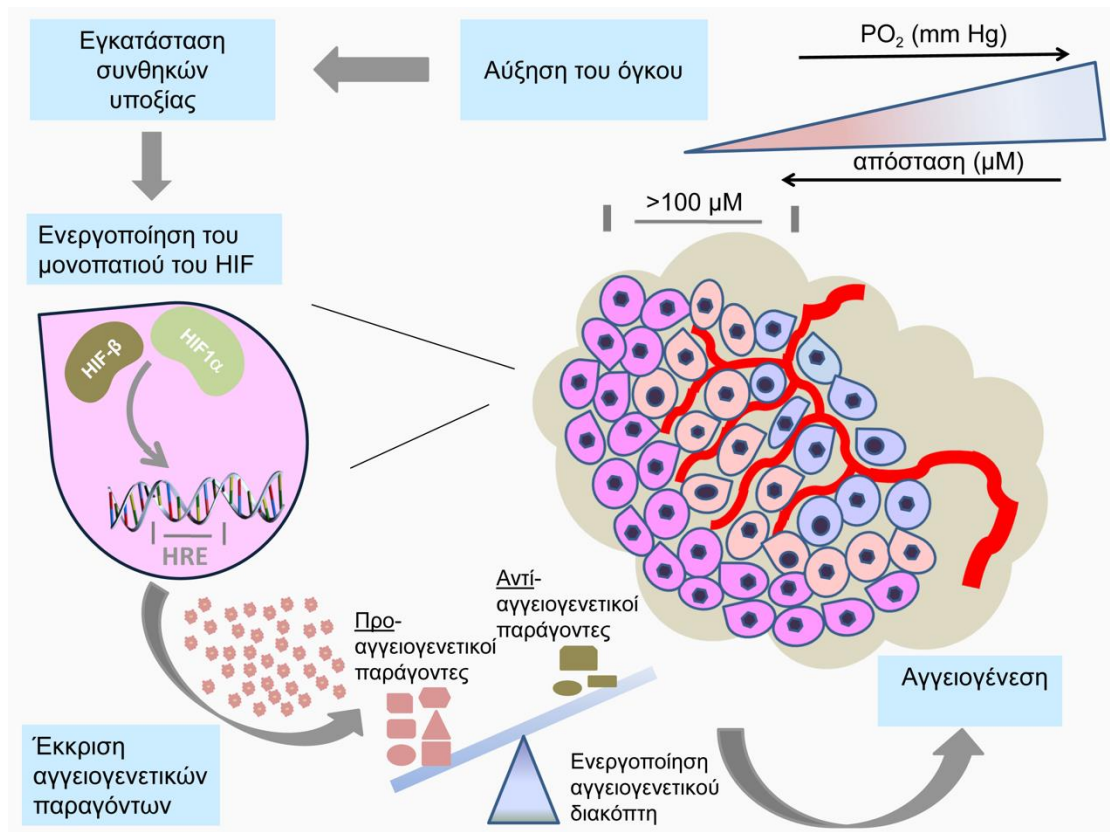
Η αγγειογένεση αποτελεί απαραίτητη διαδικασία ανάπτυξης των όγκων και έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα βασικά γνωρίσματα του καρκίνου (hallmarks of cancer) (65). Το 1971 ο Judah Folkman υπέθεσε ότι οι όγκοι θα πρέπει να αιματώνονται προκειμένου να αναπτυχθούν, ενώ η διακοπή της αιματικής παροχής θα οδηγούσε στην υποστροφή τους (8). Πρότεινε λοιπόν την αντιαγγειογενετική θεραπεία σαν μια νέα θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση του καρκίνου (8). Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε σε ισχυρές πειραματικές ενδείξεις. Οι πρωτοπαθείς όγκοι χρειάζονται τροφοδότηση από αγγεία για να αναπτυχθούν πέραν του μεγέθους των 1-2 mm<sup>3</sup>, ενώ οι μεταστάσεις χρειάζονται επίσης αιμάτωση για να γίνουν έκδηλες (66). Η σχέση βέβαια ογκογένεσης-αγγειογένεσης είχε διαπιστωθεί ήδη από το 1941 με τη μελέτη του Harry Greene ο οποίος εμφύτευσε καρκινικά κύτταρα από κουνέλια σε άλλα είδη πειραματοζώων και παρατήρησε αύξηση της μάζας των αλλογενών όγκων με αγγειακό πλέγμα και στασιμότητα αυτών χωρίς αγγείωση (67).

Η αγγειογένεση του καρκίνου ρυθμίζεται από πλειάδα παραγόντων που έχουν είτε διεγερτική, είτε ανασταλτική επίδραση (68). Η κλίση του ισοζυγίου έκφρασης αυτών των παραγόντων καθορίζει εάν θα ενεργοποιηθεί ο «αγγειογενετικός διακόπτης» (angiogenic switch), όπως προτάθηκε από τις Bergers και Benjamin (69). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία οι όγκοι αρχικά αναπτύσσονται χωρίς να τροφοδοτούνται από αγγεία μέχρι το σημείο που επέρχεται ισορροπία πολλαπλασιασμού – απόπτωσης καρκινικών κυττάρων. Για να υπάρξει εκθετική αύξηση του όγκου απαιτείται ενεργοποίηση του «αγγειογενετικού διακόπτη» (69). Στη φάση αυτή το ισοζύγιο κλίνει υπέρ της αγγειογένεσης και πυροδοτείται η διαδικασία δημιουργίας νέων αγγείων που τροφοδοτούν τον όγκο.

### 1.2.2 Υποξία: Το εναρκτήριο λάκτισμα της αγγειογένεσης

Η ιστική υποξία είναι παράγοντας που προκαλεί ενεργοποίηση του αγγειογενετικού διακόπτη (70). Ειδικότερα ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων οδηγεί στην αύξηση του μεγέθους του σχηματιζόμενου όγκου. Το O<sub>2</sub> όμως από τα τριχοειδή του φυσιολογικού ιστού δε μπορεί να διαχυθεί πέραν της αποστάσεως των 100 μM-200 μM με αποτέλεσμα την εγκατάσταση συνθηκών υποξίας στο εσωτερικό του όγκου (71, 72). Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου επάγει το μεταγραφικό παράγοντα HIF, κύριο ρυθμιστή της σηματοδότησης στην υποξία

(73). Ο HIF με τη σειρά του προάγει την έκφραση προ-αγγειογενετικών παραγόντων που συντελούν στην κλίση του ισοζυγίου υπέρ της αγγειογένεσης (Εικ. 1.4) (74).



**Εικ.1.4 Ενεργοποίηση της αγγειογένεσης.** Η αύξηση του όγκου συντελεί στην εγκατάσταση συνθηκών υποξίας και ενεργοποίηση του μονοπατιού του HIF στα κύτταρα που απέχουν απόσταση  $>100 \mu M$  από τα τριχοειδή με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων και την κλίση του ισοζυγίου υπέρ της αγγειογένεσης.

Ο HIF είναι ετεροδιμερές το οποίο ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών bHLH-PAS (basic helix loop helix-Per/ARNT/Sim) (75). Αποτελείται από μία  $\alpha$ -υπομονάδα στην οποία ανήκουν οι HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  και HIF-3 $\alpha$  τα επίπεδα των οποίων ρυθμίζονται από τη μερική πίεση  $O_2$  ( $PO_2$ ) και μία σταθερά εκφραζόμενη  $\beta$ -υπομονάδα (HIF- $\beta$ ) της οικογένειας των Aryl hydrocarbon nuclear translocator family που περιλαμβάνει τους Arnt, Arnt2, and Arnt3. Οι υπομονάδες του HIF έχουν ομοιότητες στη δομή και διαθέτουν τους εξής τομείς: τον τομέα bHLH στο αμινοτελικό άκρο που εξυπηρετεί την πρόσδεση στο DNA, τον Per-ARNT-Sim (PAS) τομέα στην κεντρική περιοχή που εξυπηρετεί τον ετεροδιμερισμό και την καρβοξυ-τελική περιοχή που προσελκύει ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής.



Τα επίπεδα του HIF ρυθμίζονται από τις προλυλ-υδροξυλάσες (prolyl hydroxylase), PHD1-3 που είναι οι αισθητήρες οξυγόνου του κυττάρου (76). Αυτά τα ένζυμα είναι μέλη της οικογένειας των Fe(II) και 2-οξογλουταρικο-εξαρτώμενων διοξυγενασών (76). Σε συνθήκες με επαρκή μερική πίεση O<sub>2</sub> οι PHD υδροξυλιώνουν τον HIF σε δύο θέσεις προλίνης (77, 78). Η υδροξυλίωση τους συντελεί στην πρόσδεση του HIF στο σύμπλεγμα της πρωτεΐνης von Hippel–Lindau E3 (VHL) με τις Elongin-B, Elongin-C, Cui2 και RBX1 με δράση λιγάσης της ουμπικουϊνής (79) με αποτέλεσμα την ουμπικιτινοποίηση και τον καταβολισμό του HIF1-α από το πρωτεάσωμα (80).

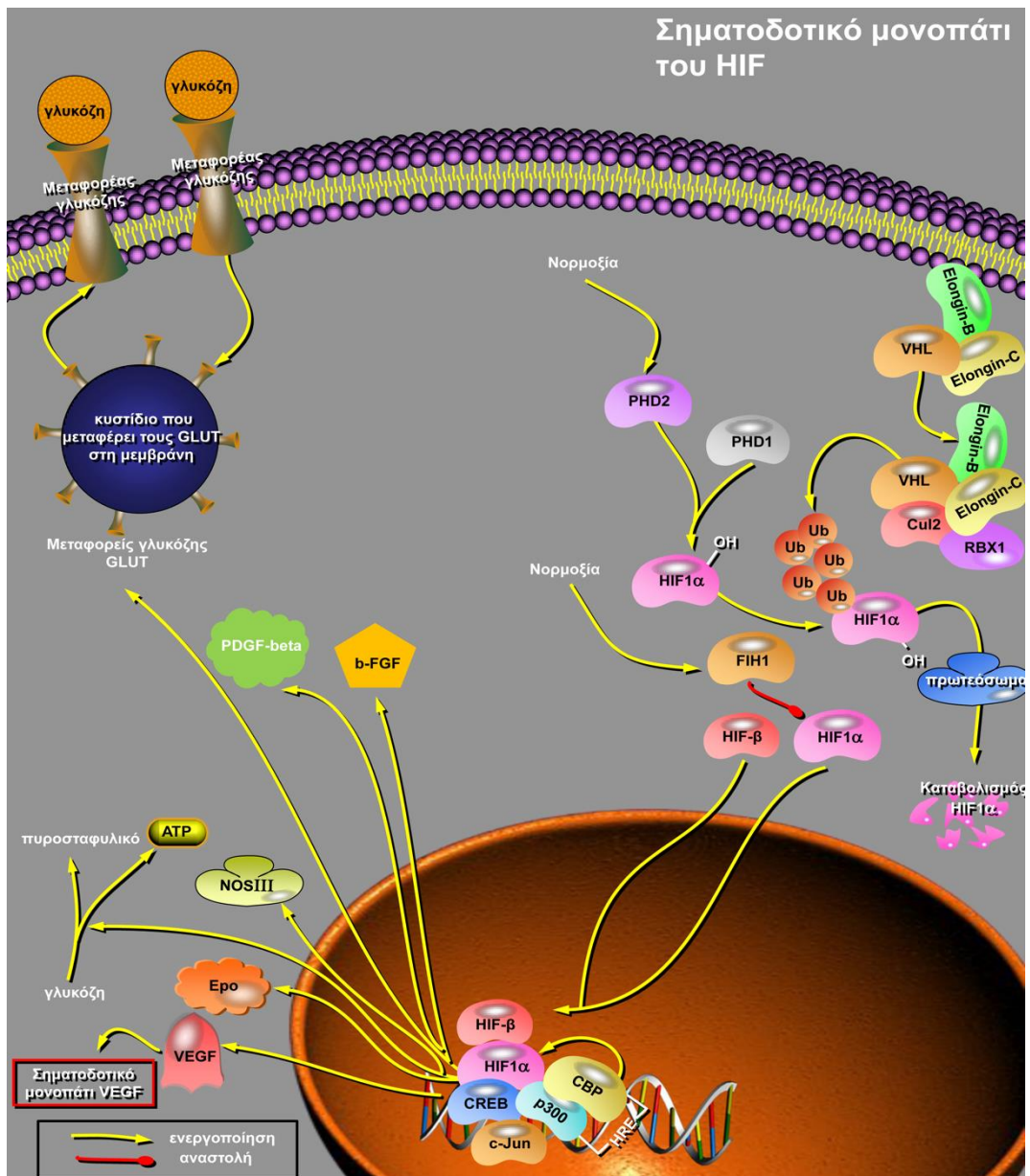
Η περιορισμένη διάθεση O<sub>2</sub> και 2-oxoglutarate σε συνθήκες υποξίας έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των PHD και την αύξηση των επιπέδων του HIF-α. Στην απενεργοποίηση των PHD πιθανώς παίζουν ρόλο και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (81). Πράγματι οι Chandel και συνεργάτες έδειξαν ότι σε συνθήκες υποξίας συμβαίνει υπερπαραγωγή ορισμένων δραστικών μορφών οξυγόνου οι οποίες προκαλούν αναστολή των PHD και αύξηση των επιπέδων του HIF-α (82, 83). Η παραγωγή των ROS σε αυτή την περίπτωση γίνεται στη θέση Qo του συμπλέγματος III της αλυσίδας ηλεκτρονίων (84). Ωστόσο η ρύθμιση των επιπέδων του HIF-α από τις ROS είναι αμφιλεγόμενη (85), καθώς η παραγωγή τους σε συνθήκες υποξίας αμφισβητείται από ορισμένους άλλους ερευνητές (86) ενώ η ίδια η PHD φαίνεται πως έχει χαμηλή ευαισθησία στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (87).

Τέλος υπάρχουν επιπρόσθετα επίπεδα ρύθμισης της HIF σηματοδότησης. Η FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) είναι μία Fe(II) / 2-οξογλουταρικο-εξαρτώμενη διοξυγενάση που υδροξυλιώνει σε συνθήκες νορμοξίας την υπεύθυνη περιοχή του HIF για την trans-ενεργοποίηση. Με αυτή την υδροξυλίωση παρεμποδίζεται η πρόσδεση των ενεργοποιητών της μεταγραφής με αποτέλεσμα την απώλεια της μεταγραφικής ικανότητας του HIF (88).

Τέλος ο HIF υπόκειται σε επιπλέον μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη μεταγραφική του ικανότητα όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, sumo-υλίωση και s-νιτροσυλίωση (89). Ωστόσο η σημασία τους ξεφεύγει από το πεδίο ενδιαφέροντος αυτής της διατριβής.

Τελικό αποτέλεσμα των καταστάσεων κυτταρικής υποξίας είναι η αύξηση των επιπέδων και της ενεργότητας του HIF-α (90). Δεδομένου ότι ο HIF διαθέτει NLS (nuclear localization signal) εκτοπίζεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT(HIF-β) και συζεύγνυται με τον CBP (CREB Binding Protein), τον p300 και την Pol II (DNA polymerase II) (91, 92). Το σύμπλεγμα προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων που διαθέτουν HRE (Hypoxia-Responsive Elements) με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής τους (93).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού του HIF έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ερυθροποίηση και την αγγειογένεση (Εικ. 1.5) (94). Χαρακτηριστικά ο HIF αυξάνει την έκφραση της ερυθροποιητίνης (EPO), μεταφορέων γλυκόζης (Glucose transporters: GLUT), γλυκολυτικών ενζύμων και αγγειογενετικών παραγόντων. Ειδικότερα η έκφραση των VEGF, platelet-derived growth factor (PDGF)-beta και basic fibroblast growth factor (bFGF) αυξάνεται στην υποξία με HIF ρυθμιζόμενο τρόπο με αποτέλεσμα την πυροδότηση της διαδικασίας αγγείωσης του υποξικού όγκου (70, 74).



Εικ. 1.5 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του HIF (τροποποιημένη εικόνα, ευγενής παραχώρηση της SABiosciences). Απενεργοποίηση του HIF από την FIH1 και υδροξυλίωση του από τους PHD σε συνθήκες νορμοξίας με αποτέλεσμα την πρόσδεση στο

σύμπλεγμα των VHL - elongins και τον καταβολισμό του. Μεταγραφή HIF εξαρτώμενων γονιδίων στην υποξία συμπεριλαμβανομένων αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF.

### **1.2.3 Αγγειογένεση με εκβλάστηση (sprouting angiogenesis)**

Η αγγειογένεση με εκβλάστηση είναι ο βασικός μηχανισμός αγγειογένεσης στον καρκίνο και αφορά στη δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα (95). Εν προκειμένω τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα και κύτταρα του στρώματος του υποξικού όγκου. Οι εν λόγω παράγοντες αυξάνουν την έκφραση των μεταλλοπρωτεασών (Matrix metalloproteinases: MMPs) που συντελούν στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας. Στη συνέχεια τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν προς τις περιοχές έκκρισης αγγειογενετικών παραγόντων μέσω της έκτισης φιλοποδίων που παίζουν ρόλο αισθητήρα (96). Παράλληλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα που ακολουθούν πολλαπλασιάζονται για να σχηματίσουν τον κορμό του νέου αγγείου. Στη συνέχεια τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν κενοτόπια η συνένωση των οποίων συντελεί στη δημιουργία αυλού (97). Ακολουθεί ωρίμανση και σταθεροποίηση του αγγείου μέσω της PDGF-επαγόμενης επιστράτευσης περικυττάρων τα οποία εναποθέτουν εξωκυττάρια ουσία και αδρανοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνοντας παράγοντες όπως η Angiopoietin1 (98).

### **1.2.4 Μοριακή σηματοδότηση της αγγειογένεσης με εκβλάστηση**

#### **1.2.4.1 VEGF σηματοδότηση**

Η οικογένεια VEGF αποτελείται από τους παράγοντες VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD και PlGF (placenta growth factor). Ο VEGFA είναι ο κύριος μεσολαβητής της αγγειογένεσης (99). Οι προσδέτες της οικογένειας VEGF σηματοδοτούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1) και VEGFR3 (Flt4) (100). Ρόλο επίσης διαδραματίζουν δύο neuropilins (NRP) που ασκούν τροποποιητική δράση ως συν-υποδοχείς (101).

Η πρόσδεση του VEGF προκαλεί ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό των υποδοχέων (102). Η μεταβολή στη στερεοδιάταξη του VEGFR2 προκαλεί ενεργοποίηση της καταλυτικής δράσης της κινάσης τυροσίνης που διαθέτει με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των τυροσινών του ίδιου (cis φωσφορυλίωση) ή του διπλανού υποδοχέα (trans φωσφορυλίωση). Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες της

κυτταροπλασματικής υπομονάδας αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για δευτερογενείς μεσολαβητές του καταρράκτη της μεταγωγής σήματος με διατηρημένες πρωτεϊνικές περιοχές SH2 (Src Homology 2) (103).

Η αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων είναι εξίσου σημαντική προκειμένου να διατηρηθεί η ενεργότητα των υποδοχέων σε φυσιολογικά επίπεδα. Για παράδειγμα παράλληλα με την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης επάγονται οι SHP1 (Src-homology phosphatase-1) και SHP2 φωσφατάσες που προκαλούν από-φωσφορυλίωση των φωσφοτυροσινών του VEGFR2 (104).

Η ενδοκυττάρωση (endocytosis) και η ενδοκυττάρια διακίνηση (trafficking) του υποδοχέα αποτελούν ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης (105). Η πρόσδεση του VEGF οδηγεί στην ενδοκυττάρωση του VEGFR2 με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης. Ο ρόλος της Ephrin-B2 είναι επίσης σημαντικός (106). Στη συνέχεια τα ενδοκυτταρωμένα κυστίδια συντήκονται με ενδοσώματα (endosomes) που εκφράζουν Rab5 (107). Η μοίρα του VEGFR2 αφορά είτε στον καταβολισμό είτε στην ανακύκλωση του και εξαρτάται από την ισομορφή του προσδέτη και την παρουσία συν-υποδοχέα NRP1 (108).

Η ενεργότητα του υποδοχέα εξαρτάται από τον τύπο του ενδοσωμιακού διαμερίσματος στο οποίο εντοπίζεται (όπως ανασκοπήθηκε από την Eichmann και συνεργάτες) (105). Η παραμονή σε Rab5 θετικά ενδοσώματα προσελκύει την PTP1b φωσφατάση με αποτέλεσμα την από-φωσφορυλίωση της τυροσίνης Y1175 η οποία είναι σημαντική για την ενεργοποίηση του PLCγ/ERK άξονα και τη μείωση της δραστηριότητας της ERK (109). Απεναντίας η μετακίνηση σε EEA1 θετικά ενδοσώματα διαφυλάττει την ενεργότητα της ERK. Η ενεργότητα των υπολοίπων τελεστών της VEGF μεταγωγής σήματος όπως η PI3K παραμένει ανεπηρέαστη.

Τέλος η πρωτεολυτική διάσπαση του VEGFR2 μέσω του πρωτεασώματος αποτελεί ένα επιπρόσθετο επίπεδο ρύθμισης της μεταγωγής σήματος (110).

#### **α. VEGFR1**

Ο VEGFR1 υποδοχέας έχει ανασταλτικό ρόλο στην αγγειογένεση (111). Ο VEGFR1 αν και έχει μεγάλη συγγένεια προς τον VEGFA δεν έχει ισχυρή δράση κινάσης με αποτέλεσμα να ανταγωνίζεται τη δράση του VEGFR2 παγιδεύοντας τον VEGF. Ο VEGFR1 παίζει κρίσιμο ρόλο στην επιλογή φαινοτύπου “stalk” καθώς εξασθενεί την ανταπόκριση στα προ-μεταναστευτικά σήματα του VEGF (112). Επιπλέον εκφράζεται στα μονοκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στη μεσολάβηση της φλεγμονής.

#### **β. VEGFR2**

Ο VEGFR2 υποδοχέας είναι ο πιο μελετημένος υποδοχέας του VEGF και παίζει κρίσιμο ρόλο στην αγγειογένεση. Η πρόσδεση του VEGF πυροδοτεί την ενεργοποίηση σημαντικών μονοπατιών για τη βιολογία του ενδοθηλιακού κυττάρου (102, 113).

Καταρχήν προάγεται η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της φωσφοινοσιτιδικής 3-κινάσης (Phosphoinositide 3-kinase:PI3K) (114). Η ενεργοποίηση της PI3K έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση φωσφολιπιδίων PIP3 (Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Trisphosphate) στη μεμβράνη. Τα PIP3 αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες που κατέχουν περιοχές PH (Pleckstrin Homology) όπως η Akt/PKB και η PDK1. Η πρόσδεση στη μεμβράνη οδηγεί στην ενεργοποίηση της Akt από την PDK1. Η Akt με τη σειρά της προάγει την κυτταρική επιβίωση παρεμποδίζοντας την απόπτωση. Ενδεικτικά ορισμένες από τις δράσεις της Akt είναι η φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση των BAD και Caspase-9.

Επιπλέον η ενεργοποίηση του VEGFR2 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του Raf/MEK/ERK μονοπατιού (115). Η PLC- $\gamma$  προσδένεται στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του VEGFR2 και καταλύει την υδρόλυση του PIP2 (Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphate) σε IP3 (Inositol Trisphosphate) και DAG (Diacylglycerol). Το DAG με τη σειρά του ενεργοποιεί την PKC η οποία επάγει τον άξονα Raf/MEK/ERK. Από την άλλη η φωσφορυλίωση της SHC (Src homology 2 domain containing transforming protein 1) που προκύπτει από την ενεργοποίηση του VEGFR2 οδηγεί στο σχηματισμό συμπλεγμάτων SHC-GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein-2)-SOS που συντελούν στην ενεργοποίηση του Ras. Ο Ras με τη σειρά του διεγείρει το μονοπάτι της RAF/MEK/ERK (116).

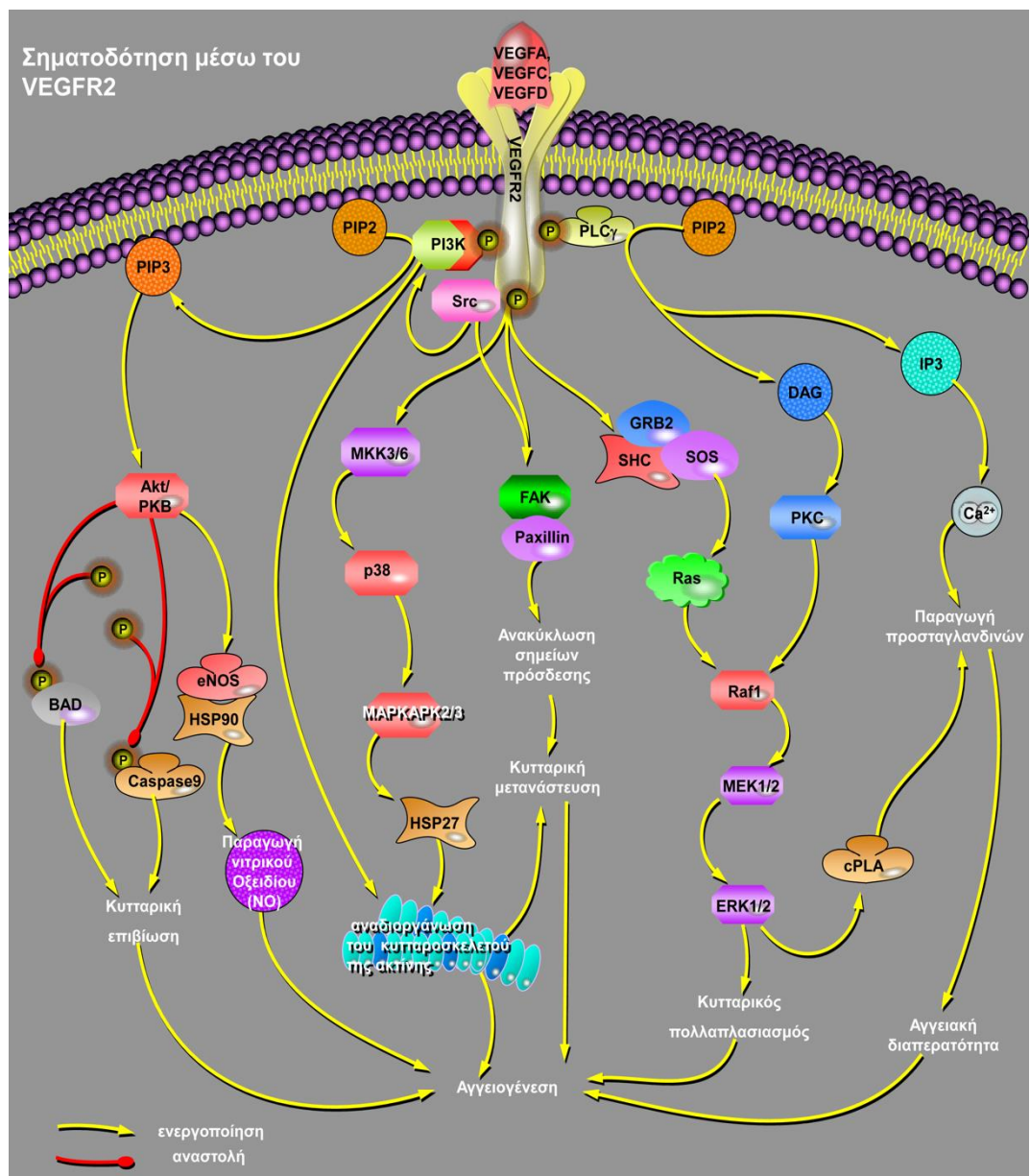
Επίσης ο VEGFR2 διευκολύνει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (117). Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα VEGFR2 οδηγεί στην ενεργοποίηση της p38 κινάσης μέσω της MKK3/6 (118) και πιθανώς μέσω της Cdc42 GTPase (119). Η p38 κινάση φωσφορυλιώνει τη MAPKAPK2/3 (MAP Kinase Activated Protein Kinase-2/3) που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την HSP27 (Heat Shock Protein-27) που ρυθμίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης και την παραγωγή ινιδίων του στρες (120). Επίσης η διέγερση του VEGFR2 οδηγεί στην ενεργοποίηση της FAK κινάσης (Focal Adhesion Kinase) και του υποστρώματος Paxillin μέσω της Src. Το αποτέλεσμα είναι η ανακύκλωση των σημείων πρόσδεσης των κυττάρων (Focal Adhesions) και η διευκόλυνση της μετανάστευσης (121, 122).

Τέλος η ενεργοποίηση του VEGFR2 οδηγεί σε αύξηση της τριχοειδικής διαπερατότητας. Κύριος μεσολαβητής της διαδικασίας αυτής είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) που παράγεται από την eNOS (endothelial NO Synthase) αφού ενεργοποιηθεί από την Akt (123). Η κινητοποίηση  $Ca^{2+}$  από τις ενδοκυττάρειες

αποθήκες επάγεται από το IP3 και οδηγεί στην παραγωγή NO και Ptg (προσταγλανδινών) με αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας (Εικ. 1.6) (123).

### γ. VEGFR3

Ο ρόλος του VEGFR3 στον ενήλικα περιορίζεται στο σχηματισμό λεμφαγγείων (124). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης συμμετέχει και στο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. Ο VEGFC και δευτερευόντως ο VEGFD είναι οι κύριοι τροφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη λεμφαγγειογένεση (125). Η ενεργοποίηση του VEGFR3 μέσω του VEGFC προάγει τη λεμφαγγειογένεση στον καρκίνο και τη λεμφική μετάσταση (126).



**Εικ.1.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF (τροποποιημένη εικόνα, ευγενής παραχώρηση της SABiosciences).** Διέγερση του VEGFR2 από προσδέτες της οικογένειας του VEGF, αυτοφωσφορυλίωση του VEGFR2, πρόσδεση δευτερογενών μεσολαβητών της σηματοδότησης και ενεργοποίηση των μονοπατιών, PI3K/Akt που προάγει την επιβίωση, RAF/MEK/ERK που προάγει τον πολλαπλασιασμό, p38/HSP27 και FAK/Paxillin που διευκολύνουν τη μετανάστευση. Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της αγγειογενετικής λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων.

#### 1.2.4.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch είναι κρίσιμο αναπτυξιακό μονοπάτι που προσδιορίζει τη μοίρα των κυττάρων κατά την οργανογένεση όπως αναλύθηκε εκτενώς από τον Artavanis-Tsakonas (127). Επιπλέον είναι ο κύριος συντονιστής της αγγειογένεσης του ενήλικα (128).

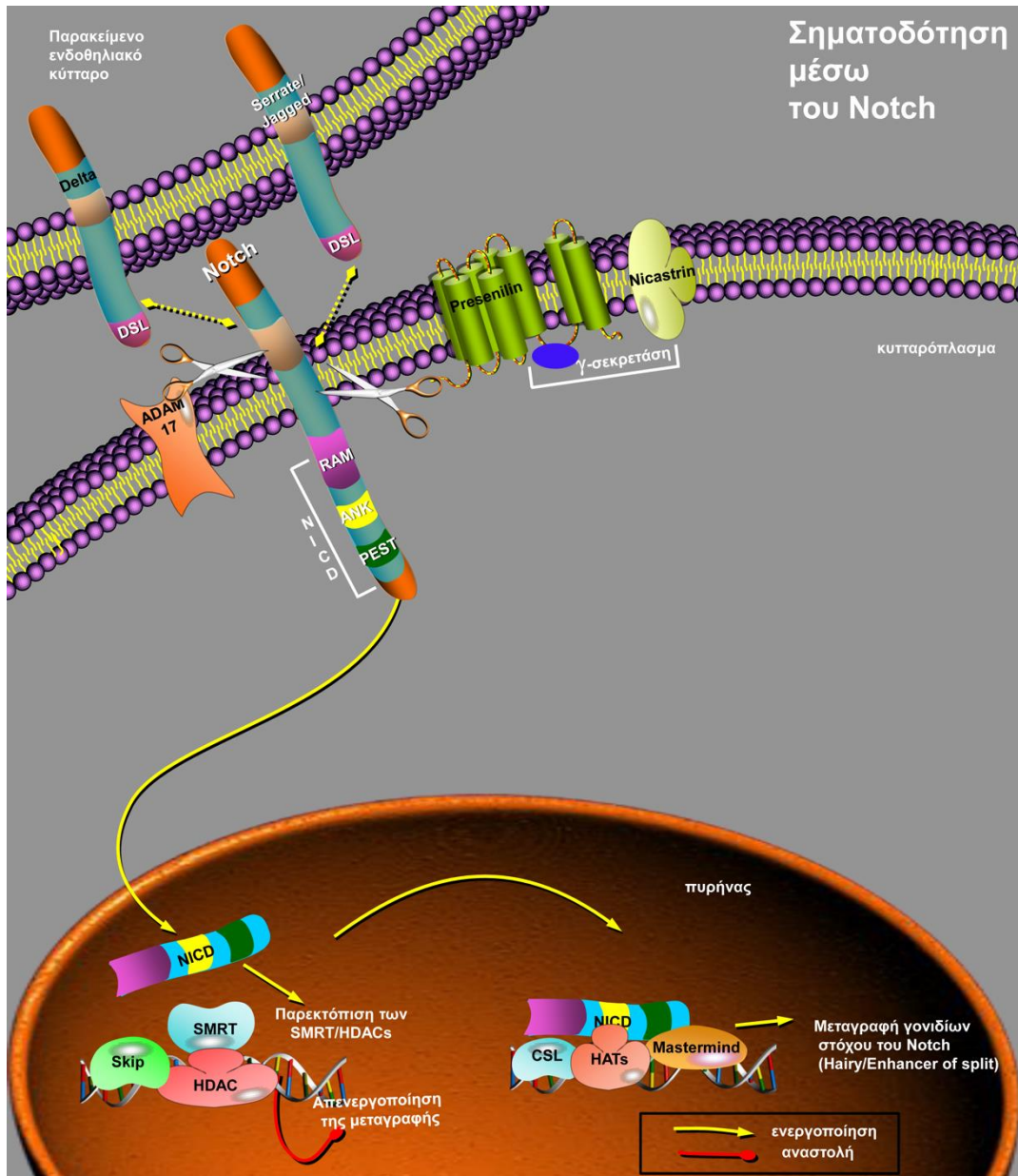
Υπάρχουν 4 συνολικά Notch πρωτεΐνες ( Notch1, Notch2, Notch3 και Notch4) οι οποίες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς μονής διέλευσης (single pass) (129). Ο Notch είναι ετερο-διμερές που αποτελείται από μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα ενωμένο μη ομοιοπολικά με ασβέστιο-εξαρτώμενο τρόπο με μικρότερο που συνίσταται στα εξής μέρη: ένα μικρό εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα μικρό ενδοκυττάριο (129). Ο Notch υποδοχέας ενεργοποιείται από τους προσδέτες της οικογένειας Serrate (Jagged1, Jagged2) και τους Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) που είναι επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (130). Οι εν λόγω πρωτεΐνες εκφράζονται σε παρακείμενα κύτταρα και διεγείρουν το Notch μέσω μηχανισμού “στενής επαφής” (juxtacrine signaling) (131).

Η σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα οδηγεί στη μεταβολή της διαμόρφωσης του Notch και ως αποτέλεσμα δύο πρωτεολυτικές διασπάσεις που συντελούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού (132). Η σύνδεση του προσδέτη οδηγεί στη δια-ενδοκυττάρωση (trans-endocytosis) του εξωκυττάρου τμήματός του Notch προς το κύτταρο που φέρει τον προσδέτη. Το αποτέλεσμα είναι η αποκάλυψη της πρωτεολυτικής θέσης S2 του Notch στην πρωτεάση ADAM (131) (a disintegrin and metalloprotease) και αποκοπή μέρους του εξωκυττάρου τμήματος. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί μία πρωτεολυτική διάσπαση στη θέση S3 στο διαμεμβρανικό τμήμα του Notch μέσω της γάμμα-σεκρετάσης. Το αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση του ενδοκυττάρου τομέα NICD (Notch intracellular domain) στο κυτταρόπλασμα.

Ο NICD στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα για να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων (Notch target genes) ασκώντας δράση μεταγραφικού παράγοντα. Ο

NICD φέρει: περιοχή NLS (Nuclear localization signal) που επιτρέπει την είσοδό του στον πυρήνα, τομέα RAM23 και τομέα με επαναλήψεις CDC10/Ankyrin (ANK) που συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CSL και τέλος τομέα πλούσιο σε προλίνη, γλουταμικό, σερίνη και θρεονίνη (PEST) (133). Ο NICD στον πυρήνα συνδέεται με Mastermind-like πρωτεΐνες και το μεταγραφικό παράγοντα CSL [RBPJ-kappa: Recombining binding protein suppressor of hairless]. Ο CSL είναι κανονικά συζευγμένος με αναστολείς της μεταγραφής (co-repressors) όπως η απο-ακετυλάση των ιστονών HDAC (Histone deacetylase). Η πρόσδεση όμως του NICD εκτοπίζει τους αναστολείς προς όφελος ενεργοποιητών (co-activators), όπως είναι η ακετυλάση των ιστονών HAT (Histone acetylase) γεγονός που συντελεί στην έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων της οικογένειας HES (hairy and enhancer of split) και των HES σχετιζόμενων γονιδίων (HEY, CHF, HRT, HESR). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τους bHLH (basic-helix-loop-helix) μεταγραφικούς παράγοντες που είναι οι βασικοί τελεστές της Notch σηματοδότησης. Ο Dll4 προσδέτης είναι επίσης γονίδιο στόχος του Notch (Εικ. 1.7).





**Εικ.1.7 Σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch (τροποποιημένη εικόνα, ευγενής παραχώρηση της SABiosciences).** Η διέγερση του Notch από προσδέτες της οικογένειας Delta Like ή Serrate/Jagged που εκφράζονται στο γειτονικό ενδοθηλιακό κύτταρο οδηγεί σε δύο διαδοχικές πρωτεολυτικές διασπάσεις του υποδοχέα από την ADAM17 και γ-σεκρετάση αντίστοιχα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του NICD και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχου του Notch.

### **1.2.4.3 Θεωρία της αγγειογένεσης με εκβλάστηση: Οδηγό ενδοθηλιακό κύτταρο (tip cell), ενδοθηλιακό κύτταρο μίσχου (stalk cell) και ενδοθηλιακό κύτταρο φάλαγγας (phalanx cell)**

Η αγγειογένεση με εκβλάστηση είναι σύνθετη διαδικασία που απαιτεί συντονισμό της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο Notch επιτελεί το ρόλο του κύριου ρυθμιστή (134).

Συγκεκριμένα τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν δύο διακριτούς φαινοτύπους, το φαινότυπο του οδηγού κυττάρου (tip cell) και το φαινότυπο του κυττάρου μίσχου (stalk cell) (135). Τα tip cells εκτείνουν φιλοπόδια που δρουν ως αισθητήρες του VEGFA. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν χωρίς να πολλαπλασιάζονται και καθοδηγούν το νεοσχηματιζόμενο αγγείο προς τις περιοχές έκκρισης αγγειογενετικών παραγόντων (96, 136). Από την άλλη τα stalk cells είναι ακίνητα και πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας τον κορμό του αγγείου πάνω στον οποίο θα δημιουργηθεί ο νέος αυλός (96). Ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων εξαρτάται αποκλειστικά από τη συγκέντρωση VEGFA εν αντιθέσει με τη μετανάστευση της οποίας η κατεύθυνση καθορίζεται από τη βαθμίδωση (gradient) της συγκέντρωσης του VEGF στο χώρο (96).

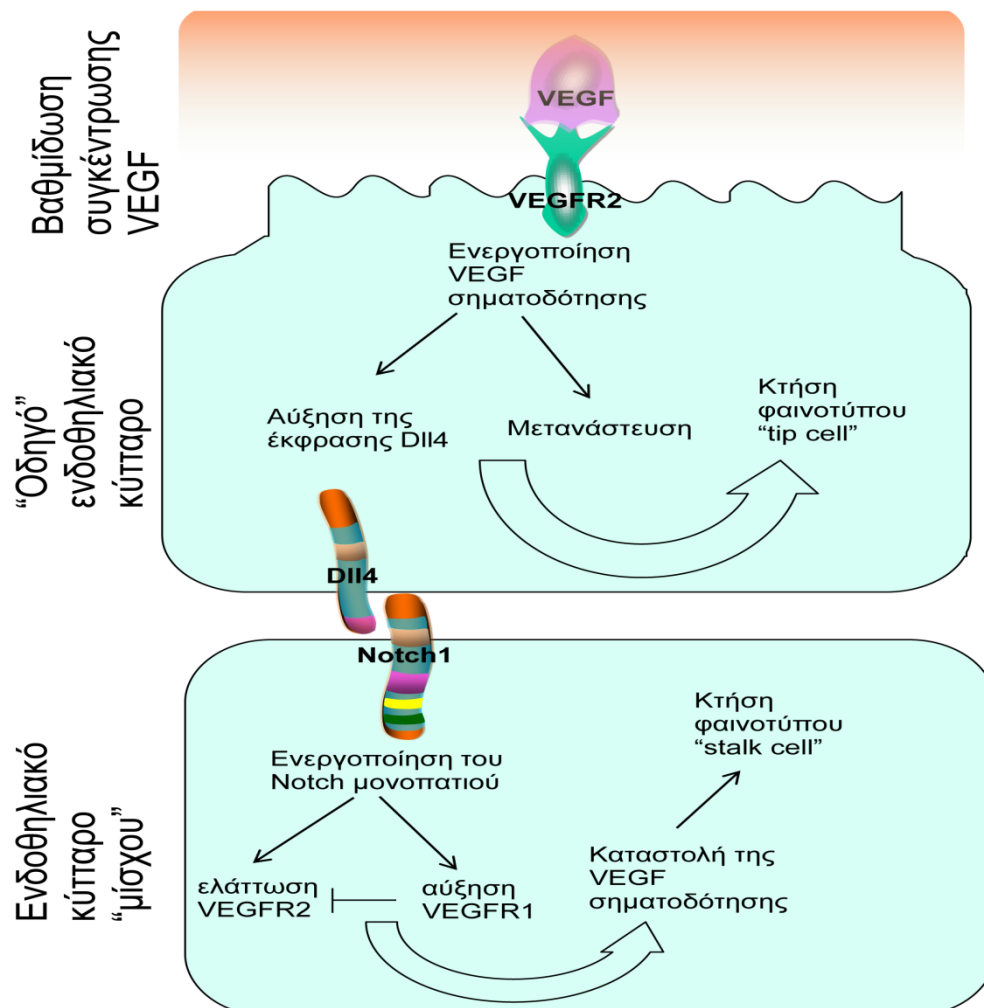
Τα μονοπάτια του VEGF και Notch παρεμβάλλονται μεταξύ τους (cross talk) και η συντονισμένη λειτουργία προσδιορίζει τη μοίρα του ενδοθηλιακού κυττάρου (134). Ο VEGFA επάγει την έκφραση του προσδέτη του Notch Dll4 (137, 138). Από την άλλη ο Notch καταστέλλει την έκφραση του VEGFR2 μέσω αύξησης των επιπέδων του HEY1 (139-141) και μείωσης της έκφρασης του NRP1 (142), ενώ ταυτόχρονα επάγει τον υποδοχέα VEGFR1 που ανταγωνίζεται τη δράση του VEGFR2 (143). Συνεπώς η αγγειογένεση με εκβλάστηση στηρίζεται στο εξής μοντέλο (135): Ο VEGFA ενεργοποιεί τη μετανάστευση του ενδοθηλιακού κυττάρου προς την κατεύθυνση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση VEGF προσδίδοντας φαινότυπο “tip cell” (144), ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την έκφραση Dll4 στο ίδιο κύτταρο με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στο παρακείμενο ενδοθηλιακό. Η ενεργοποίηση του Notch στο γειτονικό ενδοθηλιακό κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα το χαμηλό λόγο VEGFR2/VEGFR1, την απώλεια ευαισθησίας στον VEGFA και την κτήση φαινοτύπου “stalk cell” (Εικ. 1.8).

Ο φαινότυπος “tip cell” είναι παροδικός και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανταγωνίζονται για αυτό το ρόλο (145). Ωστόσο δεν πρόκειται για αγώνα δρόμου όπως επισημαίνεται από την ομάδα του Gerhardt (135). Μικρές στοχαστικές διακυμάνσεις των επιπέδων VEGF στο χώρο και του υποδοχέα VEGFR2 δίνουν πλεονέκτημα σε ορισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα να αποκτήσουν φαινότυπο “tip cell” ενώ την ίδια στιγμή η Notch σηματοδότηση μέσω στενής επαφής καταστέλλει τα

επίπεδα του VEGFR2 (135). Συνεπώς, πρόκειται για μία δυναμική διαδικασία όπου τα κύτταρα είναι σε μια διαρκή εναλλαγή (flux) μεταξύ των δύο φαινοτύπων (146). Αυτή η κατάσταση ενδεχομένως εξηγεί και το παράδοξο του πολλαπλασιασμού των stalk κυττάρων τη στιγμή που το μονοπάτι του Notch είναι ενεργοποιημένο (146). Σημαντικό ρόλο στην καταστολή της Notch σηματοδότησης σε αυτές τις περιπτώσεις πιθανώς παίζει ο SIRT που είναι μια απο-ακετυλάση που επάγει τον καταβολισμό του NICD έπειτα από ταχεία ενεργοποίηση του μονοπατιού (147).

Με το σχηματισμό της αγγειακής εκβλάστησης τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταπίπτουν σε αδράνεια και αποκτούν φαινότυπο κυττάρων φάλαγγας. Η ονομασία αυτή προκύπτει από την προσομοίωση του ενδοθηλιακού σωλήνα στον ομώνυμο συμπαγή στρατιωτικό σχηματισμό των αρχαίων μακεδόνων. Τα κύτταρα φάλαγγας δεν πολλαπλασιάζονται ούτε μεταναστεύουν, παραμένουν ακίνητα με ισχυρές προσδέσεις, διαθέτουν αυλό και διατηρούν την ακεραιότητα του αγγείου (148).

## Αγγειογένεση με εκβλάστηση προσδιορισμός φαινοτύπου “tip cell” - “stalk cell”



**Εικ. 1.8 Προσδιορισμός φαινοτύπου “tip cell”-“stalk cell”.** Ενεργοποίηση του μονοπατιού του VEGF και μετανάστευση του ενδοθηλιακού κυττάρου προς τη βαθμίδωση συγκέντρωσης του VEGF με αποτέλεσμα την κτήση φαινοτύπου “tip”. Παράλληλα αύξηση της έκφρασης του DLL4 στο ίδιο κύτταρο με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στο παρακείμενο ενδοθηλιακό το οποίο αποκτά φαινότυπο “stalk” μέσω καταστολής του μονοπατιού του VEGF.

## **1.2.5 Θεραπευτικοί χειρισμοί έναντι της αγγειογένεσης**

### **1.2.5.1 Αναστολείς των εκκρινόμενων προ-αγγειογενετικών παραγόντων**

Εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF Bevacizumab (BVZ) με την εμπορική ονομασία Avastin®. Το BVZ δεσμεύει τον εκκρινόμενο από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και κύτταρα του στρώματος VEGF-A. Το BVZ είναι ο πρώτος αναστολέας της αγγειογένεσης που εγκρίθηκε από τον FDA έχοντας ένδειξη για το μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία (149). Επίσης πλέον χορηγείται στον καρκίνο του πνεύμονα σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (150), στο μεταστατικό νεφροκυτταρικό καρκίνο σε συνδυασμό με ιντερφερόνη-α (151), στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ως μονοθεραπεία (152), ενώ πρόσφατα δόθηκε έγκριση για τον προχωρημένο ωθητικό καρκίνο (153). Έχει διαπιστωθεί ότι το BVZ δρα συνεργιστικά με τη χημειοθεραπεία σε προ-κλινικά μοντέλα (154) και παρατείνει το χρόνο ελεύθερο πρόοδου νόσου (progression-free survival: PFS) σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία (149-152). Μία επιπρόσθετη δράση του BVZ είναι η κανονικοποίηση του διαταραγμένου αγγειακού δικτύου των όγκων με αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (155).

### **1.2.5.2 Αναστολείς τυροσινικών κινασών**

Σε αυτή την κατηγορία υπάγονται χαμηλού μοριακού βάρους μόρια (small molecules) που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να αναστέλλουν τις τυροσινικές κινάσες των υποδοχέων της αγγειογένεσης (156). Χαρακτηριστικό της δράσης τους είναι η αναστολή της πρόσδεσης του ATP (Adenosine triphosphate) στο ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων με αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης τους (157).

Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Η κατηγορία I αφορά σε αναστολείς που αναγνωρίζουν την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης και προσδένονται ανταγωνιστικά

στη θέση δέσμευσης του ATP (158). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το sunitinib, που ανταγωνίζεται το ATP στους υποδοχείς VEGFR και PDGFR, όπως επίσης στους FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3), CSF-1R (colony stimulating factor-1 receptor), RET και KIT(CD117) (159).

Στην κατηγορία II ανήκουν μόρια που αναγνωρίζουν την ανενεργή διαμόρφωση του υποδοχέα (158). Οι αναστολείς αυτής της κατηγορίας προσδένονται στον υδροφοβικό «θύλακα» που γεινιάζει με τις θέσεις πρόσδεσης του ATP ασκώντας «έμμεση» αναστολή. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το sorafenib (Nexavar®) που αναστέλλει τους VEGFR, PDGFR και την ενδοκυττάρια κινάση σερίνης/θρεονίνης Raf.

Τέλος στην κατηγορία III ανήκουν αναστολείς που προσδένονται ομοιοπολικά με αμινοξέα κυστεΐνης στην περιοχή πρόσδεσης του ATP (158). Οι αναστολείς αυτού του τύπου ανταγωνίζονται το ATP με μη αναστρέψιμο τρόπο. Εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το vandetanib (Caprelsa®) που αναστέλλει τους VEGFR και EGFR.

Το sunitinib και το sorafenib είναι οι πιο ευρέως χορηγούμενοι RTKIs. Το sunitinib έχει ένδειξη στο μεταστατικό νεφροκυτταρικό καρκίνο, καθώς αυξάνει τόσο τη συνολική επιβίωση (26.4 έναντι 21.8 μηνών) όσο και το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (11 έναντι 5 μηνών) συγκρινόμενο με την ιντερφερόνη άλφα. Επιπλέον έχει ένδειξη σε όγκους GIST (Gastro-Intestinal Stromal Tumors) ανθεκτικούς στο imatinib λόγω της ανασταλτικής του δράσης στο μεταλλαγμένο cKIT, ενώ επίσης έχει λάβει έγκριση για νευροενδοκρινείς όγκους του παγκρέατος. Από την άλλη το sorafenib έχει ένδειξη στον ανεγχείρητο ηπατοκυτταρικό καρκίνο, καθώς συντελεί στην αύξηση της ολικής επιβίωσης (10.7 έναντι 7.9 μηνών) και του διάμεσου χρόνου μέχρι την ακτινολογική πρόοδο της νόσου (5.5 έναντι 2.8 μηνών) συγκρινόμενο με το εικονικό φάρμακο (placebo). Το sunitinib και το sorafenib έχουν διπλή δράση. Αναστέλλουν τόσο την αγγειογένεση όσο και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ μοιράζονται κοινό προφίλ παρενεργειών.

### **1.2.5.3 Αναστολείς κατώτερων τελεστών (downstream effectors) της σηματοδότησης**

Η πρωτεΐνη του mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) είναι μία κινάση σερίνης-θρεονίνης που συνιστά την καταλυτική υπομονάδα δύο διακριτών συμπλεγμάτων, του mTORC1 (mTOR complex 1) και mTORC2 (mTOR complex 2) (161). Ο mTOR ρυθμίζεται από το μονοπάτι της PI3K/AKT και ελέγχει λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός, η πρωτεϊνική σύνθεση και η αυτοφαγία. Επίσης διαδραματίζει

ρόλο στην αγγειογένεση ρυθμίζοντας τη μετάφραση του HIF μέσω της S6 κινάσης και του υποστρώματός της, S6 ριβοσωμιακή πρωτεΐνη. Συνεπώς οι αναστολείς του mTOR καταστέλλουν την επαγόμενη από την υποξία έκφραση του VEGFA. Αντιπροσωπευτικοί αναστολείς είναι τα ανάλογα ραπαμυκίνης, temsirolimus και everolimus.

### **1.2.6 Αντίσταση στις αντιαγγειογενετικές θεραπείες**

Η εισαγωγή των αντιαγγειογενετικών φαρμάκων στη θεραπευτική του καρκίνου γέννησε ελπίδες στον αγώνα για την αντιμετώπιση της αντίστασης στα κυτταροτοξικά φάρμακα. Αυτό γιατί το αντισυμβατικό αποτέλεσμα των αντιαγγειογενετικών φαρμάκων είναι έμμεσο και το ενδοθηλιακό κύτταρο, ο άμεσος στόχος της θεραπείας έχει περιορισμένες δυνατότητες εξαλλαγής και ανάπτυξης αντίστασης (1). Ωστόσο η κλινική πράξη έδειξε ότι ακόμη και σε αυτή την περίπτωση η αντίσταση είναι αναπόφευκτη. Μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθής (intrinsic resistance) με τους όγκους να μην ανταποκρίνονται εξ' αρχής, είτε επίκτητη (acquired resistance) με ανάπτυξη μηχανισμών διαφυγής μετά από παροδική ανταπόκριση (162). Έχουν προταθεί οι εξής μηχανισμοί:

#### **1.2.6.1 Υπερδραστηριότητα εναλλακτικών μονοπατιών αγγειογένεσης**

Ο VEGF είναι ο βασικός παράγοντας που διεγείρει την αγγειογένεση, ωστόσο επιπρόσθετα μονοπάτια δύνανται να ενεργοποιηθούν (163). Μεταξύ αυτών οι angiopoietins (ANGs) (164), ο FGF (165), ο transforming growth factor (TGF) (166) και ο placental growth factor (PlGF). Επίσης το μονοπάτι του Notch φαίνεται να παίζει ρόλο στην αντίσταση καθώς η ενεργοποίησή του μειώνει την ευαισθησία του ενδοθηλίου στη δράση των αντι-VEGF παραγόντων και οδηγεί στη δημιουργία λιγότερων μεν αλλά μεγαλύτερου εύρους αγγείων που προσφέρουν καλύτερη αιμάτωση σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου (167). Εξ άλλου, η interleukin-8 (IL-8) είναι μια κυτταροκίνη που διεγείρει την αγγειογένεση (168) και δρα αντισταθμιστικά στην καταστολή των HIF εξαρτώμενων αγγειογενετικών παραγόντων σε προκλινικά μοντέλα παχέος εντέρου (169). Επίσης η IL-8 παίζει ρόλο στην αντίσταση στο sunitinib σε προκλινικά μοντέλα νεφροκυτταρικού καρκίνου (170). Συνεπώς η αναστολή ενός μονοπατιού φαίνεται να αντιρροπείται από την ενεργοποίηση εναλλακτικών μονοπατιών αγγειογένεσης.

### **1.2.6.2 Εναλλακτικοί μηχανισμοί αγγειογένεσης**

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί η αγγειογένεση με εκβλάστηση είναι ο βασικός μηχανισμός αγγειογένεσης στον ενήλικα, ωστόσο έχουν περιγραφεί επιπρόσθετοι μηχανισμοί ανθεκτικοί στις αντι-VEGF θεραπείες.

#### **α. Αγγειογένεση με εγκολεασμό (intussusceptive angiogenesis)**

Σε αυτή την περίπτωση το νέο αγγείο προκύπτει από διχοτόμηση ενός προϋπάρχοντος (171). Η αγγειογένεση με εγκολεασμό δεν απαιτεί πολλαπλασιασμό, αλλά μετανάστευση και remodeling των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ είναι μία σύντομη διαδικασία που διαρκεί από λίγα λεπτά έως ώρες. Εν ολίγοις διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις. Αρχικά, ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται αντικριστά έρχονται σε επαφή για να δημιουργήσουν ένα στύλο εντός του αυλού. Στη συνέχεια οι συνδέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων που είναι σε επαφή αναδιοργανώνονται με αποτέλεσμα τη διάτρηση του στρώματος μεταξύ των δύο κυττάρων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στην τρίτη φάση τη διαδικασία, την εισδοχή περικυττάρων και κυττάρων στρώματος να εναποθέσουν εξωκυττάρια ουσία. Τέλος το μόρφωμα εντός του προϋπάρχοντος αγγείου διαχωρίζεται δίνοντας γένεση σε δύο νέα αγγεία. Η αγγειογένεση με εγκολεασμό πιθανώς δεν προϋποθέτει την παρουσία VEGF με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα και επί αναστολής του (172, 173). Ωστόσο δεν είναι τελείως ξεκάθαρο ποια μονοπάτια εμπλέκονται στο μηχανισμό με αποτέλεσμα ο ρόλος του VEGF να τελεί προς το παρόν αμφισβητήσιμος (174).

#### **β. Ενδοθηλιακή προσομοίωση καρκινικών κυττάρων (vasculogenic mimicry)**

Σε αυτή την περίπτωση το καρκινικό κύτταρο υποκαθιστά το ρόλο του ενδοθηλιακού. Πρώτοι οι Maniatis και συνεργάτες περιέγραψαν το 1999 επιθετικά μεταστατικά κύτταρα μελανώματος να σχηματίζουν τριχοειδικούς σχηματισμούς που μεταφέρουν αίμα χωρίς την ανάγκη της υποστήριξης των ενδοθηλιακών (175). Ακολούθησαν επιπλέον ομάδες που μελέτησαν το ίδιο φαινόμενο και διαπίστωσαν ότι τα εν λόγω τριχοειδή συνδέονται με τη φυσιολογική μικροκυκλοφορία (176). Η ενδοθηλιακή προσομοίωση επιτάσσει την αποδιαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων (175). Ωστόσο αν και τα κύτταρα αυτά μιμούνται τα ενδοθηλιακά δεν είναι ευαίσθητα στους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες συμβάλλοντας έτσι στην αντίσταση στις αντι-VEGF θεραπείες (177).

#### **γ. Υποκλοπή της κυκλοφορίας των αγγείων του φυσιολογικού ιστού (vessel co-option)**

Σε αυτή την περίπτωση οι όγκοι τροφοδοτούνται με οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία χωρίς τη μεσολάβηση της αγγειογένεσης (178). Τα καρκινικά κύτταρα

δηθούν το όργανο που φιλοξενεί τον όγκο και αναπτύσσονται κατά μήκος των αγγείων του φυσιολογικού ιστού (178). Αυτή η μέθοδος αξιοποιείται κυρίως στους όγκους οργάνων με πλούσια αιμάτωση όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ και ο πνεύμονας (179). Η λειτουργία του vessel co-option δεν αναστέλλεται από τις αντι-VEGF θεραπείες οι οποίες απεναντίας την πυροδοτούν (179, 180).

#### **δ. De novo αγγειογένεση (vasculogenesis)**

Σε αυτή την περίπτωση τα νεόπλαστα αγγεία σχηματίζονται από προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα EPCs (Endothelial Progenitor Cells), αντί από προϋπάρχοντα αγγεία (181). Η de novo αγγειογένεση είναι ο βασικός μηχανισμός δημιουργίας νέων αγγείων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ωστόσο παίζει ρόλο στην αγγειογένεση στον ενήλικα κατά την ισχαιμία και την ιστική επούλωση (182). Η υποξία επάγει με HIF-εξαρτώμενο τρόπο την έκφραση χημειοτακτικών παραγόντων όπως ο Stromal Derived Factor (SDF)-1 που προσελκύει Bone Marrow Derived Cells (BMDCs) από το μυελό των οστών (183). Μεταξύ των κυττάρων που επιστρατεύονται είναι ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα που είτε εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες είτε διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά σχηματίζοντας τον αυλό των νεόπλαστων αγγείων. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι αν και τα EPCs συμβάλουν στην αντίσταση στις αντι-VEGF θεραπείες (162, 184) η μετρονομική χημειοθεραπεία από την άλλη τα καταστέλει (15-17).

#### **1.2.6.3 Αύξηση του μεταστατικού δυναμικού και της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων**

Οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες φαίνεται πως μπορούν σε συγκεκριμένες συνθήκες να διεγείρουν τη μεταστατική διαδικασία. Πρώτοι οι Paez-Ribes και συνεργάτες (185) καθώς και οι Ebos και συνεργάτες από την ομάδα του Kerbel (186) έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόζονται στις αντίξοες συνθήκες που αναπτύσσονται μετά την καταστολή της αγγειογένεσης μέσω της απόκτησης ενός διηθητικού φαινοτύπου που έχει ως αποτέλεσμα τη μετάσταση σε απομακρυσμένα σημεία. Το φαινόμενο αυτό εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου καθώς επίσης τον τύπο και τη δοσολογία του φαρμάκου που χρησιμοποιείται (187, 188). Επιπλέον η ιδιότητα κάποιων αναστολέων τυροσινικής κινάσης να αναστέλλουν τον PDGFR έχει ως συνέπεια τη διατάραξη της λειτουργίας του περικυττάρου το οποίο διαφυλάττει την ακεραιότητα των αγγείων με αποτέλεσμα την εξαγγείωση μεταστατικών καρκινικών κυττάρων (187-189). Από την άλλη η υποξία που επάγεται από τις αντιαγγειογενετικές θεραπείες ενεργοποιεί τη μετατροπή του επιθηλιακού



φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων σε μεσεγχυματικό (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) μία διαδικασία απαραίτητη για τη δημιουργία μεταστάσεων (190).

#### **1.2.6.4 Ο ρόλος των κυττάρων του στρώματος**

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα περικύτταρα (pericytes) (191) και οι ινοβλάστες CAFs (cancer associated fibroblasts) (192). Τα περικύτταρα εκκρίνουν παράγοντες που προάγουν την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και μειώνουν την ευαισθησία στους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες. Από την άλλη οι CAFs εκκρίνουν παράγοντες όπως ο EGF, ο HGF, ο insulin-like growth factor, ο FGF και ο SDF1 που προάγουν την αγγειογένεση.

#### **1.2.6.5 Ο ρόλος των Bone Marrow Derived Cells (BMDCs)**

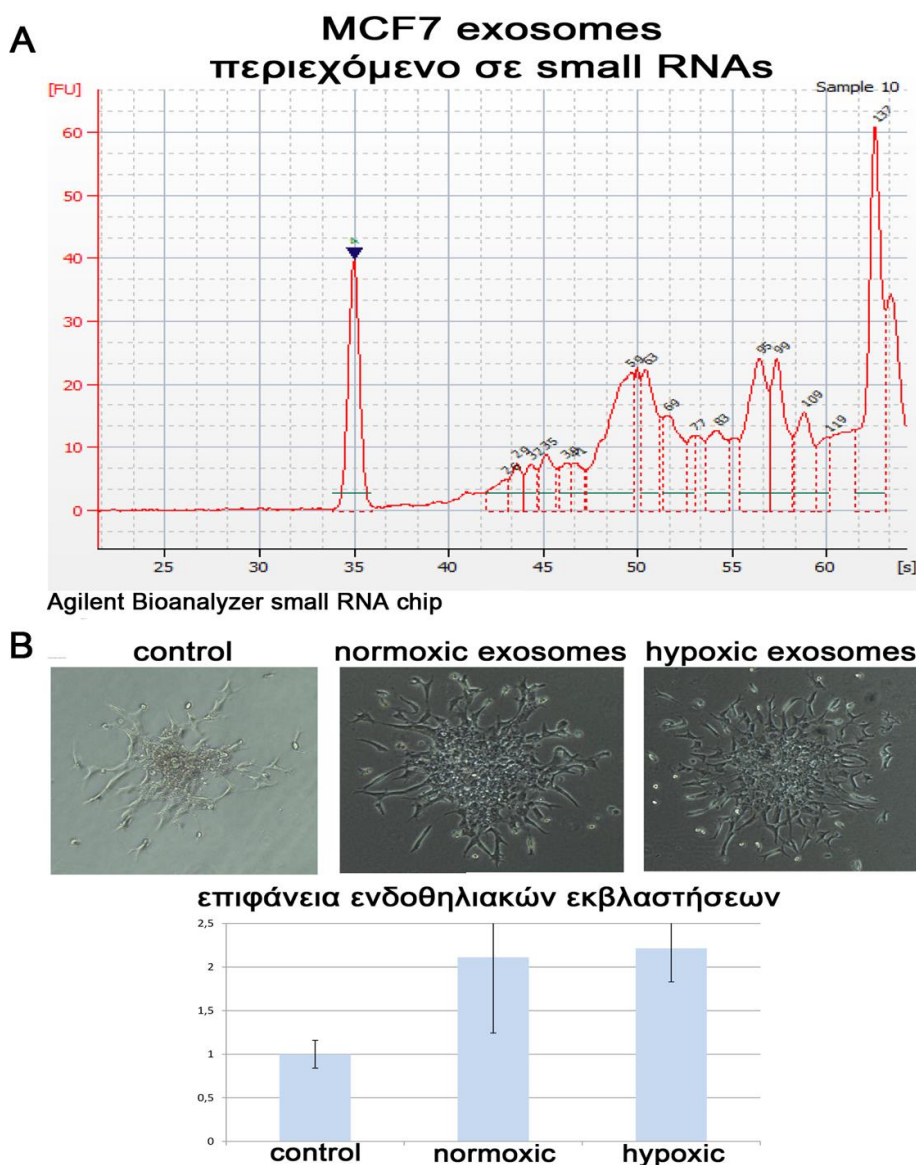
Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν αφενός τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται και σχηματίζουν de novo νέα αγγεία ή εκκρίνουν προαγγειογενετικούς παράγοντες (193) και αφετέρου τα myeloid cells που προσελκύονται στους όγκους από τον G-CSF και εκκρίνουν αγγειογενετικές κυτταροκίνες (194).

#### **1.2.6.6 Η επίδραση των μικροκυστιδίων exosomes στην αγγειογένεση**

Εκτός από τις αγγειογενετικές πρωτεΐνες επιπρόσθετοι μοριακοί παράγοντες δύνανται να ενεργοποιήσουν την αγγειογένεση. Αναγνωρισμένος είναι πλέον ο ρόλος των exosomes ως μεσολαβητών της αγγειογένεσης και της μετάστασης σε προκλινικά πειραματικά μοντέλα (195, 196). Τα exosomes είναι μικροκυστίδια ενδοσωμιακής προέλευσης με μέγεθος της τάξης των 30-100 nM τα οποία εκκρίνονται από το κύτταρο, περιβάλλονται από λιπιδική μεμβράνη και περιέχουν πρωτεΐνες, mRNA, microRNAs, long noncoding RNAs και DNA και μεταφέρουν σήματα στα κύτταρα που τα προσλαμβάνουν (197). Εκτός από το βιολογικό τους ρόλο έχει αναγνωριστεί η σημασία τους ως βιοδείκτες στη διάγνωση και πρόγνωση ασθενειών (198, 199).

Exosomes που εκκρίνονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, καρκινικά κύτταρα και κύτταρα του στρώματος του όγκου ασκούν ρυθμιστικό ρόλο σε λειτουργίες της αγγειογένεσης σε πειραματικά μοντέλα (200). Τα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7

εκκρίνουν exosomes εμπλουτισμένα σε microRNAs τα οποία διεγείρουν την αγγειογενετική εκβλάστηση όπως προκύπτει από προσωπικές αδημοσίευτες παρατηρήσεις (Εικ.1.9). Ωστόσο τα exosomes δεν αποτελούν προς το παρόν φαρμακευτικό στόχο. Ως εκ τούτου οι σημερινές αντιαγγειογενετικές θεραπείες αποτυγχάνουν να καταστείλουν την exosomes-επαγόμενη αγγειογένεση με αποτέλεσμα οι όγκοι να διαφεύγουν των αντί-VEGF θεραπειών μέσω και αυτού του μηχανισμού (201). Από την άλλη η μετρονομική χημειοθεραπεία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς να επιδρά σε κάποιο ειδικό μονοπάτι της αγγειογένεσης και αποτελεί δυνητικό όπλο για την καταστολή της exosomes-επαγόμενης αγγειογένεσης.



**Εικ.1.9 Exosomes από MCF7.** A. Η σύσταση των exosomes σε small RNAs. B. Η επίδραση των exosomes από νορμοξικά και υποξικά κύτταρα στην αγγειογένεση με εκβλάστηση (αδημοσίευτα αποτελέσματα, προσωπικό αρχείο).

### **1.2.6.7 Η επαγόμενη από την αντιαγγειογενετική θεραπεία υποξία**

Οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες επάγουν ή επιδεινώνουν την υπάρχουσα υποξία (202, 203). Η υποξία με τη σειρά της πυροδοτεί την ανάπτυξη αντίστασης μέσω ενεργοποίησης εναλλακτικών μονοπατιών αγγειογένεσης και συμβάλει στην επιστράτευση BMDCs (Bone Marrow Derived Cells) τα οποία εκκρίνουν αγγειογενετικές κυτταροκίνες. Επιπλέον δημιουργεί ένα εχθρικό περιβάλλον που συντελεί στη φυσική επιλογή ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων και στην ενεργοποίηση μονοπατιών της μετάστασης (204). Ως εκ τούτου φαίνεται πως είναι ο ενορχηστρωτής των μηχανισμών αντίστασης και αποτελεί πρωταρχικό θεραπευτικό στόχο.

## 1.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

### 1.3.1 Εξωγενές και ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι

Η απόπτωση αποτελεί έναν προγραμματισμένο τύπο κυτταρικού θανάτου (τύπος I) που οδηγεί σε χαρακτηριστικές μορφολογικές μεταβολές όπως περιγράφηκαν από τον Kerr το 1972 (205). Χαρακτηρίζεται από σμίκρυνση των κυττάρων λόγω της αποδόμησης του κυτταρικού σκελετού και συμπύκνωση του πυρήνα (pyknosis) με ταυτόχρονη διατήρηση της ακεραιότητας των κυτταρικών οργανιδίων. Ακολουθεί κατακερματισμός της χρωματίνης και διάσπαση του πυρήνα (καρυόρρηξη) καταλήγοντας στη δημιουργία εκβλαστήσεων στην κυτταρική μεμβράνη (budding) και σχηματισμό χαρακτηριστικών αποπτωτικών σωματίων που περιέχουν πακεταρισμένα τα οργανίδια του κυττάρου και κομμάτια χρωματίνης. Τα αποπτωτικά σωματίδια αποτελούν χαρακτηριστικό μορφολογικό γνώρισμα της απόπτωσης και απομακρύνονται από τα μακροφάγα χωρίς να προκαλείται φλεγμονή. Ένας επιπλέον τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι η αυτοφαγία (τύπος II) (206) κατά την οποία τα συστατικά μέρη του κυτταροπλάσματος αποδομούνται μέσω σύντηξης με λυσοσώματα (207). Ωστόσο η αυτοφαγία λειτουργεί και ως μηχανισμός άμυνας στο στρες όπως στην περίπτωση της αποστέρησης θρεπτικών συστατικών δίνοντας τη δυνατότητα στο κύτταρο να παράγει ενέργεια (207). Στον αντίποδα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι η νέκρωση. Η νέκρωση αποτελεί μηχανισμό κυτταρικού θανάτου που δεν απαιτεί ATP και δεν υπόκειται στην αυστηρή μοριακή ρύθμιση της απόπτωσης (206). Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από οίδημα του πυρήνα και του κυττάρου (oncosis), ρήξη των κυτταρικών οργανιδίων, λύση και απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου και φλεγμονώδη αντίδραση.

Υπάρχουν δύο μονοπάτια απόπτωσης: το εξωγενές και το ενδογενές μιτοχονδριακό (Εικ. 1.11) (208). Το εξωγενές μεσολαβείται από τους υποδοχείς θανάτου της υπερ-οικογένειας υποδοχέων TNF (Tumor Necrosis Factor). Οι υποδοχείς αυτοί διεγείρονται από τους προσδέτες: TNF, Fas και TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Η πρόσδεση των αγωνιστών αυτών οδηγεί στον τριμερισμό των ανωτέρω υποδοχέων. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη προσαρμογέας Fas-associated death domain (FADD) συνδέεται στο death domain του ενδοκυττάρου τμήματος του ενεργοποιημένου υποδοχέα. Ο FADD με τη σειρά του αλληλεπιδρά με την προκασπάση 8 μέσω του death effector domain του συντελώντας στο σχηματισμό του συμπλέγματος επαγωγής θανάτου (Death Inducing Signaling Complex:DISC). Το DISC φέρει τις προκασπάσες σε επαφή μεταξύ τους με

αποτέλεσμα την αυτοκαταλυτική διάσπαση τους και την ενεργοποίηση της απόπτωσης.

Από την άλλη το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποιείται από σήματα στρες, όπως βλάβες του DNA, UV ακτινοβολία, κυτταροτοξικά φάρμακα, υποξία και δραστικές μορφές οξυγόνου (209). Κύριοι ρυθμιστές της διαδικασίας αυτής είναι μέλη της οικογένειας B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) στην οποία ανήκουν πρωτεΐνες τόσο με προ-αποπτωτική όσο και με αντί-αποπτωτική δράση (210). Όταν υπερισχύει η δράση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών τότε προκαλείται διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial outer membrane permeabilisation) (211) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος C και άλλων αποπτογόνων πρωτεϊνών όπως οι SMAC/DIABLO, Omi/HtrA2 και AIF. Το κυτόχρωμα C συνδέεται με την πρωτεΐνη προσαρμογέα Araf συντελώντας στο σχηματισμό του αποπτωσώματος (212). Το αποπτώσωμα ενεργοποιεί την κασπάση 9 που με τη σειρά της ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες 3 και 7.

Το εξωγενές μονοπάτι και το ενδογενές μονοπάτι συγκλίνουν (213). Αυτό γίνεται μέσω του BID μια προ-αποπτωτική Bcl-2 πρωτεΐνη (214). Η κασπάση 8 καταλύει τη διάσπαση του BID σε truncated BID (tBID) ο οποίος στη συνέχεια μεταπηδά στο μιτοχόνδριο για να διευκολύνει τη διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Η διάτρηση της μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Δ.Μ.Μ) είναι βασικό προ-απαιτούμενο για την πρόκληση απόπτωσης (215). Αυτή συμβαίνει είτε με τη δημιουργία πόρου Bax/Bak (42) είτε με το σχηματισμό «διαπερατού πόρου μετάπτωσης» MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) (216, 217). Ο σχηματισμός “πόρου” αποτελεί το σημείο δίχως επιστροφή για το κύτταρο προκαλώντας αναπόφευκτα το θάνατο λόγω της εξόδου κυτοχρώματος C και άλλων αποπτογόνων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα.

Στην πρώτη περίπτωση η διαδικασία ρυθμίζεται από πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (218). Η ταξινόμηση γίνεται βάσει του ρόλου τους (αντί-αποπτωτικός ή προ-αποπτωτικός) και της παρουσίας BCL-2 Homology τομέων (BH1-BH4) (219). Οι αντί-αποπτωτικές Bcl-2, Bcl-xl και MCL-1 (myeloid cell leukemia 1) διατηρούν και τους τέσσερεις BH1-BH4 τομείς, οι προ-αποπτωτικές Bax (BCL-2-associated x protein) και Bak (BCL-2 antagonist killer 1) περιέχουν πολλαπλούς BH τομείς (BH1-BH3) ενώ οι προ-αποπτωτικές BID (BCL-2-interacting domain death agonist), BAD (BCL-2 antagonist of cell death), BIM (BCL-2-interacting mediator of cell death), PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), NOXA, BMF, HRK (Harakiri) περιέχουν μόνο BH3 τομείς (220).

Οι Bax (BCL-2-associated X protein) και Bak (BCL-2 antagonist or killer) είναι απολύτως απαραίτητες πρωτεΐνες για την πρόκληση απόπτωσης (221). Κύτταρα στα οποία καταστέλλεται η έκφραση τους ανθίστανται στην απόπτωση (219). Η ενεργοποίηση του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού οδηγεί σε αλλαγές της στερεοδιάταξης των Bax, Bak με αποτέλεσμα τη μετάβαση του Bax από το κυτταρόπλασμα στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου ο Bak είναι μόνιμα εγκατεστημένος, τον ολιγομερισμό τους και τη δημιουργία πόρου που συντελεί στην έξοδο των αποπτωγόνων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα.

Η ενεργοποίηση των Bax, Bak μεσολαβείται από τις BH3-only πρωτεΐνες μέσω δύο μηχανισμών (222, 223). Αφενός μέσω BH3-only πρωτεϊνών που λειτουργούν ως άμεσοι ενεργοποιητές (direct activators) όπως ο BIM και BID που επάγουν τον ολιγομερισμό Bax-Bak, αφετέρου μέσω BH3-only πρωτεϊνών όπως ο BAD που δεν επάγουν τον ολιγομερισμό αλλά δρουν ως αναστολείς (de-repressors) των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Σε αυτή την περίπτωση οι de-repressors που επάγονται μετά από ένα προ-αποπτωτικό ερέθισμα παρεμποδίζουν τις αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2, Bcl-xl και MCL-1 προστατεύουν το κύτταρο είτε αδρανοποιώντας τους Bax/Bak είτε αναστέλλοντας τους direct activators BIM και BID.

Δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν ο πόρος των Bax/Bak είναι πρωτεϊνικός ή λιπιδικός (224). Στην πρώτη περίπτωση οι Bax/Bak σχηματίζουν το σκελετό ενός πρωτεϊνικού διαύλου ενώ στη δεύτερη περίπτωση αποσταθεροποιούν τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου με αποτέλεσμα τη δημιουργία λιπιδικού καναλιού. Το αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση παραγόντων που προκαλούν απόπτωση με μηχανισμό εξαρτώμενο ή μη από τις κασπάσες.

Οι παράγοντες που απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από τις κασπάσες απόπτωση είναι:

- Το κυτόχρωμα C (212)

Το κυτόχρωμα C είναι πρωτεΐνη που εδράζεται στο διαμεμβρανικό διάστημα μεταξύ εσωτερικής-εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και παίζει το ρόλο του μεταφορέα ηλεκτρονίων μεταξύ των συμπλόκων III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Με τη διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης το κυτόχρωμα C απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και συζεύγνυται με τον adaptor molecule apoptosis-protease activating factor 1 (Apaf-1). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός συμπλέγματος γνωστού ως «αποπτώσωμα» (apoptosome) που ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών (caspase: cysteine-dependent asparatate-directed proteases). Ειδικότερα το αποπτώσωμα προσελκύει μόρια κασπάσης 9 (initiator caspase) που επάγουν την αυτοκατάλυση τους. Η ενεργοποιημένη κασπάση 9 στη

συνέχεια ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες (executioner caspases) 3 και 7 που διασπούν μεγάλο εύρος δομικών πρωτεϊνών του κυττάρου και ενεργοποιούν ένζυμα που συνεπικουρούν στην αποδόμηση όπως η Caspase-Activated DNase (CAD) που διασπά το DNA (225).

- Ο Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP Binding protein with low pI) (226).

Ο Smac ή Diablo εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου και είναι αναστολέας του Inhibitor of Apoptosis (IAP). Ο IAP από την άλλη είναι αναστολέας των κασπασών. Οπότε με τη διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ο Smac/Diablo διευκολύνει την αποπτωτική διαδικασία προσδένοντας και μπλοκάροντας τους IAPs.

- Ο Omi/HtrA2 (high-temperature requirement A2) (227)

Ο Omi/HtrA2 είναι επίσης πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου που δρα ως αναστολέας των IAPs. Ο Omi μιμείται τις κασπάσες και προσδένεται στους IAPs τους οποίους διασπά μέσω της λειτουργίας πρωτεάσης σερίνης που διαθέτει. Το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή της εξαρτώμενης από κασπάσες αποπτωτικής διαδικασίας. Ωστόσο φαίνεται να επάγει και το μη εξαρτώμενο από κασπάσες κυτταρικό θάνατο.

- Ο Apoptosis Inducing Factor (AIF) (228)

Ο AIF είναι επίσης πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου που απελευθερώνεται μετά από ένα προ-αποπτωτικό ερέθισμα. Ο AIF μεταβαίνει στον πυρήνα όπου προκαλεί συμύκνωση και διάσπαση της χρωματίνης.

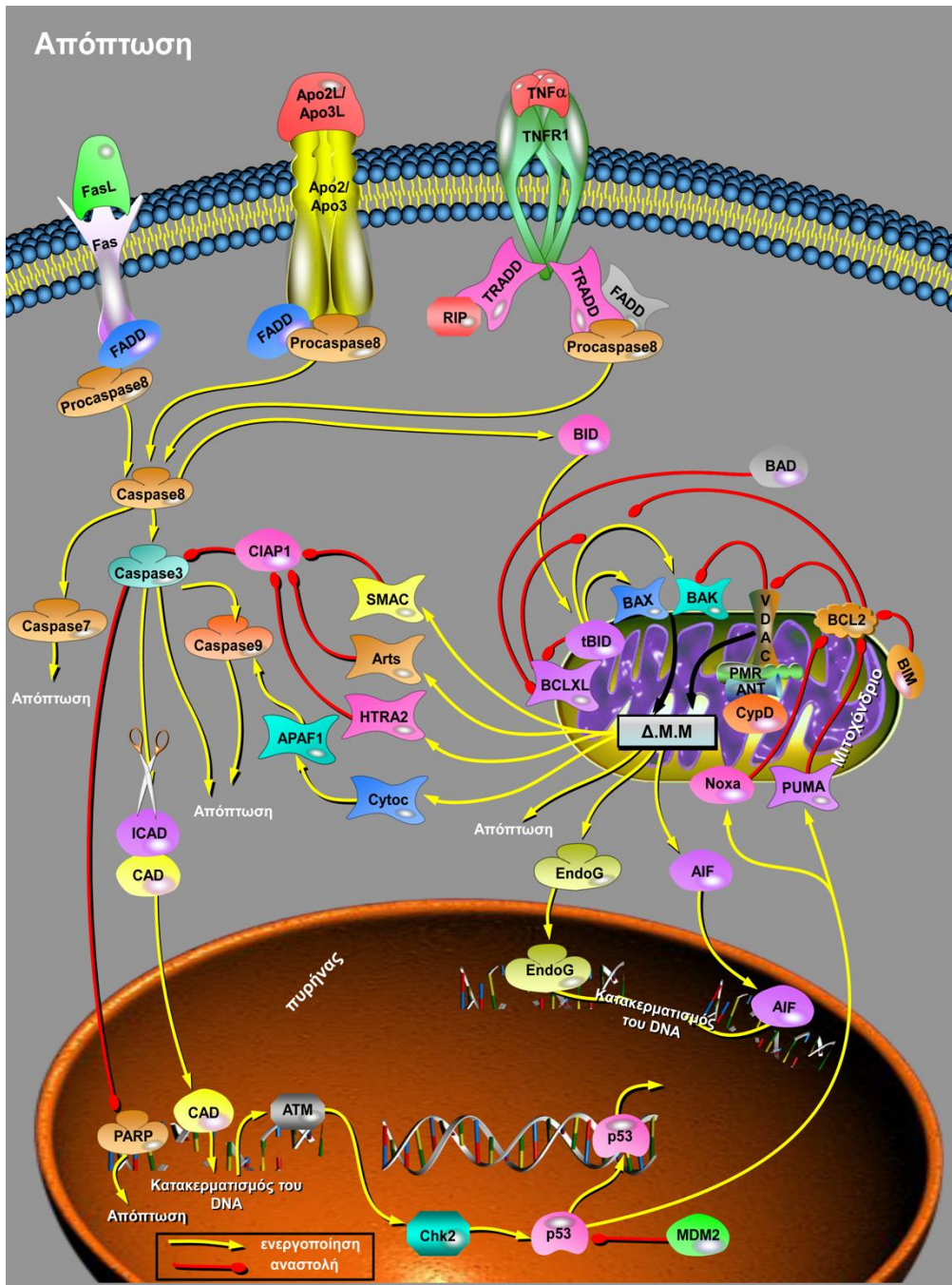
- Η Endonuclease G (Endo G) (229)

Η Endo G είναι επίσης πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου, που μεταβαίνει στον πυρήνα και προκαλεί διάσπαση της χρωματίνης μετά από προ-αποπτωτικό ερέθισμα.

Ένας δεύτερος μηχανισμός που συντελεί στη διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δ.Μ.Μ) είναι η δημιουργία “διαπερατού πόρου μετάπτωσης” (46, 216, 217). Σε αυτή την περίπτωση σχηματίζεται πόρος στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου που επιτρέπει τη διόδο μορίων με μέγεθος μικρότερο των 1.5 k.D. Η ενεργοποίηση του “διαπερατού πόρου μετάπτωσης” προκαλεί απώλεια της ΔΨm, διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και είσοδο νερού και άλλων διαλυτών ουσιών στη μήτρα του μιτοχονδρίου από το διαμεμβρανικό διάστημα. Το αποτέλεσμα είναι το οίδημα του μιτοχονδρίου που ακολουθείται από ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η διάρρηξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης προκαλεί έξοδο του κυτοχρώματος C και ενεργοποίηση των κασπασών.

Όσον αφορά τα δομικά συστατικά του διαπερατού πόρου μετάπτωσης, η παραδοσιακή θεωρία ενέπλεκε τη Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) και την adenine nucleotide translocase (ANT) (230, 231). Ωστόσο knockout μελέτες έδειξαν ότι δεν είναι απαραίτητα συστατικά του πόρου με τον ANT όμως να έχει ρυθμιστικό ρόλο. Από την άλλη επιβεβαιώνεται ο ρόλος της cyclophilin-D (CyP-D) ως δομικό στοιχείο του πόρου ενώ μελέτες εμπλέκουν και το mitochondrial phosphate carrier (PiC). Τέλος έχουν προταθεί άλλα υποψήφια μόρια στο σχηματισμό του πόρου όπως το σύμπλεγμα I της αναπνευστικής αλυσίδας. Στους παράγοντες που ρυθμίζουν τη διάνοξη του πόρου συμπεριλαμβάνονται η κλίση πρωτονίων ( $\Delta p$ ) μεταξύ μήτρας μιτοχονδρίου και διαμεμβρανικού χώρου, το ενδοκύτταριο ασβέστιο  $Ca^{2+}$  που ενεργοποιεί τον πόρο σε αυξημένες συγκεντρώσεις, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 με τους Bax/Bak να επάγουν τη διάνοξη και την αντι-αποπτωτική Bcl-2 να επάγει το κλείσιμο του πόρου και η Hexokinase (HK) που εμποδίζει το άνοιγμα. Τέλος φαίνεται πως οι δύο μηχανισμοί πρόκλησης MOMP, δηλαδή ο εξαρτώμενος από πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και ο μηχανισμός που μεσολαβείται από τη δημιουργία MPTP αλληλεπιδρούν (232).





**Εικ.1.11 Απόπτωση (τροποποιημένη εικόνα, ευγενής παραχώρηση της SABiosciences).** Ενεργοποίηση του εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Απελευθέρωση των αποπτωγόνων πρωτεϊνών από το μιτοχόνδριο μέσω διάτρησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δ.Μ.Μ) που είτε μεσολαβείται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας του Bcl-2 με τη δημιουργία πόρου BAX/BAK είτε από τις VDAC, ANT, CypD με τη δημιουργία διαπερατού πόρου μετάπτωσης. Ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και κατακερματισμός του κυττάρου.

### 1.3.2 Ο ρόλος των δραστικών μορφών οξυγόνου στην απόπτωση

Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ROS (Reactive Oxygen Species) περιλαμβάνονται ελεύθερες ρίζες  $O_2$  όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $HO\cdot$ ), συνδυασμοί ελεύθερων ριζών-ιόντων όπως το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2\cdot^-$ ), αλλά και μόρια όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (233, 234). Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής ROS δεδομένου ότι 1-2 % του οξυγόνου που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση μετατρέπεται σε ανιόν του υπεροξειδίου στα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας. Στη συνέχεια το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2\cdot^-$ ) μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) υπό την καταλυτική επίδραση της μαγγανικής-δισμουτάσης του υπεροξειδίου MnSOD (manganese superoxide dismutase) ενώ το  $H_2O_2$  οδηγεί στο σχηματισμό της πολύ δραστικής ρίζας υδροξυλίου ( $HO\cdot$ ). Η δημιουργία  $HO\cdot$  προκαλείται είτε μέσω Fenton αντίδρασης ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + -OH$ ) είτε Haber Weiss αντίδρασης υπό την καταλυτική επίδραση του  $Fe^{2+}$  ( $O_2\cdot^- + H_2O_2 \rightarrow OH\cdot + OH^- + O_2$ ) (235).

Ωστόσο το μιτοχόνδριο έχει μηχανισμούς άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες (236-238). Η MnSOD καταλύει τη μετατροπή του  $O_2\cdot^-$  σε  $H_2O_2$  το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε  $H_2O$  υπό την επίδραση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης Gpx1 ή Gpx4 (glutathione peroxidase) ή της peroxiredoxin (PrxIII). Επιπλέον το  $H_2O_2$  μπορεί να διαχυθεί στο κυτταρόπλασμα, συνεισφέροντας στο 20-30% του κυτταροπλασματικού  $H_2O_2$  που αποδομείται σε  $H_2O$  από την καταλάση.

Η γλουταθειόνη GSH (L-γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) είναι ο σπουδαιότερος αντιοξειδωτικός παράγοντας του μιτοχονδρίου και εν γένει του κυττάρου (239, 240). Η γλουταθειόνη είναι τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γλουταμίνη, κυστεΐνη και γλυκίνη, διαθέτει ομάδαθειόλης στο τμήμα κυστεΐνης και λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίου ανάγοντας ελεύθερες ρίζες. Η αναγωγή ριζών οδηγεί στην οξείδωση της ίδιας της γλουταθειόνης που αντιδρά με έτερο μόριο οξειδωμένης γλουταθειόνης και οδηγεί στο σχηματισμό διθειούχου γλουταθειόνης (GSSG). Η διθειούχος γλουταθειόνη ανακυκλώνεται σε γλουταθειόνη με τη χρήση ενός αναγωγικού ισοδύναμου προερχόμενο από το NADPH υπό την καταλυτική επίδραση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν πολλούς στόχους εντός του κυττάρου που εμπλέκονται στην απόπτωση (241).

α. Ενεργοποιούν το μονοπάτι της JNK (242). Οι ROS ενεργοποιούν το ROS-ευαίσθητο σύμπλεγμα της ASK με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της JNK η οποία προκαλεί απόπτωση καταστέλλοντας την έκφραση αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών της

οικογένειας Bcl-2 ή προάγοντας τη μεταγραφή AP-1 εξαρτώμενων προ-αποπτωτικών γονιδίων.

β. Επιδρούν στο διαπερατό πόρο μετάπτωσης του μιτοχονδρίου (243). Έχει δειχθεί ότι οι ROS αλληλεπιδρούν τόσο σε ρυθμιστικά όσο και σε συστατικά μέρη του διαπερατού πόρου μετάπτωσης, όπως ο VDAC, ο ANT και η CypD. Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις που προκαλούν σε αυτές τις πρωτεΐνες έχουν ως αποτέλεσμα τη ροή ιόντων από τον πόρο μετάπτωσης, κατάρρευση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού ( $\Delta\Psi_m$ ) και απόπτωση.

γ. Οξειδωση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) (244). Το mtDNA βρίσκεται σε εγγύτητα με την αναπνευστική αλυσίδα που είναι η κύρια πηγή των ROS. Από την άλλη το mtDNA ελέγχει την έκφραση γονιδίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Ως εκ τούτου είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία παραγωγής ATP. Επιπλέον η διαταραχή της λειτουργίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που μπορεί να προκληθεί από τις ROS μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω έκλυση ROS. Το αποτέλεσμα είναι ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί στην απόπτωση.

δ. Οξειδωση της καρδιολιπίνης. Η καρδιολιπίνη είναι ένα ανιονικό φωσφολιπίδιο που εδράζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της (245). Αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας όπως το κυτόχρωμα C στο οποίο παρέχει χαλαρή ή σταθερή σύνδεση ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης της. Η απελευθέρωση κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα υπακούει στη θεωρία των δύο βημάτων (two step hypothesis) (246). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η δημιουργία πόρου Bax/Bak δεν είναι αρκετή για την απελευθέρωση κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα καθώς πρέπει να προηγηθεί η αποκόλληση του από την εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης (247). Για να συμβεί αυτό απαιτείται χαλάρωση της σύνδεσης με την καρδιολιπίνη. Η οξειδωση της καρδιολιπίνης είναι αυτή που προκαλεί κινητοποίηση του κυτοχρώματος C (248, 249). Επίσης φαίνεται πως ο βαθμός οξειδωσης της καρδιολιπίνης καθορίζει το κατά πόσο το κύτταρο είναι ευάλωτο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (241).

ε. Ρύθμιση της δραστηριότητας των κασπασών. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου φαίνεται πως είτε ενεργοποιούν είτε δρουν ανασταλτικά στις κασπάσες σε συνάρτηση πάντα με το κυτταρικό περιβάλλον (241).

### 1.3.3 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της MAPK/ERK

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) ρυθμίζει σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση (250). Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται από εξωκυττάρια σήματα που διαβιβάζονται μέσω υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs), G-Protein Coupled Receptors (GPCRs), Integrins και διαύλους ιόντων (Εικ. 1.12).

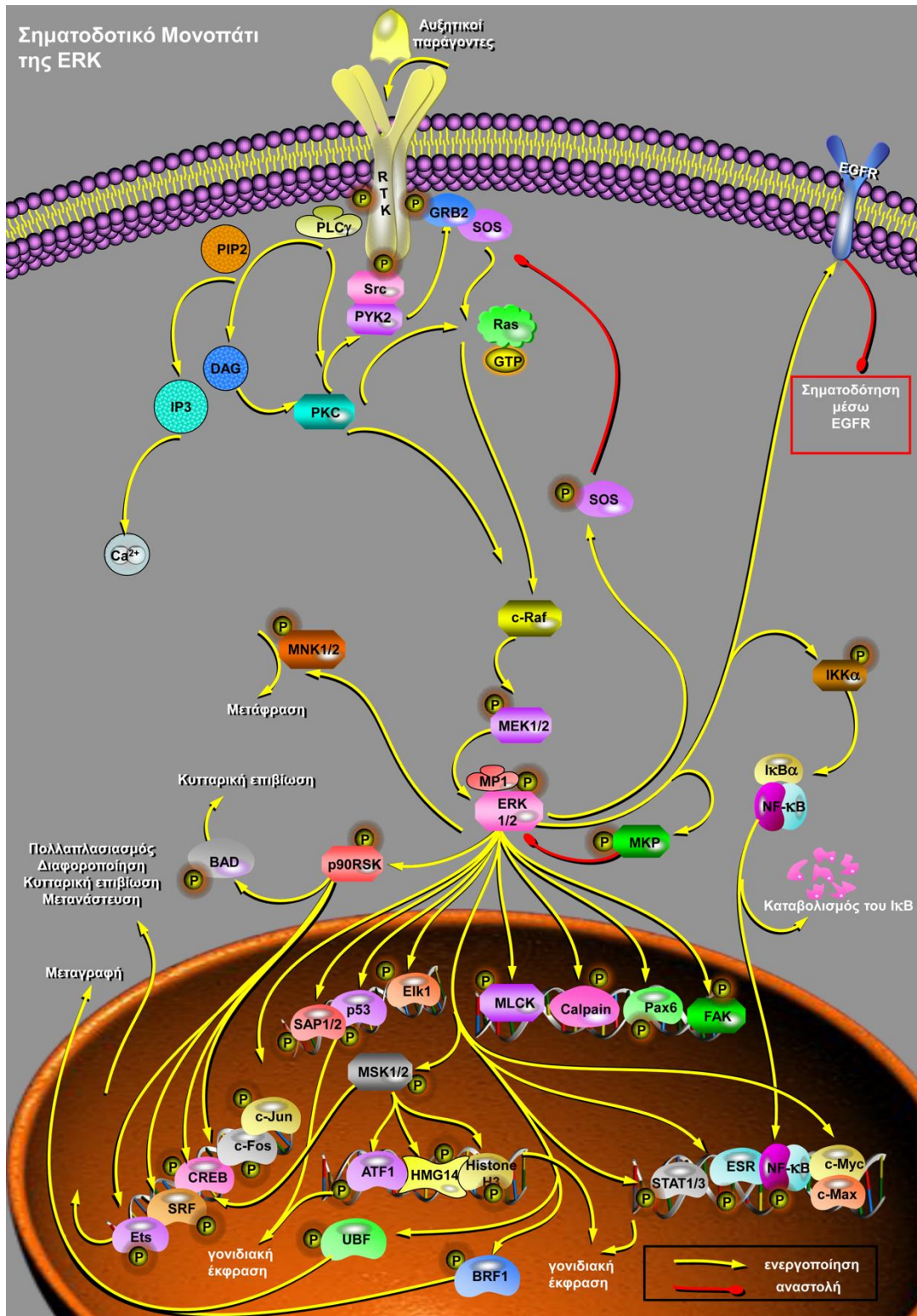
Θα εστιάσουμε στην ενεργοποίηση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs) (251, 252). Η ενεργοποίηση των RTKs έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση πρωτεϊνών διασύνδεσης όπως ο Growth Factor Receptor Bound protein-2 (GRB2). Ο GRB2 προσδένεται, μέσω των περιοχών SH2 που διαθέτει, στις φωσφοτυροσίνες του ενεργοποιημένου υποδοχέα. Στη συνέχεια ενεργοποιεί παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης GEFs (guanine nucleotide exchange factor) όπως ο Son of Sevenless (SOS). Ο SOS με τη σειρά του ανταλλάσσει GDP με GTP και ενεργοποιεί τον RAS που είναι μία GTPase. Ο RAS εγκαθίσταται στην ενεργή μορφή του στη μεμβράνη και προσελκύει την κινάση σερίνης/θρεονίνης RAF. Ο ενεργοποιημένος RAF φωσφορυλιώνει τη MEK που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ERK.

Η ERK ενεργοποιείται επίσης με RAS-ανεξάρτητο τρόπο μέσω της PLC- $\gamma$  και της PKC (253, 254). Η ενεργοποιημένη PLC διασπά το phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) σε diacyl glycerol (DAG) και inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Το IP<sub>3</sub> διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και προσδένεται σε υποδοχείς IP<sub>3</sub> όπως οι δίαυλοι ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου σε συνεργασία με το DAG που παραμένει στη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Protein Kinase C (PKC). Η PKC στη συνέχεια ενεργοποιεί την ERK μέσω της MEK, του RAF ή του RAS. Επιπλέον ενεργοποιεί το σύμπλεγμα Src-PYK2 (Proline-Rich Tyrosine Kinase-2) που με τη σειρά του ενεργοποιεί τη GRB2 και κατ' επέκταση το RAS/RAF/MEK μονοπάτι.

Η ενεργοποιημένη ERK φωσφορυλιώνει τόσο πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος όσο και του πυρήνα (255-257). Στο κυτταρόπλασμα εκτός των άλλων φωσφορυλιώνει παράγοντες που εμπλέκονται στην αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση του μονοπατιού. Ενδεικτικά φωσφορυλιώνει τον SOS με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του συμπλέγματος GRB2-SOS, απενεργοποιεί τον υποδοχέα του Epidermal Growth Factor και επιπλέον σταθεροποιεί τις MAP Kinase Phosphatases (MKPs) που απενεργοποιούν την ίδια την ERK. Από την άλλη στο κυτταρόπλασμα η ERK ενεργοποιεί τις MAPK-Interacting Kinases (MNKs) που αυξάνουν την έκφραση του eukaryotic initiation factor-4E (eIF4E) ενώ

φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις 90 kDa Ribosomal protein S6 Kinases (RSKs) που μεσολαβούν πολλές από τις δράσεις της. Η RSK απενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης τον προ-αποπτωτικό BAD ενώ μετακινείται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον c-Fos, τον Cyclic AMP Response Element-Binding protein (CREB) και τον Serum Response Factor (SRF). Τέλος η ERK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση IKK-Alpha που οδηγεί στη φωσφορυλίωση και καταβολισμό του Inhibitor of  $\kappa$ B- $\alpha$  (IKB- $\alpha$ ) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF- $\kappa$ B.

Η ERK στον πυρήνα ενεργοποιεί είτε απευθείας είτε μέσω των Mitogen-and Stress-activated protein Kinases (MSKs) μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό. Οι MSKs ενεργοποιούν τους Activating Transcription Factor-1 (ATF1) και CREB, ενώ η ERK ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας ETS όπως ο Ets1 και παράγοντες που ανήκουν στους Ternary Complex Factors (TCFs) μία υποκατηγορία της ίδιας οικογένειας όπως οι Elk1, Sap1 και Sap2. Επίσης η ERK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το πρωτοογκογονίδιο c-myc καθώς επίσης τους c-fos και c-jun. Τέλος, μεταξύ των παραγόντων που ενεργοποιεί η ERK στον πυρήνα είναι οι Myosin Light Polypeptide Kinase (MLCK), Calpain (Capn), Paxillin-6 (Pax6) και FAK που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση καθώς και τον Signal Transducer and Activator of Transcription-1/3 (STAT1/3) και τον Estrogen Receptor (ESR).



**Εικ 1.12 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ERK (τροποποιημένη εικόνα, ευγενής παραχώρηση της SABiosciences).** Η διέγερση του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης RTK οδηγεί σε ενεργοποίηση του RAF/MEK/ERK μονοπατιού μέσω της RAS και της PKC. Η ενεργοποιημένη ERK φωσφορυλιώνει στόχους στο κυτταρόπλασμα μόνη της ή μέσω της RSK είτε μεταβαίνει στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες απευθείας ή μέσω της MSK.

### 1.3.4 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt/PKB

Το μονοπάτι της Akt ή Protein Kinase B (PKB) είναι κρίσιμο μονοπάτι της μεταγωγής σήματος που ρυθμίζει λειτουργίες όπως η κυτταρική επιβίωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση, ο μεταβολισμός και η αγγειογένεση (258). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού συμβαίνει έπειτα από διέγερση διαμεμβρανικών υποδοχέων του κυττάρου από εξωκυτάρια σήματα όπως ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες της εξωκυτάριας μήτρας ECM (Extracellular Matrix).

Θα εστιάσουμε σε αυτό το σημείο στην ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών μεταγωγής σήματος από υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Εικ. 1.13) (259). Η φωσφορυλίωση και ο διμερισμός των υποδοχέων προσελκύει την phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Η PI3K είναι μόριο κλειδί για το μονοπάτι της Akt. Η PI3K της τάξης I αποτελείται από δύο υπομονάδες, τη ρυθμιστική p85 και την καταλυτική p110. Η p85 προσδένεται στις φωσφοτυροσίνες του ενεργοποιημένου υποδοχέα μέσω των Src homology 2 (SH2) τομέων που διαθέτει και προσελκύει την p110 (260). Εναλλακτικά η p85 προσδένεται στον υποδοχέα μέσω διασύνδεσης με τη GRB2 και τη μεσολάβηση των Grb2-associated binding (GAB) πρωτεϊνών (261). Επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα επιστράτευσης της καταλυτικής υπομονάδας p110 στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς τη μεσολάβηση της p85, αλλά με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών διασύνδεσης όπως ο insulin receptor substrate (IRS) (262). Τέλος μπορεί να ενεργοποιηθεί απευθείας από τη Ras (263).

Η ενεργοποιημένη PI3K καταλύει τη φωσφορυλίωση του phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) σε phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) στην κυτταρική μεμβράνη (264). Το PIP<sub>3</sub> στη συνέχεια προσελκύει την Akt και την PDK1 που προσδένονται σε αυτό μέσω των pleckstrin homology (PH) τομέων που διαθέτουν (265). Η γεινίαση τους οδηγεί στη μερική ενεργοποίηση της Akt από την PDK1 μέσω της φωσφορυλίωσης της στη Thr308 (266). Στη συνέχεια η Akt ενεργοποιείται πλήρως μέσω της φωσφορυλίωσης της στη Ser473 από πλειάδα πρωτεϊνών όπως η phosphoinositide-dependent kinase 2 (PDK2) (267), η integrin-linked kinase (ILK) (268), η mechanistic target of rapamycin complex2 (mTORC2) (269) και η DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) (270).

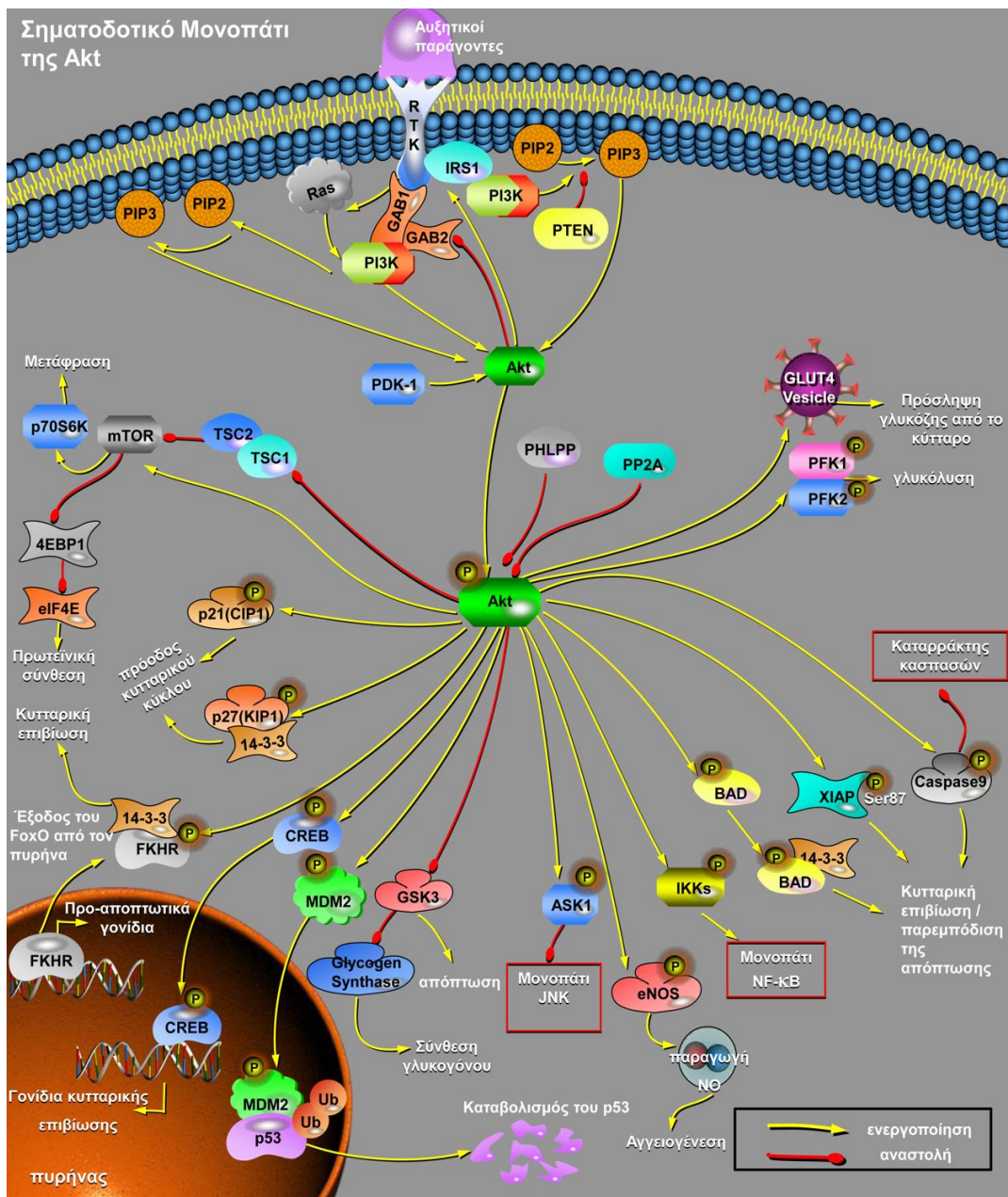
Για την ισορροπημένη σηματοδότηση της Akt απαιτείται η παρουσία πρωτεϊνών που παίζουν κατασταλτικό ρόλο. Πράγματι ο Phosphatase and tensin homolog (PTEN) ανταγωνίζεται τη δράση της PI3K μέσω της αποφωσφορυλίωσης του PIP<sub>3</sub> σε PIP<sub>2</sub> (271). Ο PTEN έχει γνωστή ογκοκατασταλτική δράση και είναι συχνά μεταλλαγμένος σε διάφορους τύπους καρκίνου. Επίσης η SH2-containing Inositol

Phosphatase (SHIP) είναι φωσφατάση που αποφωσφορυλιώνει το PIP3 (272). Από την άλλη η ίδια Akt επίσης ρυθμίζεται αρνητικά. Ενδεικτικά η protein phosphatase 2A (PP2A) αποφωσφορυλιώνει την Akt στην Thr308 (273) ενώ η PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase (PHLPP) αποφωσφορυλιώνει την Akt στη Ser473 (274).

Εφόσον η Akt ενεργοποιηθεί μεταβαίνει από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες που ρυθμίζουν κρίσιμες λειτουργίες του κυττάρου. Ειδικότερα, προάγει το μεταβολισμό της γλυκόζης διεγείροντας τη γλυκόλυση μέσω των PFK1 και PFK2 (275), αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από το κύτταρο μέσω των μεταφορέων GLUT4 (276) και προάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου αναστέλλοντας τη GSK3-β (277). Επιπλέον η Akt προάγει τον κυτταρικό κύκλο καταστέλλοντας τη δράση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων (CDKs), p21<sup>Cip1</sup> (278) και p27<sup>Kip1</sup> (279) οι οποίοι προκαλούν στάση στη G1 φάση. Από την άλλη η Akt αυξάνει την πρωτεϊνική έκφραση ενεργοποιώντας τον mTOR απευθείας ή μέσω απενεργοποίησης του TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) που τον αναστέλλει (280). Επίσης η Akt προάγει την αγγειογένεση διεγείροντας την παραγωγή NO μέσω της eNOS (281).

Τέλος η Akt ευνοεί την κυτταρική επιβίωση και αναστέλλει την απόπτωση. Ειδικότερα αναστέλλει την BH3-only πρωτεΐνη BAD μέσω φωσφορυλίωσης στη Ser136 προκαλώντας έτσι τον καταβολισμό της (282). Επίσης φωσφορυλιώνει και προάγει τον καταβολισμό των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Forkhead family transcription factors (FoxO/FH) εμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή των BH3-only προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (283). Επιπλέον ενεργοποιεί την MDM2 που μετακινείται στον πυρήνα και ασκεί αρνητική ρύθμιση στον p53 (284). Από την άλλη η Akt φωσφορυλιώνει την προ-κασπάση 9 στη Ser196 εμποδίζοντας έτσι την πρωτεολυτική διάσπαση και ενεργοποίηση της (285) ενώ φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί τον αναστολέα των κασπασών και της απόπτωσης X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) (286). Επιπλέον η Akt απενεργοποιεί την Glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β) που προάγει την ενεργοποίηση αρκετών συστατικών μερών του ενδογενούς μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού (287). Τέλος η Akt ενεργοποιεί το μονοπάτι του NFκB (288) που προάγει την επιβίωση ή απενεργοποιεί την προ-αποπτωτική δράση του ASK1/JNK/P38 μονοπατιού (289).





**Εικ 1.13 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt/PKB (τροποποιημένη εικόνα, ευγενής παραχώρηση της SABiosciences).** Ενεργοποίηση της Akt μέσω της PI3K μετά τη διέγερση του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης (RTK). Στη συνέχεια η Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί αναστολείς κυκλινών όπως οι  $p21^{cip}$  και  $p27^{kip}$  με αποτέλεσμα την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου καθώς και πρωτεΐνες με προ-αποπτωτική δράση όπως οι BAD, Caspase 9, XIAP με αποτέλεσμα την προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης.

### 1.3.5 Υποξία και απόπτωση

Ο ρόλος της υποξίας στην απόπτωση είναι διττός καθώς είτε την ενεργοποιεί είτε την παρεμποδίζει αναλόγως του κυτταρικού περιβάλλοντος (290). Το κύτταρο χρειάζεται οξυγόνο προκειμένου να παράγει ενέργεια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οπότε σε συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης αναπτύσσει μηχανισμούς προσαρμογής προκειμένου να ανταπεξέλθει στο δυσμενές περιβάλλον. Μεταξύ των μηχανισμών που αναπτύσσει είναι μεταβολές στο μονοπάτι της απόπτωσης που οδηγούν στην αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Βέβαια σε συνθήκες παρατεταμένης υποξίας το κύτταρο εν τέλει πεθαίνει.

Το κύτταρο απαντά στην υποξία τόσο με HIF-εξαρτώμενο (73) όσο και με HIF-ανεξάρτητο τρόπο (291). Ο HIF επάγει την έκφραση των BH3-only προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, Nip-3 (292) και Noxa (293) και καταστέλλει την έκφραση του Bcl-2 με αποτέλεσμα την πρόκληση απόπτωσης (294). Από την άλλη σε διαφορετικό κυτταρικό περιβάλλον με διαφορετικής διάρκειας και έντασης υποξία, αυξάνεται η έκφραση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-xL και Mcl-1 και ελαττώνεται η έκφραση των Bid, Bax και Bak με αποτέλεσμα την αντίσταση στην απόπτωση (295). Επιπλέον η υποξία επάγει την έκφραση της Hexokinase-ii (HK-II) η οποία παρεμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο μέσω της πρόσδεσης της στη VDAC στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (296). Πολύπλοκη είναι επίσης η σχέση του HIF με τον p53 (297-299). Από τη μία η υποξία σταθεροποιεί τον p53 και προάγει την απόπτωση με p53-εξαρτώμενο τρόπο (300), από την άλλη μελέτες έδειξαν ότι ο HIF και ο p53 χρησιμοποιούν από κοινού τον p300/CBP ως συν-ενεργοποιητή με αποτέλεσμα ο HIF να ανταγωνίζεται τη δράση του p53 (301). Τέλος ο HIF προάγει τον καταβολισμό της homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) πρωτεΐνης που ενεργοποιεί τον p53 (302).

Επιπλέον η υποξία επιδρά σε μονοπάτια της απόπτωσης με HIF-ανεξάρτητο τρόπο (291). Η Unfolded Protein Response (UPR) είναι ένας μηχανισμός που ενεργοποιείται από τη συσσώρευση αποδιαταγμένων πρωτεϊνών εντός του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου του κυττάρου (303). Η υποξία είναι ένας παράγοντας που ενεργοποιεί την UPR πιθανώς λόγω της αναγκαιότητας του οξυγόνου για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών (304). Η UPR μεσολαβείται από τους τρεις αισθητήρες του ενδοπλασματικού δικτύου, inositol requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like RNA kinase (PERK) και activating transcription factor 6 (ATF6) (303). Η ενεργοποίηση της UPR συντελεί στην προσαρμογή του κυττάρου στο στρες και την προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης (305). Ωστόσο στο παρατεταμένο μη αντιρροπούμενο στρες το κύτταρο οδηγείται εν τέλει στο θάνατο μέσω της επαγωγής

του προ-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα C/EBP homologous protein (CHOP) και της ενεργοποίησης της JNK (306, 307).

Ο ρόλος της υποξίας θεωρείται κρίσιμος στη θεραπευτική του καρκίνου (308). Οι υποξικοί όγκοι συσχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση ενώ η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία είναι λιγότερο αποτελεσματικές (309). Η αντίσταση στην απόπτωση θεωρείται καθοριστικός παράγοντας χωρίς βέβαια να υποτιμάται ο ρόλος επιπρόσθετων μηχανισμών όπως η έκφραση πρωτεϊνικών μεταφορέων εκροής φαρμάκων από το καρκινικό κύτταρο.

## 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός αυτής της διατριβής θα μπορούσε να αναλυθεί σε τέσσερις επιμέρους στόχους:

1. Να εξεταστεί εάν η κλινικά εφικτή μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης ασκεί αντιαγγειογενετική δράση *in vitro*.
2. Να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Ειδικότερα να εξεταστεί η επίδραση της στα κρίσιμα μονοπάτια της αγγειογένεσης Notch και VEGF.
3. Να εξεταστούν μηχανισμοί που ενδεχομένως μεσολαβούν αντίσταση στην αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Συγκεκριμένα να μελετηθεί ο ρόλος της υποξίας που φαίνεται πως είναι ο μέγας ενορχηστρωτής της αντίστασης στις αντιαγγειογενετικές θεραπείες.
4. Τέλος να μελετηθεί ο συνδυασμός της μετρονομικής βινορελμπίνης με άλλους παράγοντες μοριακής στόχευσης που συντελούν στην αναστροφή της αντίστασης που προκαλείται στην υποξία.



## **ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### 2.1.1 Καλλιέργεια Ενδοθηλιακών Κυττάρων Προερχόμενων από Ομφαλική Φλέβα (HUVEC), διαλύματα και φάρμακα

Χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) που προμηθευτήκαμε από τη Lonza (Basel, Switzerland) ή απομονώθηκαν από ομφάλιους λώρους. Ο χειρισμός τους έγινε σε εστία κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood) για αποτροπή ανεπιθύμητων μολύνσεων και η καλλιέργεια έγινε σε ειδικά κατεργασμένα τρυβλία ή φλάσκες (Corning, New York, USA) καλυμμένες με gelatin (0.1% w/v), υπόστρωμα το οποίο ευνοεί την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό ταπητίου μόνης στρώσης (monolayer). Ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε EGM-2 (Endothelial Growth Media-2) που προμηθευτήκαμε από τη Lonza και συνίσταται σε Endothelial Basal Media-2 εμπλουτισμένο με αυξητικούς παράγοντες και FCS (2%). Σε συνθήκες νορμοξίας τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση σταθερού pH ενώ σε συνθήκες υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στον υποξικό θάλαμο εργασίας invivo2 400 (Ruskin Technologies, Bridgend, UK) που επιτρέπει το χειρισμό των κυττάρων σε συνθήκες απομονωμένες από το εξωτερικό περιβάλλον με την επιθυμητή συγκέντρωση οξυγόνου.

Η επανακαλλιέργεια των HUVEC γινόταν μέχρι τη γενιά (passage) 7. Για τις πλύσεις χρησιμοποιήθηκε Phosphate Buffered Saline (GIBCO® PBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Για την αποκόλληση των κυττάρων από την καλλιεργητική επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε Gibco® Trypsin EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ωστόσο για πειράματα μελέτης του Notch χρησιμοποιήθηκε Trypsin χωρίς EDTA καθώς το EDTA προκαλεί ενεργοποίηση του μονοπατιού και απελευθέρωση του NICD. Τα κύτταρα καταψύχονταν για μελλοντική χρήση σε εμβρυϊκό ορό μόσχου Gibco® FBS (Fetal Bovine Serum) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) που περιείχε 10% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) στους -80°C ενώ την επόμενη ημέρα μεταφέρονταν στο υγρό άζωτο.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής φάρμακα και αναστολείς μονοπατιών (Πίνακας 2.1).

Φάρμακο	Πηγή προέλευσης	Διαλύτης/συγκέντρωση αποθήκευσης	Θερμοκρασία αποθήκευσης
---------	-----------------	----------------------------------	-------------------------

Vinorelbine	Tocris Bioscience (R&D Systems, Minneapolis, USA)	10mM DMSO	-20°C
Sunitinib	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	10mM DMSO	-20°C
Akt αναστολέας V	Calbiochem (Merck Millipore, Billerica, USA)	10mM DMSO	-20°C
MEK αναστολέας (U0126)	Calbiochem (Merck Millipore, Billerica, USA)	10mM DMSO	-20°C
DBZ (Dibenzazepine)	Calbiochem (Merck Millipore, Billerica, USA)	1mM DMSO	-20°C
IKK αναστολέας III	Calbiochem (Merck Millipore, Billerica, USA)	10mM DMSO	-20°C
JNK αναστολέας II	Calbiochem (Merck Millipore, Billerica, USA)	10mM DMSO	-20°C

**Πίνακας 2.1 Φαρμακευτικοί παράγοντες, προέλευση και συνθήκες συντήρησης.**

### **2.1.2 Απομόνωση HUVEC**

Η απομόνωση των HUVEC πραγματοποιήθηκε με την προσαρμογή πρωτοκόλλων που έχουν ήδη περιγραφεί(310). Εν συντομία ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Καθαρισμός των λώρων με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (phosphate buffered saline).
2. Νεαροποίηση των δύο άκρων του λώρου με κάθετη τομή και εισαγωγή περιφερικού φλεβοκαθετήρα στις δύο άκρες της ομφαλικής φλέβας.



- Ακολούθησε απολίνωση στο σημείο εισόδου του καθετήρα και τοποθέτηση 3-way συσκευής.
3. Έκπλυση του αίματος της φλέβας εγχύοντας PBS με σύριγγα που προσαρμόστηκε στο φλεβοκαθετήρα.
  4. Έγχυση διαλύματος κολλαγενάσης (0.1% w/v) εντός του λώρου μέχρι να πληρωθεί.
  5. Επώαση του λώρου σε διάλυμα PBS για 15 min στους 37°C με τις συσκευές 3-way να παραμένουν κλειστές.
  6. Συλλογή του διαλύματος κολλαγενάσης που περιέχει τα απομονωμένα κύτταρα σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθήκη θρεπτικού μέσου με 10% fcs σε αναλογία 1:1 προκειμένου να απενεργοποιηθεί η κολλαγενάση.
  7. Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων στα 400g για 5 min, αναρρόφηση του υπερκείμενου μέσου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε θρεπτικό μέσο EGM-2. Τέλος επίστρωση των κυττάρων στα τρυβλία.

### **2.1.3 Δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού (cell proliferation assay)**

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός εξετάστηκε με τη δοκιμασία Cyquant (Molecular Probes, Eugene, USA). Το Cyquant προσδένεται στο DNA των κυττάρων και εκπέμπει φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού αποτελεί ένα μέτρο του πληθυσμού των κυττάρων. Κύτταρα HUVEC επιστρώθηκαν σε πλάκα με 96 πηγάδια καλυμμένη με gelatin (0.1% w/v) στη συγκέντρωση των 2000 κυττάρων/πηγάδι. Την επόμενη ημέρα ξεκίνησε η έκθεση στις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες. Με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε το αντιδραστήριο Cyquant. Ακολούθησε επώαση για 1 hr στον επωαστικό κλίβανο και μέτρηση του φθορισμού στο spectramax M2 multimode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Ο πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε με τη Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένη στην RFU του μάρτυρα.

### **2.1.4 Δοκιμασία Μετανάστευσης (cell migration assay)**

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων εξετάστηκε με τη δοκιμασία επούλωσης. Κύτταρα HUVEC επιστρώθηκαν σε πλάκα με 24 πηγάδια (EssenBioScience, Ann Arbor, USA) στη συγκέντρωση των 100,000 κυττάρων/πηγάδι. Όταν το στρώμα των κυττάρων έγινε συμπαγές προκλήθηκε μία εκδορά στη μεσότητα κατά μήκος του πηγαδιού με συσκευή που παρείχε η

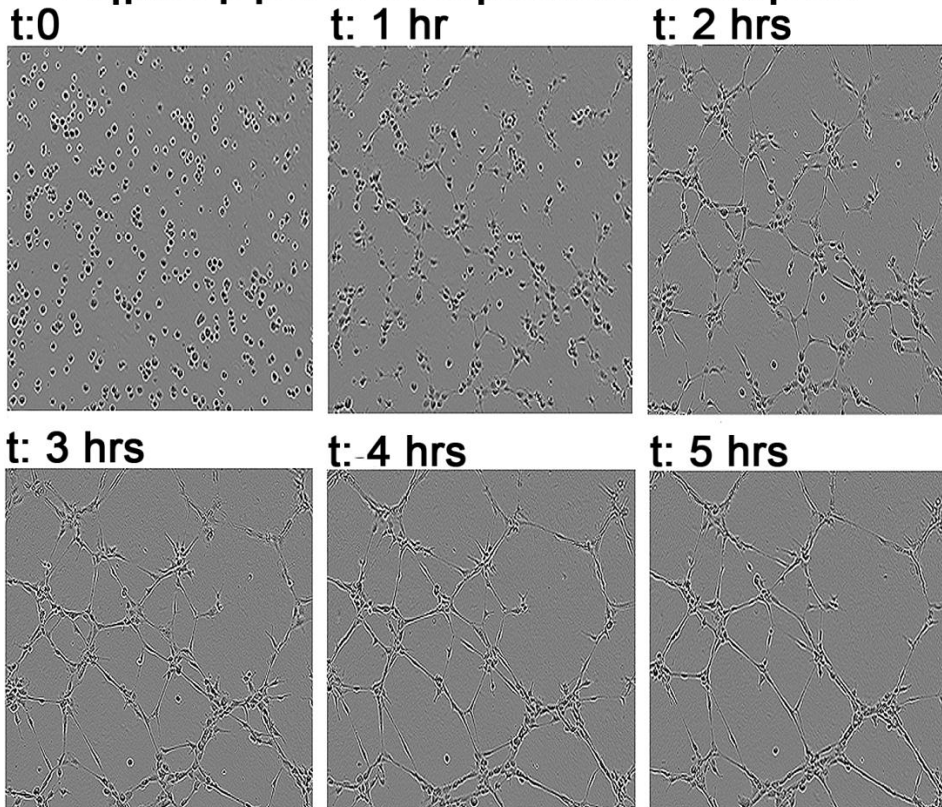
EssenBioScience. Μία φωτογραφία λήφθηκε άμεσα στο χρόνο t:0. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν στις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες. Μια δεύτερη φωτογραφία λήφθηκε μετά από 6 ώρες προκειμένου να καταγραφεί το διάστημα που καλύφθηκε από τα κύτταρα σε αυτό το χρόνο. Η λήψη και η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το Incucyte™ (EssenBioScience, Ann Arbor, USA). Η ποσοτικοποίηση έγινε με το ενσωματωμένο λογισμικό της EssenBioScience χρησιμοποιώντας την παράμετρο relative wound density που υποδηλώνει το βαθμό επούλωσης της εκδοράς στο χρόνο.

### **2.1.5 Δοκιμασία σχηματισμού ενδοθηλιακών σωλήνων (tube formation)**

Η δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία Matrigel (Matrigel assay). Πλάκες με 96 πηγάδια καλύφθηκαν με 50 μl matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, San Jose, USA) ανά πηγάδι. Στη συνέχεια έγινε επώαση στους 37°C για 30 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί πολυμερισμός της γέλης. Ακολούθησε επίστρωση 15,000 HUVEC / πηγάδι και έκθεση στη βινορελμπίνη για 6 hrs στη νορμοξία ή υποξία. Εικόνες αντίθεσης φάσεως λήφθηκαν με το EVOS cell imaging system (Life Technologies, Carlsbad, USA) με το πέρας του πειράματος. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των ενδοθηλιακών σωλήνων (εικ. 2.1) βάσει του αριθμού πολυγώνων που σχηματίστηκαν.

## Δοκιμασία Matrigel

### Δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων



Εικ. 2.1 Η χρονική πορεία δημιουργίας ενδοθηλιακών σωλήνων.

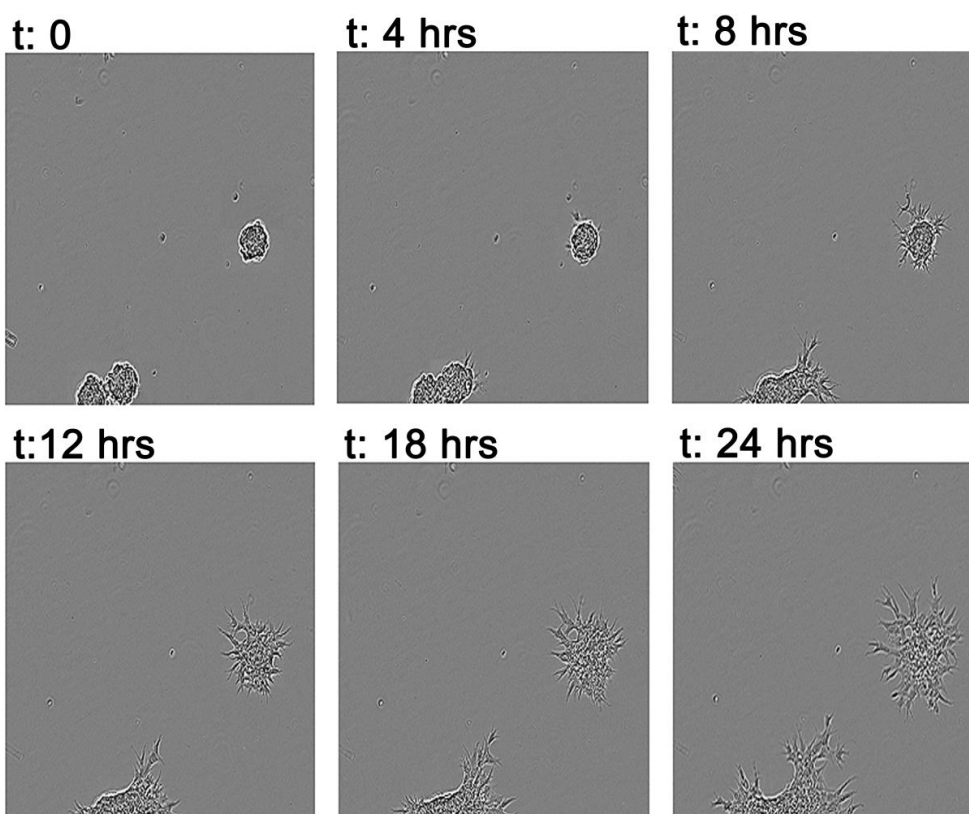
#### 2.1.6 Δοκιμασία εκκρεμούς σταγόνας (Hanging drop assay)

Η εκβλάστηση των ενδοθηλιακών κυττάρων εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία εκκρεμούς σταγόνας (Hanging drop assay). Σε αυτή τη δοκιμασία σφαιροειδή ενδοθηλιακών κυττάρων αναμειγνύονται με γέλη εξωκυττάριας ουσίας στην επιφάνεια της οποίας προστίθεται θρεπτικό μέσο με αγγειογενετικούς παράγοντες. Οι πόροι της γέλης δημιουργούν βαθμίδωση στη συγκέντρωση των αγγειογενετικών παραγόντων με αποτέλεσμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα του σφαιροειδούς να διασπούν την εξωκυττάρια ουσία, να μεταναστεύουν και να πολλαπλασιάζονται προς την κατεύθυνση των αγγειογενετικών παραγόντων σχηματίζοντας εκβλαστήσεις (εικ. 2.2).

Εν ολίγοις ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: σταγόνες εναιωρήματος κυττάρων με συγκέντρωση 750 κύτταρα / 20  $\mu$ l διανεμήθηκαν στην έσω πλευρά του καλύμματος ενός καλλιεργητικού τρυβλίου. Το κάλυμμα επανατοποθετήθηκε στο τρυβλίο με τις σταγόνες να κρέμονται. Ακολούθησε επώαση στον επωαστικό κλίβανο για μία νύχτα ώστε να σχηματιστούν τα σφαιροειδή. Στη συνέχεια τα σφαιροειδή των ενδοθηλιακών κυττάρων φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 1 min, επαναιωρήθηκαν σε

διάλυμα ινώδους (2 mg/ml) που περιείχε 0.15 units/ml απροτινίνη και διανεμήθηκαν σε πλάκες με 24 πηγάδια που περιείχαν θρομβίνη. Το διάλυμα ινώδους αναμείχθηκε ήπια με τη θρομβίνη στην τελική συγκέντρωση των 0.625 units/ml. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20 min προκειμένου να σχηματιστεί πήγμα. Θρεπτικό μέσο με ή χωρίς βινορελμπίνη τοποθετήθηκε στο πηγάδι πάνω από την ινική και τα σφαιροειδή ενδοθηλιακών κυττάρων επωάστηκαν στη νορμοξία ή υποξία για 24 hrs. Φωτογραφίες αντίθεσης φάσεων λήφθηκαν στο τέλος του πειράματος με το EVOS Cell Imaging System (Life Technologies, Carlsbad, USA). Η ποσοτικοποίηση έγινε με το λογισμικό image J βάσει της επιφάνειας που καλύφθηκε από το εκβλάστημα αντιπροσωπευτικών σφαιροειδών.

## Δοκιμασία εκκρεμούς σταγόνας Δημιουργία ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων



Εικ 2.2 Η χρονική πορεία δημιουργίας ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων.

### 2.1.7 Διαμόλυνση (transfection) κυττάρων με siRNA ολιγονουκλεοτίδια

Προκειμένου να αποσιωπήσουμε την έκφραση του HIF1α εφαρμόσαμε τη διαδικασία παρεμβολής RNA διαμολύνοντας τα HUVEC με μικρά δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια siRNA (small interfering RNA). Τα siRNA προσδένονται στο

mRNA του γονιδίου στόχου όντας συμπληρωματικά προς αυτό και το οδηγούν στην καταστροφή μέσω ενεργοποίησης του συμπλέγματος RISC (311).

Τις αλληλουχίες για την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων (ON-TARGETplus SMARTpool) και τις αλληλουχίες μάρτυρες (scrambled) τις προμηθευτήκαμε από τη Dharmacon (Lafayette, USA). Οι αλληλουχίες RNA διαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο Opti-MEM® (Invitrogen, Carlsbad, USA) χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό και στη συνέχεια αναμείχθηκαν με λιπιδικό αντιδραστήριο διαμόλυνσης Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, USA) επίσης αραιωμένο σε opti-MEM σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το μείγμα επωάσθηκε για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για το σχηματισμό συμπλέγματος λιπιδίων με siRNA. Η διαμόλυνση έγινε στην τελική συγκέντρωση των 20nM siRNA σε εναιώρημα ενδοθηλιακών κυττάρων που επιστρώθηκε σε καλλιεργητικό πιάτο των 96 πηγαδιών ή τρυβλία των 60mm. Την ημέρα της διαμόλυνσης το καλλιεργητικό μέσο δεν περιείχε αντιβιοτικά για την αποφυγή τοξικότητας, ενώ την επόμενη ημέρα ξεκίνησε η έκθεση των κυττάρων στις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες.

## 2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ mRNA

Ο ανάλυση της έκφρασης mRNA συνίσταται στα εξής στάδια: α. απομόνωση ολικού RNA, β. Αντίστροφη μεταγραφή RNA και σύνθεση cDNA (complementary DNA), γ. ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης.

### 2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA) που επιτρέπει την απομόνωση RNA ταυτόχρονα με DNA και πρωτεΐνες. Η λύση των κυττάρων έγινε απευθείας σε καλλιεργητικό πιάτο των 6 πηγαδιών. Η διαδικασία είχε ως εξής: αναρροφήσαμε το θρεπτικό μέσο και διενεργήσαμε δύο πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια προσθέσαμε 1 ml TRIzol και πιπετάραμε πέντε φορές. Μεταφέραμε το εκχύλισμα των κυττάρων σε δοκιμαστικούς σωλήνες Eppendorf στείρους από RNAases. Επώασαμε το εκχύλισμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά προκειμένου να διευκολύνουμε την απελευθέρωση του RNA από τις νουκλεοπρωτεΐνες. Προσθέσαμε 0.2 ml χλωροφόρμιου, αναδεύσαμε έντονα για 15 sec και μετά επώασαμε για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρίσαμε το εκχύλισμα στα 12000 g σε θερμοκρασία 4°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των φάσεων. Από τη φυγοκέντριση προέκυψε η διαυγής υδατική φάση με το RNA, καθώς και οι μεσαία και οργανική ροζ χρώματος φάσεις με το DNA και τις πρωτεΐνες. Υπό γωνία 45 μοιρών αναρροφήσαμε την υδατική φάση και μεταφέραμε το περιεχόμενο σε καινούργιους δοκιμαστικούς σωλήνες. Προσθέσαμε 0.5 ml προπανολόλης, επώασαμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρίσαμε στα 12000g για 10 min στους 4°C ώστε να κατακρημνιστεί το RNA. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε πλύση του RNA με 1 ml αιθανόλης (75%) και φυγοκεντρίσαμε στα 7500 g για 5 min στους 4°C. Αφαιρέσαμε το υπερκείμενο και αφήσαμε το RNA για 10 min προκειμένου να στεγνώσει. Ακολούθησε ανασύσταση του RNA με νερό (30 μl) ελεύθερο από RNases και μετρήσαμε τη συγκέντρωση σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Αξιολογήσαμε μόνο δείγματα με λόγο  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ .

### 2.2.2 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) και σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση cDNA από ολικό RNA έγινε με τη χρήση του High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα αναλώσιμα ελεύθερα από RNases ενώ τα δείγματα και τα αντιδραστήρια παρέμεναν στον πάγο στους 4°C. Αρχικά ετοιμάστηκε το Master Mix αναμειγνύοντας 2μl από το ρυθμιστικό διάλυμα (RT Buffer) με 0.8 μl από το διάλυμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) συγκέντρωσης 100 mM, 2 μl από το μείγμα τυχαίων εκκινήτων (random primers), 1μl από το διάλυμα που περιείχε αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase) και 4.2 μl νερό ελεύθερο από RNases. Οι ανωτέρω ποσότητες κλιμακώθηκαν αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων. Στη συνέχεια αναμείχθηκαν 10 μl Master Mix με 10 μl RNA πιπιετάροντας δύο φορές πάνω-κάτω. Τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν ελάχιστα προκειμένου να κατέλθει το περιεχόμενο στον πυθμένα των σωληνίσκων και να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες που προέκυψαν από το πιπιετάρισμα.

Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Thermal Cycler) για να επωαστούν στις συνθήκες που αναγράφονται στον κάτωθι πίνακα (πίνακας 2.2) και να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

Βήματα	1	2	3	4
Θερμοκρασία (°C)	25	37	85	4
Χρόνος	10 min	120 min	5 min	∞

Πίνακας 2.2 Θερμικές συνθήκες της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Με το πέρας της αντίδρασης προστέθηκαν 180 μl νερό ελεύθερο από RNases και το cDNA μεταφέρθηκε στους (-80°) για αποθήκευση.

### 2.2.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συνιστά τη μέθοδο εκλογής για την ποσοτική ανάλυση του mRNA ενός γονιδίου ενδιαφέροντος. Η PCR επιτρέπει την εκθετική ενίσχυση περιοχής DNA με γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία μέσω διαδοχικών κύκλων διπλασιασμού. Κάθε κύκλος συνίσταται σε τρία βασικά στάδια: α. την αποδιάταξη της διπλής έλικας DNA (denaturation) μέσω αύξησης της θερμοκρασίας, β. την υβριδοποίηση (πρόσδεση) των εκκινήτων στο εκμαγείο DNA (annealing) μέσω ελάττωσης της θερμοκρασίας, γ. την επιμήκυνση (extension) των

εκκινητών σε θερμοκρασία ιδανική για την θερμό-σταθερή Taq πολυμεράση. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί σε διπλασιασμό της αλληλουχίας DNA σε κάθε κύκλο με αποτέλεσμα τη συσσώρευση θεωρητικά 2<sup>ν</sup> αντιγράφων μετά από ν κύκλους αντίδρασης με 100% απόδοση.

Σε αυτή τη μελέτη εφαρμόστηκε qPCR (quantitative PCR) που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του συμπληρωματικού DNA από το mRNA του γονιδίου ενδιαφέροντος. Σε αντιδιαστολή με τη συμβατική μέθοδο η ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR).

Χρησιμοποιήθηκε το SensiMix™ SYBR No-Rox kit (Bioline, London, UK), mastermix που περιέχει θερμό-σταθερή DNA πολυμεράση, φθορίζουσα ουσία SYBR® Green και δεόξυ-νουκλεοτίδια (dNTPs). Η αντίδραση κάθε δείγματος έγιναν εις τριπλούν σε πλαστικές πλάκες PCR των 96 ή 384 βοθρίων με τελικό όγκο 25 μl και 10 μl αντιστοίχως και συγκέντρωση σε primers 300 nM.

Οι θερμικές συνθήκες της αντίδρασης περιελάμβαναν επώαση των 10 min στους 95°C για την ενεργοποίηση της πολυμεράσης και στη συνέχεια 40 κύκλους με τα εξής στάδια (πίνακας 2.3):

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη	95°C	15 sec
Υβριδοποίηση	60°C	15 sec
Επιμήκυνση	72°C	15 sec

**Πίνακας 2.3 Θερμικές συνθήκες της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.**

Η αντίδραση έγινε στο θερμικό κυκλοποιητή 7900HT Fast RealTime-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο 2(-ΔΔ Ct) (312). Οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν οι εξής (πίνακας 2.4):

Γονίδιο	Πρόσθιος εκκινητής	Αντίστροφος εκκινητής
β-actin	GAGGAGGCACCGGTAAATG	GTCACCTCACTGGGACATAGGC
Gapdh	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
Hes1	AGTGAAGCACCTCCGGAAC	CGTTCATGCACTCGCTGA
Hey1	CGAGCTGGACGAGCCCAT	GGAACCTAGAGCCGAACTCA
Vegfr2	GAACATTTGGGAAATCTCTT GC	CGGAAGAACAATGTAGTCTTTG C

**Πίνακας 2.4 Αλληλουχίες εκκινητών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.**



## 2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting) κατά Western Blot. Για την ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης απαιτούνται τα εξής στάδια: α. απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών, β. υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, γ. ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, δ. μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, ε. κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης και επώαση με αντισώματα, στ. ανοσοαποτύπωση κατά western, ζ. ποσοτικοποίηση.

### 2.3.1 Απομόνωση εκχυλίσματος πρωτεϊνών

Απομονώσαμε είτε εκχύλισμα ολικών πρωτεϊνών του κυττάρου είτε εκχύλισμα προερχόμενο από τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

α. Για την απομόνωση εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών του κυττάρου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- i) Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από καλλιεργητικά τρυβλία των 100 mm, μεταφορά στον πάγο στους 4°C και διενέργεια 2 πλύσεων με παγωμένο PBS.
- ii) Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος RIPA (**R**adio**i**mmuno**p**recipitation **a**ssay buffer) απευθείας στο κυτταρικό τρυβλίο. Το διάλυμα RIPA είχε την εξής σύσταση: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 0.1% SDS, 0.5% δεοξυχολικό νάτριο, 1.0% IGEPAL® CA-630, αναστολείς πρωτεασών (cOmplete™ Mini tablets, Roche) και φωσφατασών (PhosSTOP™ tablets, Roche). Ακολούθησε απόξεση (scraping) του στρώματος των κυττάρων και λύση στο καλλιεργητικό τρυβλίο.
- iii) Μεταφορά του εκχυλίσματος σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες και επώαση στον πάγο για 30 min με ανάδευση στο vortex για 30 sec ανά 5 min.
- iv) Φυγοκέντριση στα 15,000 g για 20 min στους 4°C. Συλλογή του υπερκείμενου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και μεταφορά σε νέους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες για αποθήκευση τους -80°C.

β. Προκειμένου να εξετάσουμε τη μετακίνηση πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα διενεργήσαμε κλασματοποίηση των υποκυτταρικών δομών. Για την απομόνωση πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- i) Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, μεταφορά των τρυβλίων στον πάγο στους 4°C και διενέργεια δύο πλύσεων με παγωμένο PBS. Μετά την προσθήκη 1 ml παγωμένου PBS, πραγματοποιήθηκε απόξεση του κυτταρικού στρώματος με Rubber Policeman με γρήγορες και ήπιες κινήσεις προκειμένου να αποφευχθεί η κυτταρική

βλάβη. Ακολούθησε συλλογή των αποκολλημένων κυττάρων με 5 ml παγωμένου PBS και φυγοκέντριση του εναιωρήματος για 5 min στους 4°C στα 400 g.

ii) Επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 2 ml παγωμένου υποτονικού ρυθμιστικού διαλύματος [10 mM HEPES buffer, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl] στο οποίο προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών [1 mM PMSF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF]. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 400 g στους 4°C για 5 min.

iii) Επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 100 μl από το ανωτέρω διάλυμα στο οποίο προστέθηκε Nonidet P-40 τελικής συγκέντρωσης 0.1%. Ακολούθησε ανάδευση στο vortex για 30 sec και επώαση για 10 min στον πάγο με αποτέλεσμα τη λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ενώ οι πυρήνες παρέμεναν άθικτοι.

iv) Φυγοκέντριση στα 10000 g στους 4°C για 10 min προκειμένου να συλλεχθεί το κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Το εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε νέους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

v) Ακολούθησε επαναιώρηση του ιζήματος με 50 μl παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος [20 mM HEPES, 25% glycerol, 450 mM KCl, 1 mM EDTA] στο οποίο προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών [1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM dithiothreitol, 1 mM NaF] προκειμένου να πραγματοποιηθεί λύση των πυρήνων. Το εναιώρημα επωάστηκε στον πάγο για 30 min και αναδεύτηκε για 30 sec ανά 5 min στο vortex. Με το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 15,000 g για 20 min. Το υπερκείμενο πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε νέους μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

### **2.3.2 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος**

Υπολογίσαμε τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας τη χρωματομετρική δοκιμασία DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) που αποτελεί παραλλαγή της δοκιμασίας Lowry (313).

Εν ολίγοις, ετοιμάσθηκαν διαδοχικές αραιώσεις αλβουμίνης από βόειο ορό (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια διανεμήθηκαν εις τριπλούν 5 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και 5 μl αλβουμίνης στα βοθρία λευκού χρώματος μικροπλάκας (microplate) συμβατής με τη δοκιμασία χημειοφωταύγειας. Ακολούθησε προσθήκη 25 μl αλκαλικού διαλύματος ιόντων χαλκού παρουσία τρυγικού οξέος που προέκυψε από την ανάμειξη των διαλυμάτων "Α" και "S" του kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος προστέθηκαν 200 μl αντιδραστηρίου "B" (Folin

Reagent). Ακολούθησε προσεκτική ανακίνηση της μικροπλάκας και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Με το πέρας της επώασης μετρήθηκε η απορρόφηση (Absorbance) στο μήκος κύματος των 750 nm στο φασματοφωτόμετρο SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε από εξίσωση πρότυπης καμπύλης που προέκυψε από την αντιστοίχιση γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης με μετρούμενες απορροφήσεις.

### 2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Running)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (sodium dodecyl sulfate), κοινώς SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), αποτελεί το πρώτο βήμα της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή που αποτελείτο από δύο μέρη: την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) [5% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.0 M Tris-HCL pH: 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED] στο πάνω μέρος και την πηκτή διαχωρισμού [7.5% ή 10% ακρυλαμίδιο, 1.5 M Tris-HCL pH:8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.04% (v/v) TEMED] από κάτω. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των πόρων χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού με τελική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 7.5% για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μοριακού βάρους άνω των 100 kDa και 10% για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μοριακού βάρους μικρότερου των 100 kDa.

Ο σχηματισμός της πηκτής περιλάμβανε τα εξής βήματα: έγχυση του μείγματος της πηκτής διαχωρισμού στο εκμαγείο των δύο γυάλινων πλακών του συστήματος Mini-PROTEAN® Tetra Handcast (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), προσθήκη TEMED προκειμένου να καταλυθεί ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Ακολούθησε η προσθήκη του μείγματος της πηκτής επιστοίβαξης μαζί με TEMED και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για ακόμη 30 min προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της πηκτής επιστοίβαξης.

Στη συνέχεια ετοιμάσθηκαν τα δείγματα. Εν ολίγοις, 20 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης Laemmli (4x) [250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 40% Glycerol, 8% Betamercaptoethanol, 0.04% Bromophenol blue] σε αναλογία 3:1. Το μείγμα επωάστηκε στους 95°C για 5 min προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών υπό την επίδραση SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης. Το SDS ξετυλίγει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και καταστρέφει τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και προσδίδει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο καθιστώντας αμελητέο το ίδιο φορτίο των πρωτεϊνών. Από την άλλη η β-

μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταστρέφει την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους. Ως εκ τούτου οι αποδιαταγμένες πλέον πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες με χαμηλότερο μοριακό βάρος μεταναστεύουν ταχύτερα καταλαμβάνοντας χαμηλότερες θέσεις στο ηλεκτροφερόγραμμα.

Στη συνέχεια το σύστημα των γυάλινων πλακών με την πηκτή τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Η συσκευή μεταφέρθηκε στη δεξαμενή (Bio-Rad Laboratories) με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 25 mM Tris-base, 250 mM Glycine, 0.1% SDS) και τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγάδια της πηκτής ενώ στο πρώτο πηγάδι τοποθετήθηκαν 5  $\mu$ l από το size marker BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA). Ακολούθως τοποθετήθηκε το κάλυμμα με τα ηλεκτρόδια (Bio-Rad Laboratories) τα οποία συνδέθηκαν στην τροφοδοτική συσκευή PowerPac™ Power Supply (Bio-Rad Laboratories). Τέλος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα 100 Volt για 60 min.

#### **2.3.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF**

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η διαδικασία της υγρής μεταφοράς (wet transfer). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη PVDF (Amersham Hybond P) εντός δεξαμενής με ειδικό διάλυμα (transfer buffer: 25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, 20% (v/v) methanol).

Εν ολίγοις με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή αφαιρέθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε στο διάλυμα μεταφοράς. Η υδρόφοβη μεμβράνη PVDF επωάστηκε στη μεθανόλη για 30 sec προκειμένου να ενεργοποιηθεί και μετά από τρεις γρήγορες πλύσεις με απιονισμένο νερό μεταφέρθηκε στο διάλυμα μεταφοράς μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά του sandwich, πηκτή, διηθητικό χαρτί Whatman και σπόγγο υαλοβάμβακα προκειμένου να εμποτιστεί με το διάλυμα. Ακολούθησε η συναρμολόγηση της κασετίνας με την εξής διάταξη: μαύρη επιφάνεια κασετίνας (άνοδος) - σπόγγος υαλοβάμβακα - δύο στρώσεις χαρτιού Whatman - μεμβράνη PVDF - πηκτή - δύο στρώσεις χαρτιού Whatman - σπόγγος υαλοβάμβακα - κόκκινη επιφάνεια της κασετίνας (κάθοδος). Κάθε φορά που γινόταν η τοποθέτηση ενός συστατικού του sandwich ακολουθούσε έγχυση διαλύματος μεταφοράς και ρολάρισμα με ογκομετρικό κύλινδρο προκειμένου να αποφευχθεί η παγίδευση φυσαλίδων αέρα. Στη συνέχεια η κασετίνα τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

USA) εντός της δεξαμενής με το διάλυμα. Ακολούθησε η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων και η εφαρμογή τάσης στα 30 Volt για 16 hrs στους 4° C προκειμένου να μεταφερθούν πρωτεΐνες άνω των 100 kDa ή 100 Volt για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να μεταφερθούν πρωτεΐνες χαμηλότερου μοριακού βάρους.

### 2.3.5 Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης (blocking) και επώαση με αντισώματα

Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF πραγματοποιήθηκαν τρεις γρήγορες πλύσεις με απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί το διάλυμα μεταφοράς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κάλυψη των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης (blocking) επωάζοντας με άπαχο γάλα 5% (w/v) διαλυμένο σε Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBST) [50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5] για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Η πρωτεΐνη καζεΐνη του γάλακτος προσδένεται στις ακάλυπτες θέσεις της μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μη ειδική σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων. Ωστόσο για την ανάλυση φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα παρεμπόδισης από βόειο ορό αλβουμίνης BSA (Bovine Serum Albumin) 5% (w/v) διαλυμένο σε TBST δεδομένου ότι η καζεΐνη ως φωσφοπρωτεΐνη ανιχνεύεται από αντισώματα έναντι φωσφορυλιωμένων θέσεων. Ακολούθησαν τρεις γρήγορες πλύσεις με TBST προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια γάλακτος. Στη συνέχεια προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της επιθυμητής προς ανίχνευση πρωτεΐνης επωάζοντας στους 4°C υπό ανάδευση ολόκληρη τη νύχτα. Τα αντισώματα και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2.5). Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με TBST για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια πρωτογενούς αντισώματος. Ακολούθησε επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (1:1000) διαλυμένο σε άπαχο γάλα 5% (w/v) σε διάλυμα TBST για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει το Fc τμήμα του πρωτογενούς του ίδιου είδους προέλευσης και είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του αγριοράπανου (HRP: Horseradish Peroxidase) που καταλύει την αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Πρωτογενές αντίσωμα (πρωτεΐνη στόχος)	Τύπος-προέλευση-πηγή διάθεσης	Αραίωση-διάλυμα παρεμπόδισης	Δευτερογενές αντίσωμα

Notch1	Cell Signaling (#3608)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
Notch Intracellular Domain (NICD)	Cell Signaling (#2421)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
VEGFR2	Cell Signaling (#2479)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
Phospho-VEGFR2	Cell Signaling (#2478)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
NFKB-p50	Santa Cruz Biotechnology (sc-1190)	1:500 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Goat (Santa Cruz Biotechnology)
NFKB-p65	Santa Cruz Biotechnology (sc-372)	1:500 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
p27 <sup>Kip</sup>	Cell Signaling (#2552)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology (sc-509)	1:500 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Mouse (Santa Cruz Biotechnology)
Bax	Santa Cruz Biotechnology (sc-493)	1:500 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
HIF1α	BD Transduction Laboratories™ (610958)	1:1,000 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Mouse (Santa Cruz Biotechnology)

ERK	Cell Signaling (#9101)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
Phospho-ERK	Cell Signaling (#4695)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
Akt	Cell Signaling (#9272)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
Phospho-Akt	Cell Signaling (#4058)	1:1,000 σε BSA 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Rabbit (Santa Cruz Biotechnology)
β-actin	Sigma (HRP συζευγμένο)	1:10,000 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	
Lamin B	Santa Cruz Biotechnology (sc-6216)	1:500 σε άπαχο γάλα 5% (w/v)	1:2,000 Anti-Goat (Santa Cruz Biotechnology)

**Πίνακας 2.5 Αντισώματα, προέλευση και αραιώσεις.**

### 2.3.6 Ανίχνευση πρωτεϊνών

Με την ολοκλήρωση της επώασης του δευτερογενούς αντισώματος πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις με TBST για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η ανίχνευση της μπάντας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με την προσθήκη υποστρώματος ECL (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) που έχει ως αποτέλεσμα την κατάλυση της οξειδωσης του luminol από την HRP και την εκπομπή φωτός. Εν συντομία, διάλυμα luminol αναμείχθηκε με οξειδωτικό παράγοντα σε αναλογία 1:1. Ακολούθησε η επικάλυψη της μεμβράνης με το μείγμα και επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μπάντες ανιχνεύθηκαν στο ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Μετά την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος ακολούθησε η ανίχνευση της β-actin που χρησίμευσε ως μάρτυρας ισότιμης φόρτωσης για κυτταροπλασματικά ή ολικά εκχυλίσματα του κυττάρου και της lamin-B για πυρηνικά εκχυλίσματα. Πραγματοποιήθηκαν τρεις σύντομες πλύσεις με TBST για την απομάκρυνση του διαλύματος ECL και

ακολουθήθηκε η ανωτέρω διαδικασία για την ανίχνευση της lamin-B. Αναφορικά με την ανίχνευση της β-actin πραγματοποιήθηκε επώαση με αντίσωμα έναντι της β-actin απευθείας συζευγμένο με HRP (sigma) διαλυμένο σε άπαχο γάλα 5% (w/v)/TBST σε αραιώση 1:10,000 για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν πλύσεις με TBST για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος και ανίχνευση ως ανωτέρω.

### **2.3.7 Ποσοτικοποίηση**

Η ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας των πρωτεϊνικών μπαντών έγινε με το λογισμικό ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Για τη διόρθωση των σφαλμάτων φόρτωσης η έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος κανονικοποιήθηκε προς την έκφραση της β-actin για κυτταροπλασματικά και ολικά εκχυλίσματα του κυττάρου και lamin-B για πυρηνικά εκχυλίσματα.



## 2.4 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι τεχνική της αναλυτικής βιολογίας που επιτρέπει το διαχωρισμό κυττάρων βάσει φυσικών ή βιολογικών χαρακτηριστικών. Εν ολίγοις, τα κύτταρα ενός εναιωρήματος περνούν ένα προς ένα ειδικό κανάλι και ακτινοβολούνται από δέσμη laser. Στη συνέχεια αισθητήρες συλλέγουν το φως που σκεδάζεται ή εκπέμπεται από αυτά. Η ανίχνευση του σκεδαζόμενου φωτός υπό γωνία 2° έως 28° αφορά στην πρόσθια σκέδαση (forward scatter) και αποτελεί παράμετρο ενδεικτική του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η ανίχνευση υπό γωνία 90° αφορά στην πλάγια σκέδαση (side scatter) και αποτελεί παράμετρο ενδεικτική της κοκκίωσης. Από την άλλη τα κύτταρα μπορεί να σημανθούν με φθορίζουσα ουσία και να εκπέμπουν ακτινοβολία μετά από διέγερση με τη δέσμη laser.

Στη συνέχεια το σήμα ψηφιοποιείται και τα δεδομένα αναλύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανίχνευση κάθε κυττάρου αντιστοιχεί σε ένα γεγονός (event). Το λογισμικό του κυτταρομέτρου αναλύει την ένταση σήματος από κάθε event χωριστά και δημιουργεί διαγράμματα με τη μορφή ιστογράμματος ή διπαραμετρικού σημειογραφήματος σε περίπτωση ανάλυσης δύο παραμέτρων ταυτόχρονα. Τέλος δίνεται η δυνατότητα οριοθέτησης πληθυσμού (gating) κυττάρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά προκειμένου να αναλυθούν επιπλέον παράμετροι.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη της απόπτωσης, του κυτταρικού κύκλου και των επιπέδων του ανιόντος του σουπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια.

### 2.4.1 Ανάλυση της απόπτωσης

Η απόπτωση αναλύθηκε με τη δοκιμασία annexin V - PI (Propidium Iodine). Το μόριο της annexin V έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης στο φωσφολιπίδιο, φωσφατιδυλοσερίνη. Η φωσφατιδυλοσερίνη εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Ωστόσο κατά την απόπτωση μετατοπίζεται στην εξωτερική πλευρά και μπορεί να ανιχνευθεί από τη συζευγμένη με φθορίοχρωμα annexin V. Επιπλέον το PI είναι φθορίζουσα ουσία που διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και προσδένεται στο DNA χρησιμεύοντας ως δείκτης νέκρωσης. Συνεπώς τα αποπτωτικά και νεκρά κύτταρα μπορεί να ανιχνευθούν από την annexin V και το PI αντίστοιχα. Τα κύτταρα που προσλαμβάνουν annexin V εμπίπτουν στην κατηγορία των κυττάρων που βρίσκονται στην αρχική φάση της απόπτωσης ενώ τα κύτταρα που προσλαμβάνουν annexin V και PI συνιστούν κύτταρα της καθυστερημένης φάσης της απόπτωσης.

Εν ολίγοις, κύτταρα εκτέθηκαν στις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες, θρυψινοποιήθηκαν, υποβλήθηκαν σε μία πλύση με PBS και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης στην αραιώση των  $10^5$  κυττάρων/100μl. Στη συνέχεια προστέθηκε PI στην τελική συγκέντρωση του 1 μg/ml και Annexin V συζευγμένη με AlexaFluor 647 σε αραιώση 1/100. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν για annexin V στο κανάλι FL8 και PI στο κανάλι FL3 στο FACS Analyzer CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, USA). Τα αντιδραστήρια προήλθαν από τη Molecular Probes (Eugene, USA).

#### **2.4.2 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου**

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έγινε με ποσοτικοποίηση του DNA με PI. Η ανάλυση στηρίζεται στην αρχή ότι τα κύτταρα στην S φάση της αντιγραφής έχουν μεγαλύτερη ποσότητα DNA από ότι τα κύτταρα στην G1 φάση, ενώ τα κύτταρα στη G2 φάση μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής έχουν διπλάσια ποσότητα από ότι τα κύτταρα στην G1 φάση.

Εν ολίγοις, HUVEC εκτέθηκαν στις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες, θρυψινοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε μία πλύση με PBS. Ακολούθησε επώαση με παγωμένη αιθανόλη (70%) για μία νύχτα στους 4°C προκειμένου να διαπερατοποιηθεί η μεμβράνη των κυττάρων και να προσληφθεί το PI. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις με PBS. Ακολούθησε επώαση με ριβονουκλεάση I (20 μg/ml) προκειμένου να καταβολιστεί το RNA (το οποίο σημειωτέον συνδέεται με PI) και PI (100 μg/ml) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ακολούθησε ανάλυση σε FACS Analyzer CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, USA) στο κανάλι FL3. Τα αντιδραστήρια προήλθαν από τη Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) και η ποσοτικοποίηση έγινε με το λογισμικό FlowJo v.10 (Tree Star, Ashland, USA) βάσει του αλγόριθμου της κατασκευάστριας εταιρίας.

#### **2.4.3 Ανάλυση των επιπέδων ανιόντος του σουπεροξειδίου στο μιτοχόνδριο**

Για την ανάλυση των επιπέδων του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) του μιτοχονδρίου χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο MitoSOX™ (Molecular Probes, Eugene, USA). Η οξειδωση του MitoSOX™ γίνεται αποκλειστικά στο μιτοχόνδριο από το O<sub>2</sub><sup>-</sup> χωρίς τη συμμετοχή άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου προκαλώντας φθορισμό στα 580 nm. Εν ολίγοις, MitoSOX™ προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων στην τελική συγκέντρωση των 5 μM. Ακολούθησε επώαση 45 min. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε, το κυτταρικό στρώμα αποξέσθηκε και τα

κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS. Για τα πειράματα που έγιναν σε συνθήκες υποξίας η διαδικασία πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά στον υποξικό θάλαμο εργασίας ώστε να αποφευχθεί η επανοξυγόνωση των κυττάρων. Το εναιώρημα των κυττάρων σφραγίστηκε αεροστεγώς και αναλύθηκε στο FACS Analyzer Cyan ADP (Beckman Coulter, Brea, USA) στο κανάλι FL2.

## 2.5 ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (indirect immunofluorescence)

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση, εντοπισμό και μερική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε κύτταρα που έχουν μονιμοποιηθεί. Εν ολίγοις, η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος συνδέεται με πρωτογενές αντίσωμα στο οποίο στη συνέχεια προσδένεται δευτερογενές που αναγνωρίζει το Fc τμήμα του πρωτογενούς και είναι συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία.

Κύτταρα HUVEC αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες (cover slip) διαμέτρου 10 mm εντός πηγαδιού πλάκας 24 πηγαδιών. Μετά την έκθεση στις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε και έγιναν τρεις πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να μονιμοποιηθούν. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS και επώαση με 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να διαπερατοποιηθεί η μεμβράνη και να καταστεί εφικτή η είσοδος των αντισωμάτων στο κύτταρο. Ακολούθησε επώαση με 5% βόειο ορό αλβουμίνης για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης και στη συνέχεια επώαση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος β-tubulin (clone TUB 2.1, T4026, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) αραιωμένο (1:200) σε 5% βόειο ορό αλβουμίνης για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS των 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα σσημασμένο με Alexa Fluor 555 (A31570, Life technologies, Carlsbad, USA) αραιωμένο (1:400) σε 5% βόειο ορό αλβουμίνης για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Με το πέρας της επώασης έγιναν τρεις πλύσεις με PBS στο σκοτάδι. Ακολούθησε η επίθεση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες χρησιμοποιώντας το στερεωτικό μέσο ProLong® Gold Antifade Mountant (Molecular Probes, Eugene, Oregon) το οποίο παρεμποδίζει την εξασθένιση του φθορισμού και εξασφαλίζει χρώση των πυρήνων με DAPI. Ακολούθως τα δείγματα εξετάστηκαν στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού Axio Observer Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## **2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το GraphPad prism v.5. Χρησιμοποιήθηκε t-test για σύγκριση αποτελεσμάτων από δύο ομάδες και one way anova (Tukey test) για σύγκριση αποτελεσμάτων από περισσότερες από δύο ομάδες. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05.



## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ *in vitro*

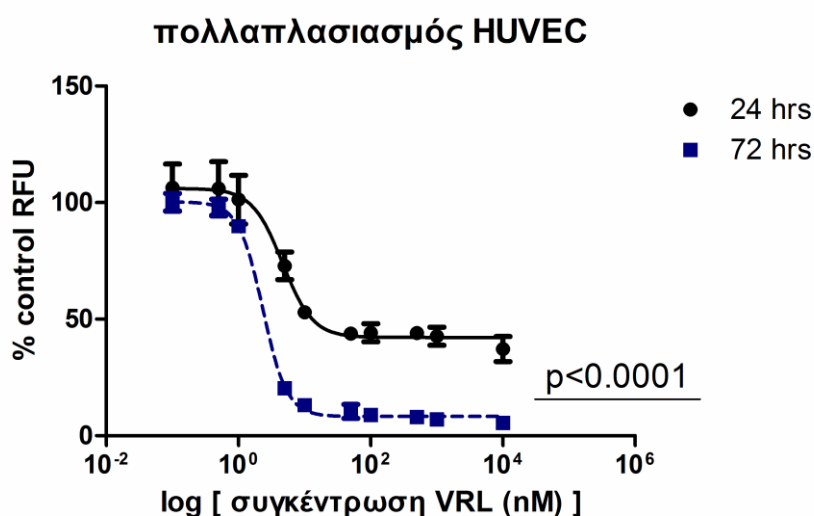
Η αγγειογένεση με εκβλάστηση (sprouting angiogenesis) είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει την εκβλάστηση (sprouting), μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και σχηματισμό «σωλήνων» από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Προκειμένου να μελετήσουμε την αντιαγγειογενετική δράση της βινορελμπίνης, εξετάσαμε τις ανωτέρω λειτουργίες *in vitro*.

#### 3.1.1 Η επίδραση της βινορελμπίνης στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC

Αρχικά εξετάσαμε τον πολλαπλασιασμό των HUVEC με τη δοκιμασία CyQUANT δεδομένου ότι ο πολλαπλασιασμός είναι ένα κρίσιμο βήμα της αγγειογένεσης (314).

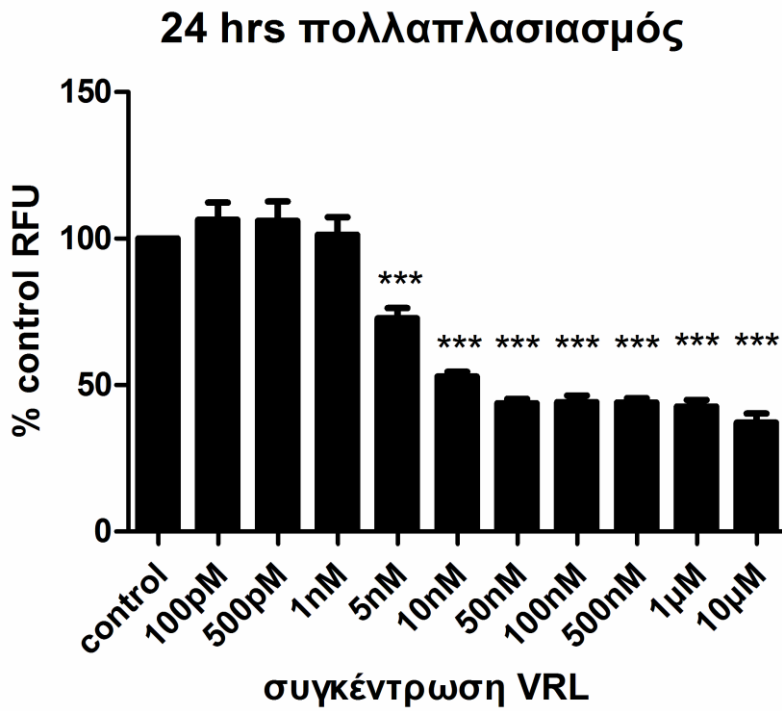
Παρατηρήσαμε ότι η βινορελμπίνη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των HUVEC με δόσο-εξαρτώμενο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Η βινορελμπίνη ήταν πιο αποτελεσματική στην έκθεση των 72 hrs σε σχέση με την έκθεση των 24 hrs (Εικ 3.1Α). Επιπλέον η βινορελμπίνη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό σε συγκεντρώσεις άνω των 5nM στην έκθεση των 24 hrs (Εικ 3.1Β) και άνω του 1nM στην έκθεση των 72 hrs (Εικ 3.1Γ). Τέλος η μετρονομική συγκέντρωση των 10nM (64) ανέστειλε πιο αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό στο παρατεταμένο πρωτόκολλο των 72 hrs συγκριτικά με τη συγκέντρωση του 1μM που προσομοιάζει τη μέγιστη ανεκτή (315) στο σύντομο πρωτόκολλο των 24 hrs (87% versus 57% αναστολή,  $p < 0.0001$ ) (Εικ 3.1Δ).

A

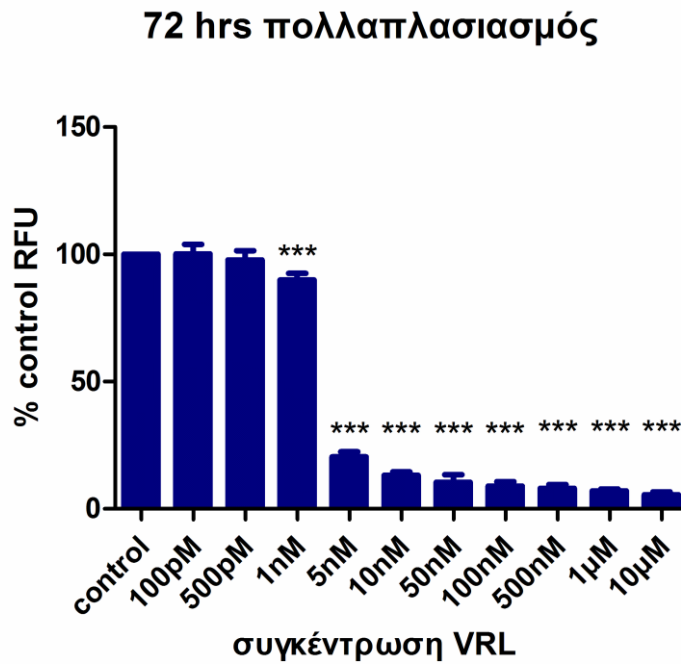




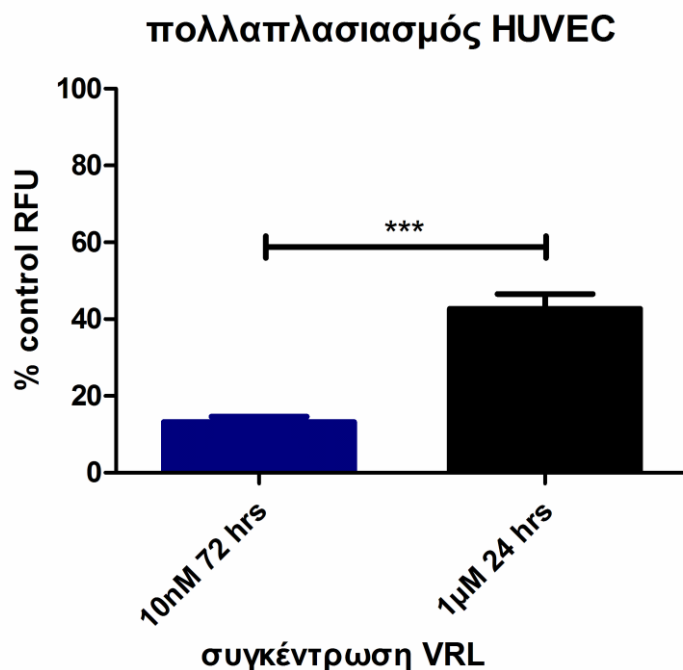
**Β**



**Γ**



Δ



**Εικ 3.1 Η επίδραση της VRL στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία cyquant.** (Α) Η επίδραση του χρόνου επώασης στον πολλαπλασιασμό των HUVEC που εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων VRL. (Β) Η επίδραση των διαδοχικών συγκεντρώσεων VRL στον πολλαπλασιασμό των HUVEC σε έκθεση 24 hrs. (Γ) Η επίδραση των διαδοχικών συγκεντρώσεων VRL στον πολλαπλασιασμό των HUVEC σε έκθεση 72 hrs. (Δ) Πιο αποτελεσματική αναστολή του πολλαπλασιασμού των HUVEC από 10nM VRL για 72 hrs σε σύγκριση με 1µM VRL για 24 hrs. Ο πολλαπλασιασμός (άξονας Y) προσδιορίστηκε με τη Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένη στον αντίστοιχο μάρτυρα (control) στις 24 hrs ή 72 hrs. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Α. Two way anova, Interaction ( $p < 0.0001$ ). Β, Γ. One way anova, \*\*\*  $p < 0.001$  έναντι control. Δ, unpaired t-test, \*\*\* $p < 0.001$ .

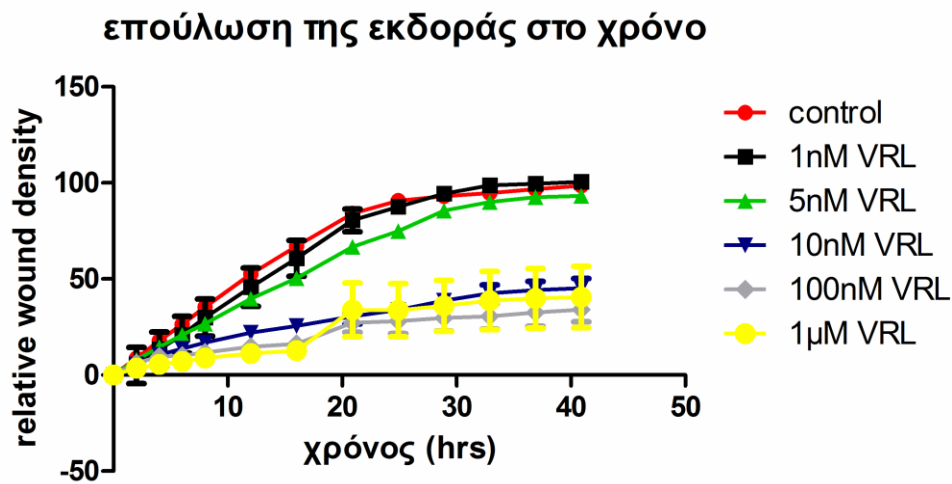
### 3.1.2 Η επίδραση της βινορελμπίνης στη μετανάστευση (migration) των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC

Στη συνέχεια εξετάσαμε τη μετανάστευση (migration) των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη δοκιμασία επούλωσης (wound healing assay). Μελετήσαμε την επίδραση ενός εύρους συγκεντρώσεων βινορελμπίνης σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης (time course). Παρατηρήσαμε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της επούλωσης στο χρόνο. Η συγκέντρωση του 1 nM βινορελμπίνης δεν είχε καμία επίδραση στη μετανάστευση,

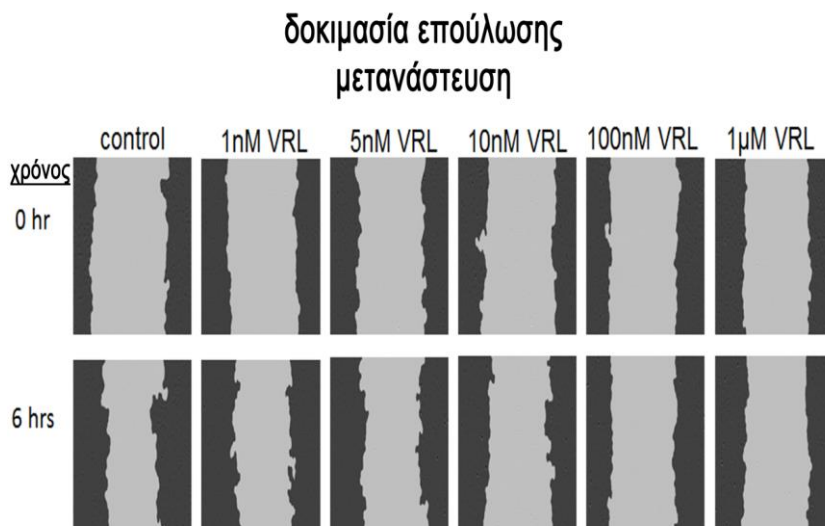
τα 5nM βινορελμπίνης καθυστέρησαν τη σύγκλειση της εκδοράς ενώ συγκεντρώσεις άνω των 10nM εμπόδισαν πλήρως τη σύγκλειση (Εικ 3.2A).

Προκειμένου να αποφύγουμε την παρεμβολή της αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης της βινορελμπίνης στο αντί-μεταναστευτικό αποτέλεσμα εστιάσαμε στο χρονικό σημείο των 6 hrs που είναι ένα εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα για την εκδήλωση μεταβολών στον πολλαπλασιασμό. Διαπιστώσαμε ότι τα 5nM, 10nM, 100nM και 1μM βινορελμπίνης ανέστειλαν την επούλωση κατά 21% ( $p < 0.05$ ), 48% ( $p < 0.001$ ), 62% ( $p < 0.001$ ) και 73% ( $p < 0.001$ ) αντιστοίχως στις 6 hrs, όπως προκύπτει από τις εικόνες σύγκλεισης της εκδοράς (Εικ 3.2B) και την ποσοτικοποίησή τους (Εικ 3.2Γ).

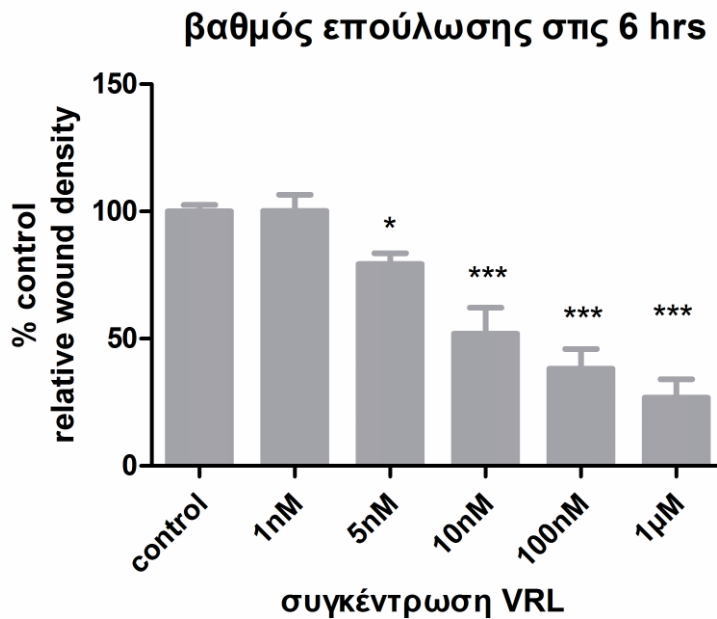
**A**



**B**



Γ



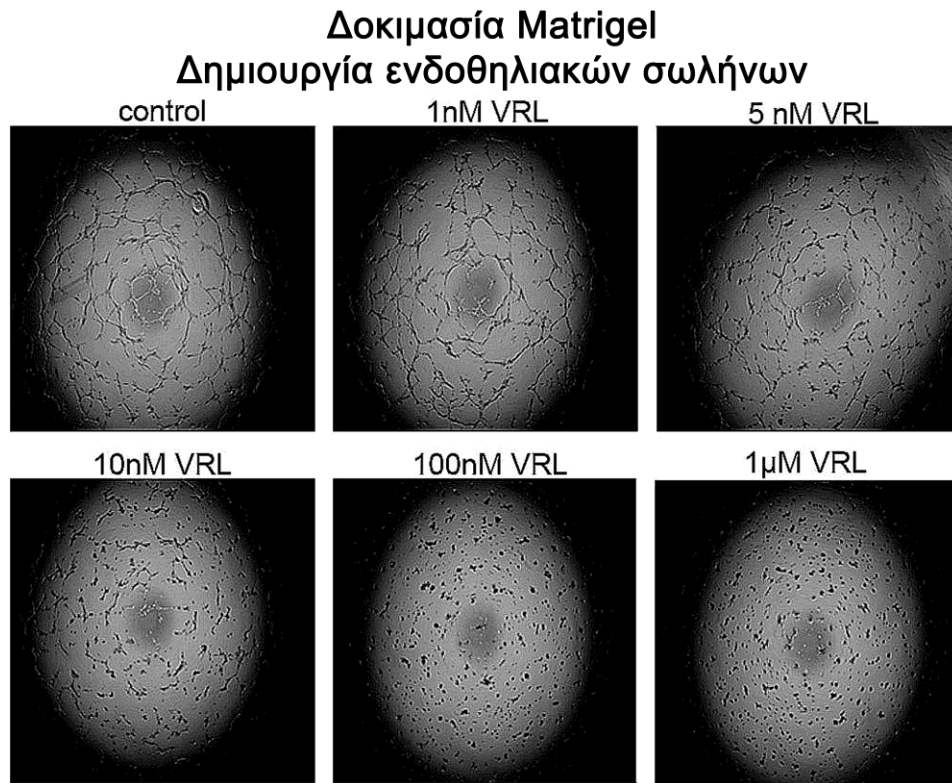
**Εικ 3.2 Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία επούλωσης.** Α. Η κατάληψη της εκδοράς από τα HUVEC όπως προσδιορίστηκε με την παράμετρο relative wound density. Β. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το μέτωπο της εκδοράς στα χρονικά σημεία των t:0 και t:6 hrs. Σημειώνεται η αύξηση της απόστασης των χειλέων της εκδοράς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της VRL. Γ. Δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της επούλωσης στις 6 hrs όπως προσδιορίστηκε με την παράμετρο relative wound density κανονικοποιημένη στο control. Η Relative wound density υποδηλώνει την κατάληψη της εκδοράς από το στρώμα των ενδοθηλιακών κυττάρων στο χρόνο. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές  $\pm$  SD από τρία πειράματα. Γ. One way anova, \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  έναντι control.

### 3.1.3 Η επίδραση της βινορελμπίνης στη δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων (tube formation)

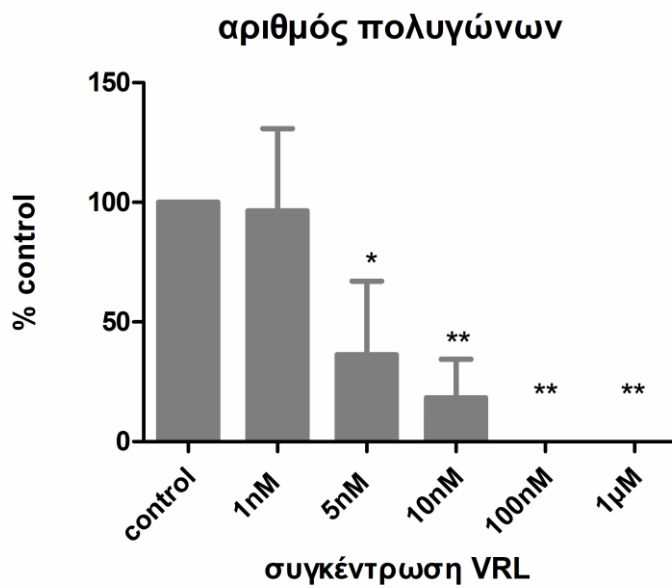
Προκειμένου να μελετήσουμε τη δυνατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να σχηματίζουν τριχοειδικές δομές εξετάσαμε το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων (tube formation) με τη δοκιμασία matrigel (matrigel assay). Μελετήσαμε την επίδραση της βινορελμπίνης στις 6 hrs προκειμένου να αποφύγουμε την παρεμβολή της τοξικής επίδρασης που έχει στο σχηματισμό των εν λόγω δομών. Παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή (εικ. 3.3A). Το 1nM βινορελμπίνης δεν είχε καμία επίδραση, τα 5nM και 10nM κατέστειλαν κατά 64% ( $p < 0.05$ ) και 82% ( $p < 0.01$ )

αντίστοιχα τη διαδικασία ενώ τα 100nM και 1μM κατέστειλαν εξολοκλήρου ( $p < 0.01$ ) το σχηματισμό πλέγματος από ενδοθηλιακούς σωλήνες (εικ. 3.3B).

**A**



**B**



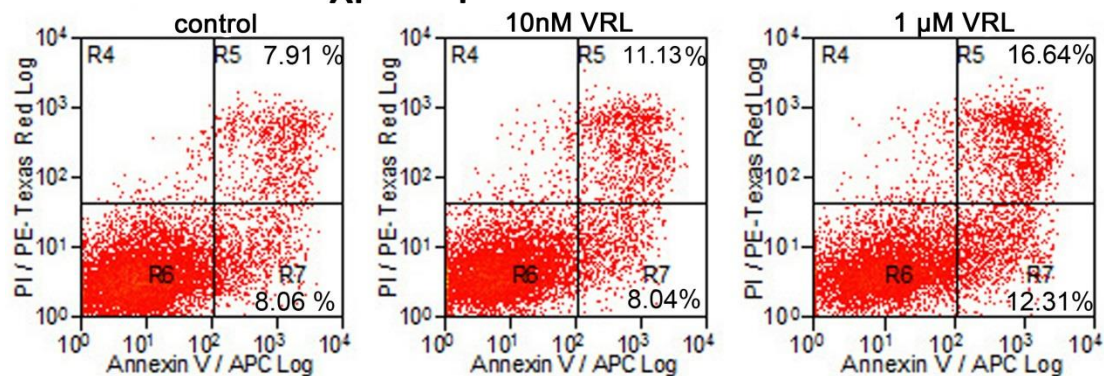
**Εικ 3.3 Σχηματισμός ενδοθηλιακών σωλήνων (tube formation) με τη δοκιμασία matrigel (matrigel assay).** Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες που καταδεικνύουν καταστολή του πλέγματος ενδοθηλιακών σωλήνων αυξανόμενης της συγκέντρωσης VRL. Β. Ποσοτικοποίηση βάσει του αριθμού πολυγωνικών σχηματισμών εντός του πλέγματος ενδοθηλιακών σωλήνων. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  έναντι control.

### 3.1.4 Απουσία τοξικότητας της μετρονομικής βινορελμπίνης στη σύντομη έκθεση των 6 hrs

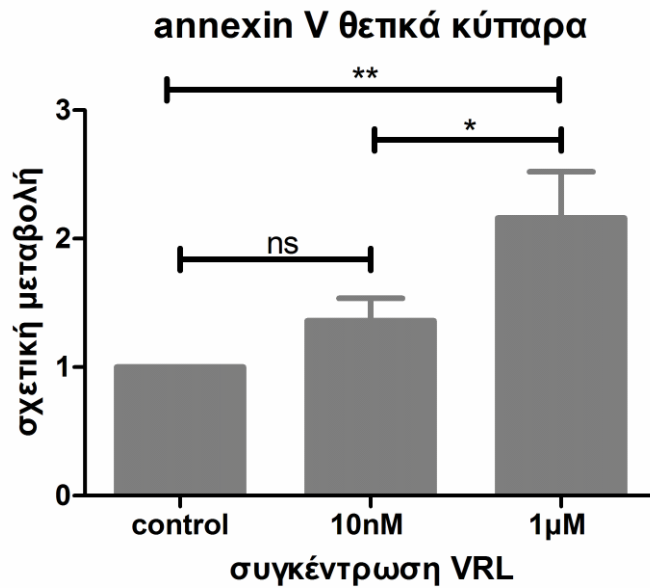
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η ανασταλτική επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στις λειτουργίες της μετανάστευσης και του σχηματισμού ενδοθηλιακών σωλήνων δεν οφείλεται σε τοξικότητα του φαρμάκου, μελετήσαμε την επίδραση στην απόπτωση στις 6 hrs με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (FACS) (Εικ 3.4A). Τα 10 nM βινορελμπίνης δεν αύξησαν τον αριθμό των κυττάρων που ήταν θετικά για annexin V. Ωστόσο το 1  $\mu$ M που προσομοιάζει τη μέγιστη ανεκτή δόση αύξησε τα αποπτωτικά κύτταρα κατά 2.16-φορές ( $p < 0.01$ ) (Εικ 3.4B).

**A**

### χρώση Annexin V - PI



**B**



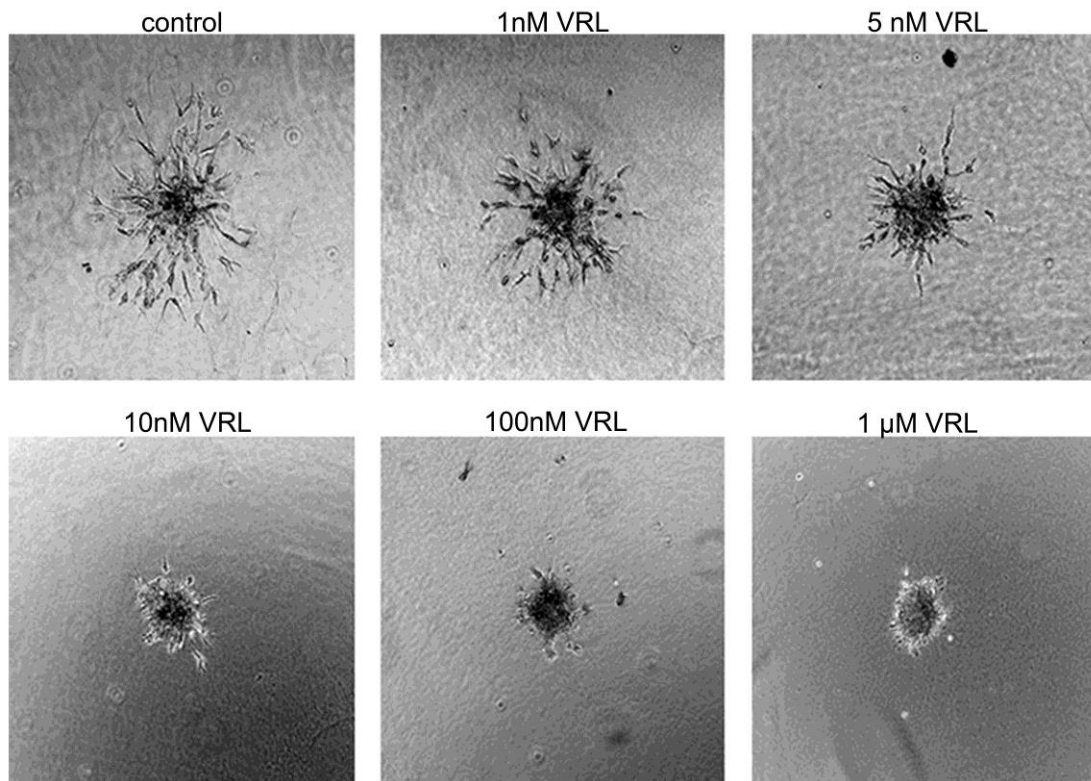
**Εικ 3.4 Χρώση (staining) για annexin V and PI μετά από 6 hrs έκθεση σε VRL.** A. Αντιπροσωπευτικό διπαραμετρικό σημειογράφημα (dot plot) που καταδεικνύει το staining για annexin V και/ή PI. Οι τιμές αφορούν τα ποσοστά του ολικού αριθμού κυττάρων. R4: PI θετικά (νεκρωτικά κύτταρα), R5: Annexin V + PI θετικά (προχωρημένη απόπτωση), R6: αρνητικά (ζωντανά κύτταρα), R7: Annexin V θετικά (αρχικού σταδίου απόπτωση). R5+R7: Συνολικός αριθμός αποπτωτικών κυττάρων. B. Η επίδραση της VRL στον κυτταρικό θάνατο με βάση την πρόσληψη annexin V. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέση τιμή  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### **3.1.5 Η επίδραση της βινορελμπίνης στη δημιουργία ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων (sprouting)**

Τέλος προκειμένου να μελετήσουμε τη συνολική επίδραση της βινορελμπίνης στην αγγειογένεση με εκβλάστηση εξετάσαμε τη δημιουργία αγγειογενετικών εκβλαστήσεων σε σφαιροειδή ενδοθηλιακών κυττάρων από HUVEC σε γέλη ινώδους (fibrin gel) με τη δοκιμασία της εκκρεμούς σταγόνας (hanging drop assay). Παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη καταστολή της εκβλάστησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικ 3.5A). Ειδικότερα τα 1nM, 5nM και 10nM ανέστειλαν κατά 31% ( $p < 0.001$ ), 68% ( $p < 0.001$ ) και 87% ( $p < 0.001$ ) αντίστοιχα το σχηματισμό ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων ενώ τα 100nM και 1μM προκάλεσαν ολοκληρωτική καταστολή (Εικ 3.5B).

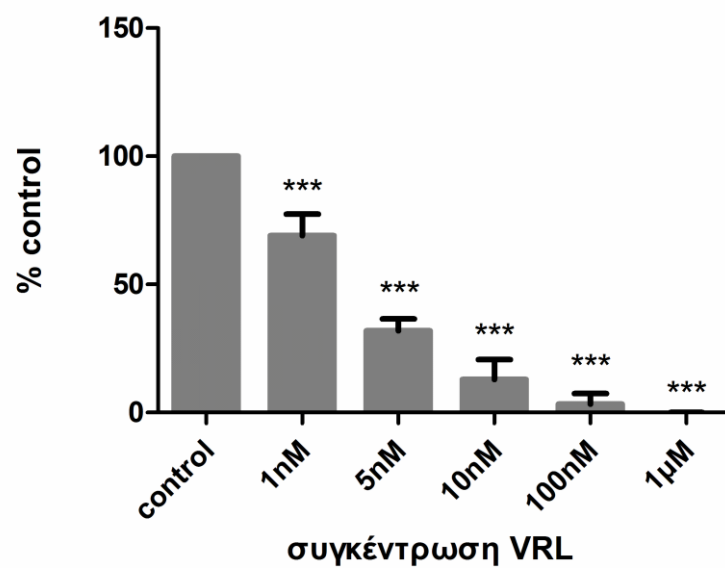
**A**

**Δοκιμασία εκκρεμούς σταγόνας  
Δημιουργία ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων**



**B**

**επιφάνεια ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων**





**Εικ 3.5. Δημιουργία εκβλαστήσεων ενδοθηλιακών κυττάρων (angiogenic sprouting) με τη μέθοδο της εκκρεμούς σταγόνας (hanging drop assay).** Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες αντίθεσης φάσεως που καταδεικνύουν καταστολή της εκβλάστησης στα σφαιροειδή των ενδοθηλιακών κυττάρων. Β. Δοσο-εξαρτώμενη μείωση των εκβλαστήσεων βάσει της επιφάνειας κατάληψης των εκβλαστήσεων. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, \*\*\* $p < 0.001$  έναντι control.

### 3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ (VRL) ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Στη συνέχεια εστιάσαμε αποκλειστικά στη μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης και ειδικότερα στα 10nM που είναι μία κλινικά εφικτή μετρονομική συγκέντρωση όπως περιγράφηκε από τους Briasoulis και συνεργάτες. Μελετήσαμε πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης προκειμένου να εντοπίσουμε θεραπευτικούς στόχους που δημιουργούν συνέργεια σε μοριακό επίπεδο.

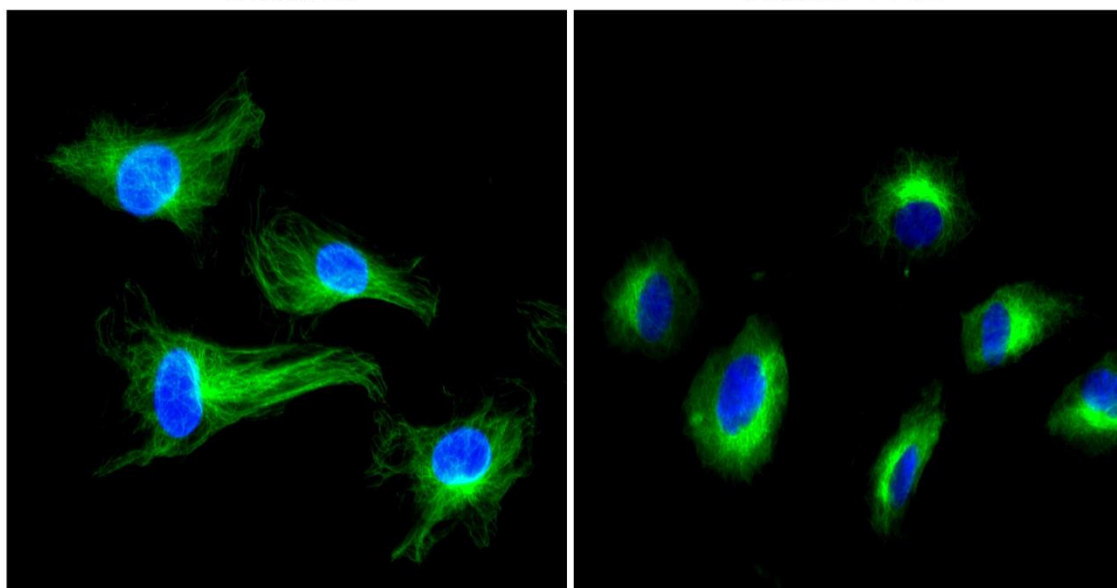
Η βινορελμπίνη είναι παράγοντας αντιμικροσωληνίσκων που προσδένεται στη  $\beta$ -τουμπουλίνη (316). Το δίκτυο μικροσωληνίσκων παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση (317). Εξετάσαμε εάν η χαμηλή συγκέντρωση των 10 nM μετρονομικής βινορελμπίνης έχει δραστηριότητα έναντι των μικροσωληνίσκων. Διαπιστώσαμε ποιοτικές αλλαγές στη μορφολογία των μικροσωληνίσκων μετά από έκθεση 6 ωρών (Εικ 3.6).

Ωστόσο υποθέσαμε ότι συμμετέχουν επιπρόσθετοι μηχανισμοί που εμπλέκουν κρίσιμα μονοπάτια της αγγειογένεσης. Ο VEGFA είναι ο κύριος μεσολαβητής της αγγειογένεσης και το μονοπάτι του Notch θεωρείται συντονιστής αυτής της διεργασίας (134). Ως εκ τούτου εξετάστηκε η επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στα σηματοδοτικά μονοπάτια των Notch και VEGF.

#### Δίκτυο μικροσωληνίσκων $\beta$ -τουμπουλίνης

control

10nM VRL



Εικ 3.6 Η επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στο δίκτυο μικροσωληνίσκων. Απώλεια της πολυγωνικής μορφολογίας και κτήση στρογγυλού σχήματος υπό την επίδραση

10nM VRL. Με πράσινο απεικονίζονται οι μικροσωληνίσκοι β-τουμπουλίνης και με μπλε ο πυρήνας (Dapi).

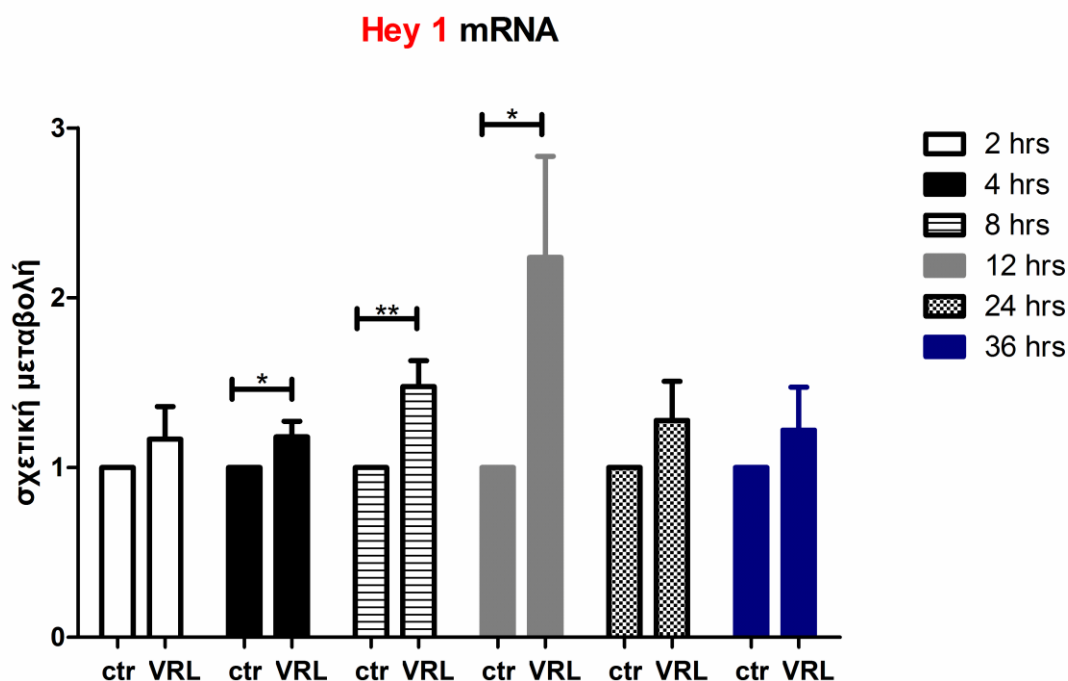
### 3.2.1 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινoreλμπίνης στη μεταγραφή των γονιδίων Hey1 και Hes1

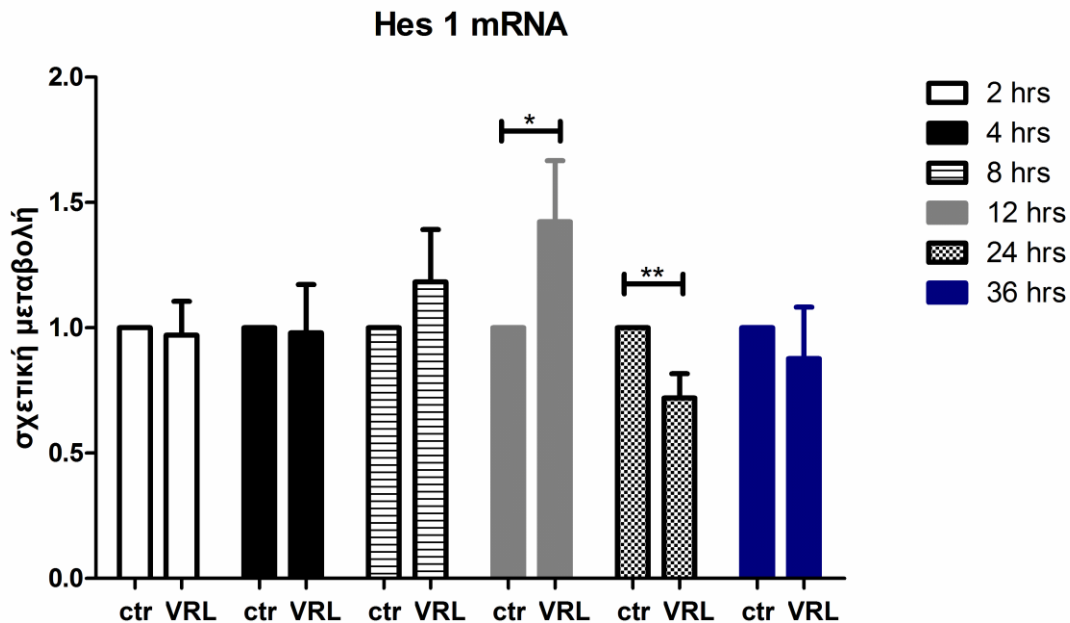
Προκειμένου να εξετάσουμε την ενεργότητα του μονοπατιού του Notch εξετάσαμε την έκφραση του mRNA των γονιδίων στόχων (target genes) Hes1 και Hey1 σε χρονική πορεία (time course) 36 hrs.

Διαπιστώσαμε ότι τα 10nM βινoreλμπίνης προκάλεσαν αύξηση των επιπέδων του mRNA του Hey1 στις 4 hrs (1.18-φορές,  $p < 0.05$ ) με σταδιακή αύξηση στις 8hrs (1.47-φορές,  $p < 0.01$ ), κορύφωση στις 12 hrs (2.24-φορές,  $p < 0.05$ ) και επάνοδο στο φυσιολογικό στις 24 hrs που διατηρήθηκε μέχρι τις 36 hrs.

Επιπλέον τα 10nM βινoreλμπίνης οδήγησαν σε αύξηση της έκφρασης του mRNA του Hes1 στις 12 hrs (1.42-φορες,  $p < 0.05$ ), μείωση στις 24 hrs (78% του μάρτυρα,  $p < 0.01$ ) και επάνοδος στο φυσιολογικό στις 36 hrs.

A



**B**

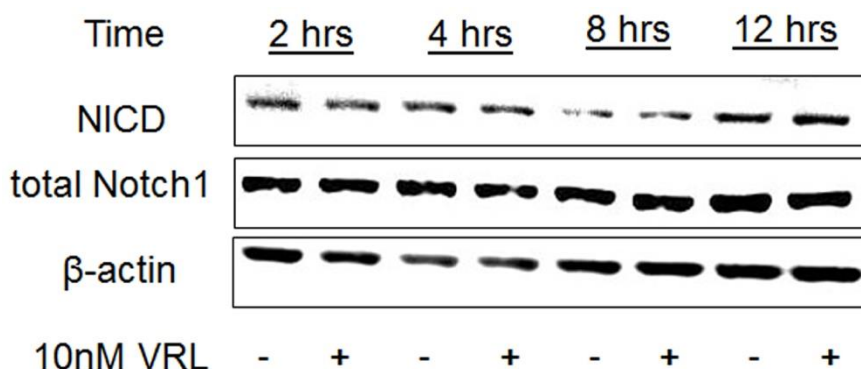
**Εικ 3.7.** Η χρονική πορεία των μεταβολών του mRNA των γονιδίων στόχου του Notch HEY1 και HES1. (A) Η σχετική έκφραση του HEY1 σε σχέση με το αντίστοιχο control (ctr) στα καθορισμένα χρονικά διαστήματα έκθεσης 10nM VRL. (B) Η σχετική έκφραση του Hes1 σε σχέση με το αντίστοιχο control (ctr) στα καθορισμένα χρονικά διαστήματα έκθεσης 10nM VRL. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (της σχετικής μεταβολής της έκφρασης)  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Un-paired t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 3.2.2 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στην πρωτεϊνική έκφραση του Notch1 και Notch Intracellular Domain (NICD)

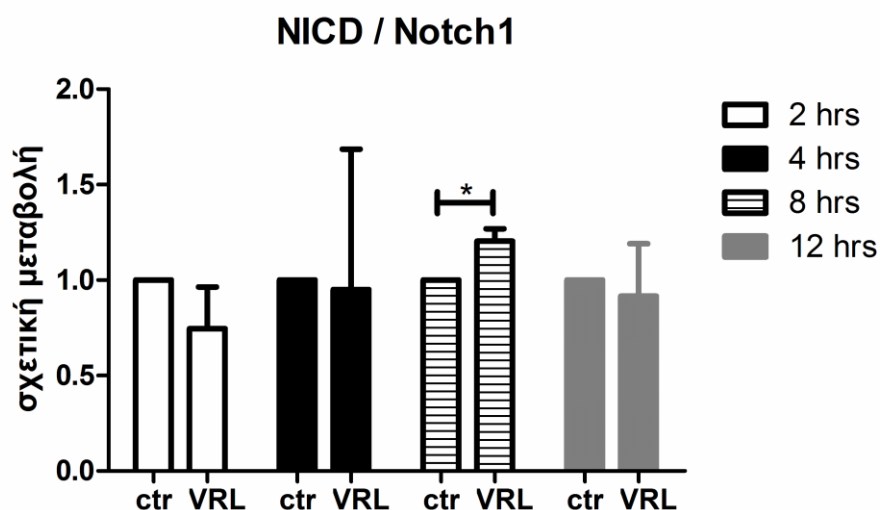
Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν η επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στα Hey1 και Hes1 οφείλεται σε απελευθέρωση NICD, εξετάσαμε την πρωτεϊνική έκφραση Notch1 και NICD σε χρονική πορεία 12 hrs δεδομένου ότι στις 12 hrs παρατηρείται κορύφωση στην έκφραση των γονιδίων στόχου του Notch.

Τα 10nM βινορελμπίνης δεν προκάλεσαν μεταβολή στην έκφραση NICD και Notch1 όπως φαίνεται στο κάτωθι ανοσο-αποτύπωμα (Εικ 3.8A). Επιπλέον ο λόγος NICD προς Notch1, υποδηλωτικός της σηματοδοτικής ενεργοποίησης του μονοπατιού, διατηρήθηκε σταθερός στις 2 hrs και 4 hrs, αυξήθηκε κατά 1.2-φορές ( $p = 0.047$ ) στις 8 hrs και παρέμεινε σε φυσιολογικά επίπεδα στις 12 hrs (Εικ 3.8B).

**A**



**B**

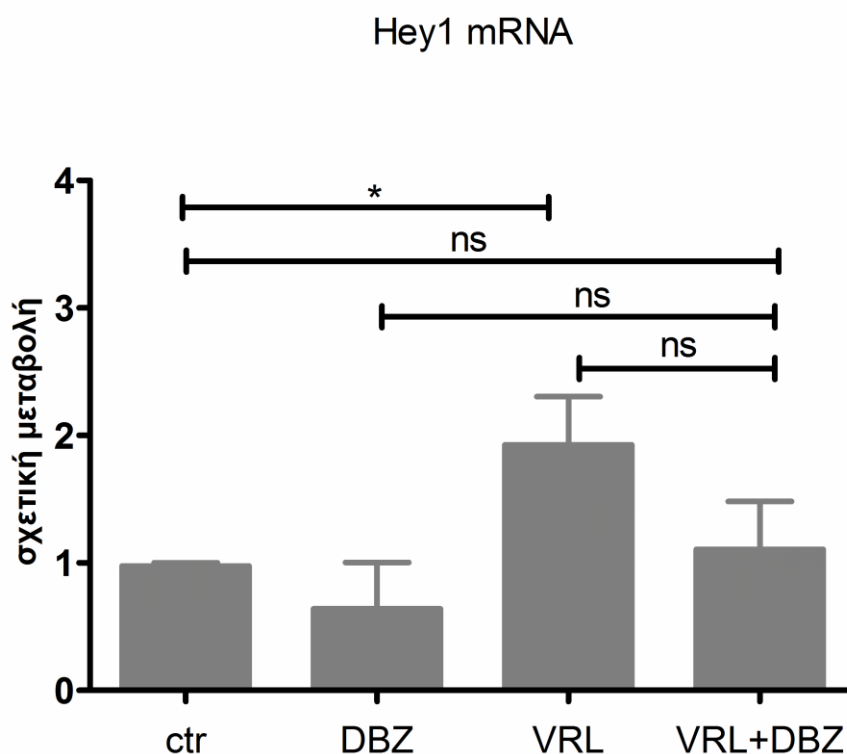


**Εικ 3.8.** Η πρωτεϊνική έκφραση NICD και Notch1 υπό την επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινoreλμπίνης (VRL). (A) Η έκφραση NICD και Notch1 στις 2 hrs, 4 hrs, 8 hrs και 12 hrs με ή χωρίς VRL. (B). Ο λόγος NICD/ Notch1 μετά την έκθεση σε VRL στις 2 hrs, 4 hrs, 8 hrs και 12 hrs σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (ctr). Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (της σχετικής μεταβολής της έκφρασης)  $\pm$  SD από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Un-paired t-test, \* $p < 0.05$ .

### 3.2.3 Η επίδραση του αναστολέα της γάμμα-σεκρετάσης DBZ στην έκφραση του mRNA του Hey1 υπό την επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινoreλμπίνης

Προκειμένου να εξακριβώσουμε εάν η αύξηση της έκφρασης του mRNA του Hey1 οφείλεται σε απελευθέρωση NICD εξετάστηκαν τα επίπεδα του Hey1 υπό την

επίδραση του αναστολέα της γάμμα-σεκρετάσης DBZ. Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική καταστολή των επιπέδων του Hey1 με τα 100nM DBZ στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 10nM βινορελμπίνης στις 12 hrs. Ωστόσο τα επίπεδα mRNA του Hey1 δε διέφεραν σημαντικά και από τα επίπεδα του μάρτυρα (Εικ 3.9).

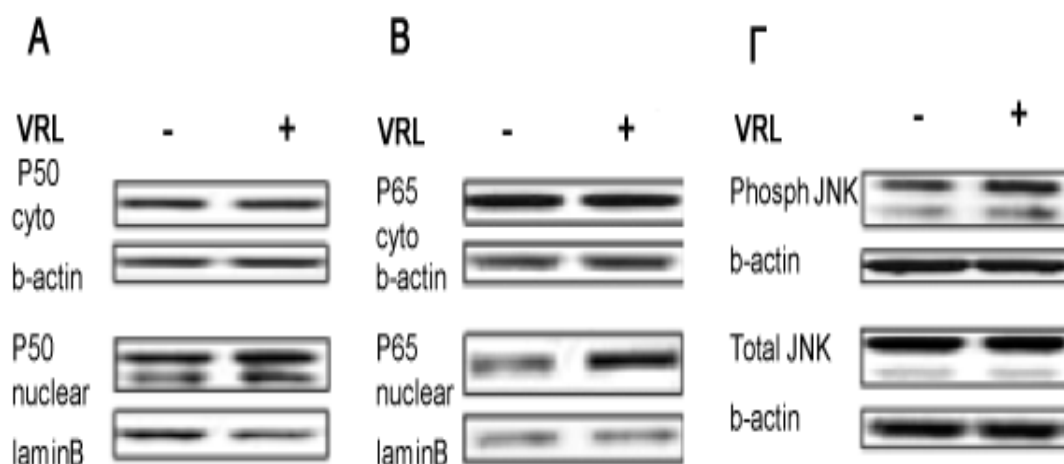


**Εικ 3.9. Η επίδραση του αναστολέα της γάμμα-σεκρετάσης DBZ στο mRNA του Hey1.** Τα 10nM VRL αύξησαν τα επίπεδα του Hey1 ωστόσο το DBZ δεν ανέστειλε τη δράση αυτή. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (της σχετικής μεταβολής της έκφρασης)  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova,  $*p < 0.05$ . Τα κύτταρα είχαν ήδη προ-εκτεθεί σε DBZ για 1hr πριν την έναρξη της έκθεσης σε VRL.

### 3.2.4 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης σε μονοπάτια που διασταυρώνονται με το μονοπάτι του Notch

Δεδομένου ότι η αύξηση του mRNA του Hey1 δεν μπόρεσε να αποδοθεί στο NICD εξετάσαμε την πιθανότητα να προκλήθηκε μέσω μονοπατιών που διασταυρώνονται με το μονοπάτι του Notch. Ενδεικτικά ο NFkB (318) (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και η JNK (319) (c-Jun N-terminal kinase) επιδρούν στη ρύθμιση των γονιδίων στόχου του Notch1.

Ως εκ τούτου εξετάσαμε την επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στον NFκB και την JNK. Η έκθεση των HUVEC σε 10 nM VRL για 3 hrs οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων των υπομονάδων P50 και P65 του NFκB στον πυρήνα (Εικ 3.10A, Εικ 3.10B). Επίσης η έκθεση σε 10nM VRL για 30 min οδήγησε στην αύξηση της φωσφορυλίωσης της JNK (Εικ 3.10Γ), όπως φαίνεται στο κάτωθι άνοσο-αποτύπωμα.



**Εικ 3.10. Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στις υπομονάδες P50 και P65 του NFκB και στη φωσφορυλίωση της JNK.** (Α) Η έκφραση της υπομονάδας P50 του NFκB στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα μετά από 3 hrs έκθεση σε 10 nM VRL. (Β) Η έκφραση της υπομονάδας P65 του NFκB στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα μετά από 3 hrs έκθεση σε 10nM VRL. (Γ) Η έκφραση της φωσφορυλιωμένης και της ολικής πρωτεΐνης της JNK στο κύτταρο μετά από 30 min έκθεση σε 10nM VRL. Η β-actin χρησίμευσε ως μάρτυρας ισότιμης φόρτωσης για τα ολικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα. Η lamin B χρησίμευσε ως μάρτυρας ισότιμης φόρτωσης για τα πυρηνικά εκχυλίσματα.

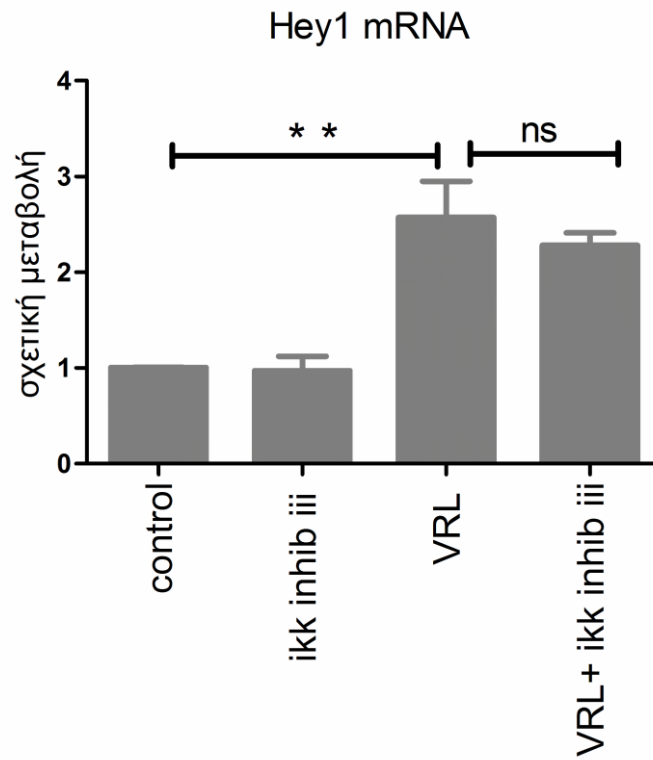
### 3.2.5 Η επίδραση των αναστολέων της σηματοδότησης του NFκB και της JNK στο mRNA του HEY1 υπό την επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης της βινορελμπίνης

Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν η επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στον NFκB και τη JNK συσχετίζεται με την επίδραση της στο Hey1 εξετάσαμε τα επίπεδα του mRNA του Hey1 μετά από ταυτόχρονη έκθεση σε μετρονομική βινορελμπίνη και αναστολέων των ανωτέρω μονοπατιών.

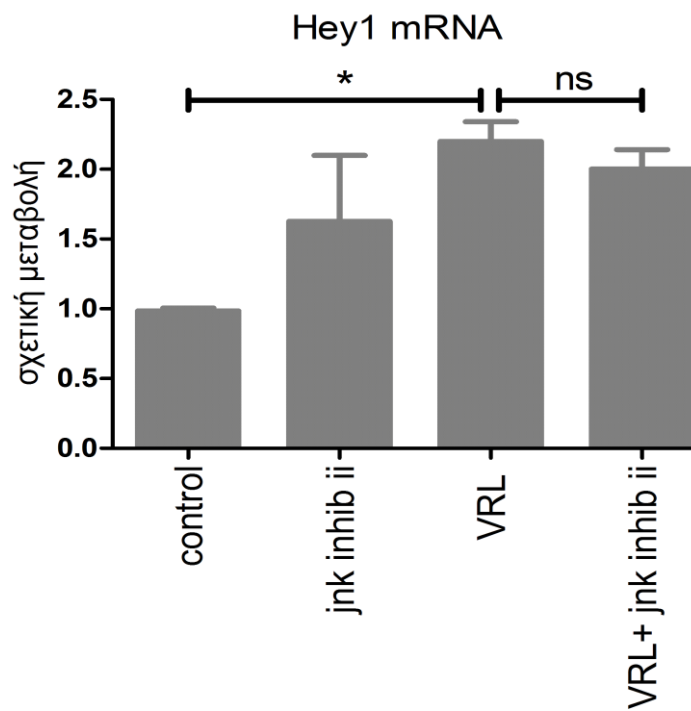
Διαπιστώσαμε ότι η μετρονομική βινορελμπίνη αύξησε το mRNA του Hey1 στις 12 hrs παρά την επίδραση του αναστολέα iii της IKK κινάσης (BMS 345541) που

παρεμποδίζει τη μετακίνηση του NFκB στον πυρήνα και του αναστολέα ii της JNK που καταστέλλει τη φωσφορυλίωση της.

**A**



**B**



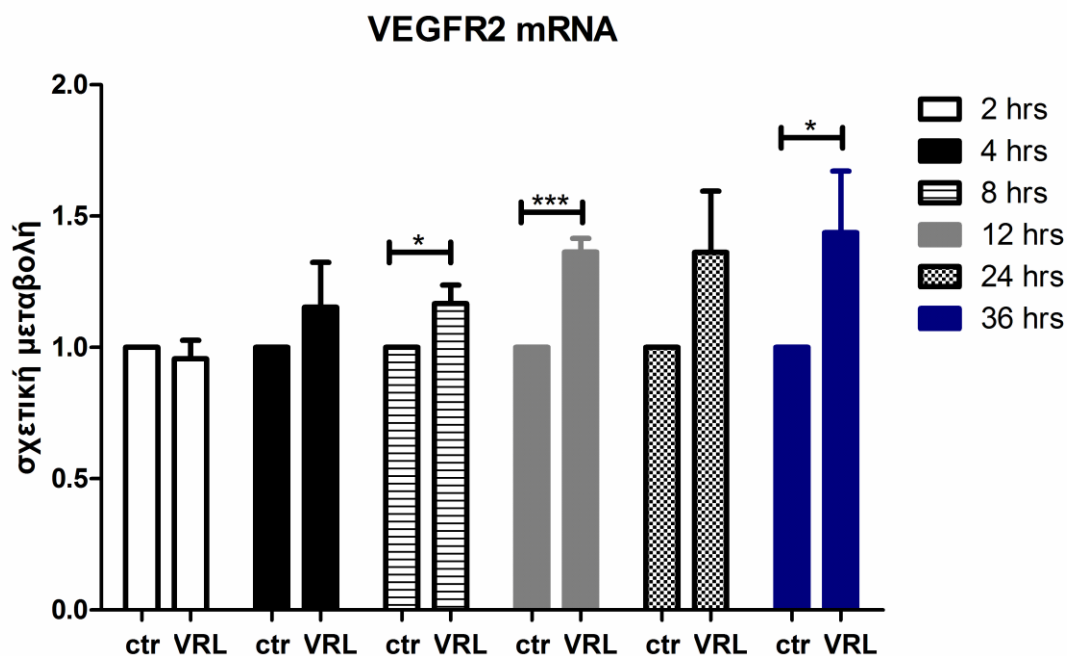


**Εικ 3.11. Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στο mRNA του HEY1 υπό την ταυτόχρονη αναστολή της IKK ή της JNK . (A) Η σχετική μεταβολή της έκφρασης του Hey1 υπό την επίδραση του αναστολέα iii της ikk και VRL. (B) Η σχετική μεταβολή της έκφρασης του Hey1 υπό την επίδραση του αναστολέα ii της jnk και VRL. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (της σχετικής μεταβολής έκφρασης)  $\pm$  SD από (A) τρία ανεξάρτητα πειράματα, (B) δύο ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: μη σημαντική διαφορά.**

### 3.2.6 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στην έκφραση του mRNA του VEGFR2

Στη συνέχεια εξετάσαμε τη βιολογική σημασία της αύξησης του Hey1 από τη μετρονομική βινορελμπίνη δεδομένου ότι το Hey1 καταστέλλει την έκφραση του VEGFR2 μέσω αλληλεπίδρασης με SP-1 παράγοντες (139).

Ωστόσο αντί για μείωση παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του mRNA του VEGFR2 μετά από έκθεση σε 10nM βινορελμπίνης στις 8 hrs (1.16-φορές,  $p < 0.05$ ), 12 hrs (1.36-φορές,  $p < 0.001$ ) και 36 hrs (1.44-φορές,  $p < 0.05$ ).



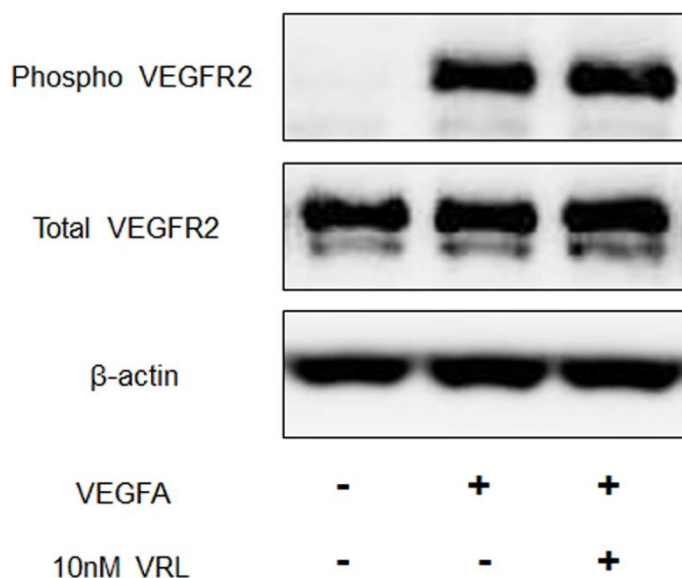
**Εικ 3.12. Η χρονική πορεία των μεταβολών του mRNA του VEGFR2. Η σχετική μεταβολή της έκφρασης του mRNA του VEGFR2 σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (ctr) στα καθορισμένα χρονικά διαστήματα έκθεσης σε 10nM VRL. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν**

σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (της σχετικής μεταβολής έκφρασης)  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Un-paired t-test, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

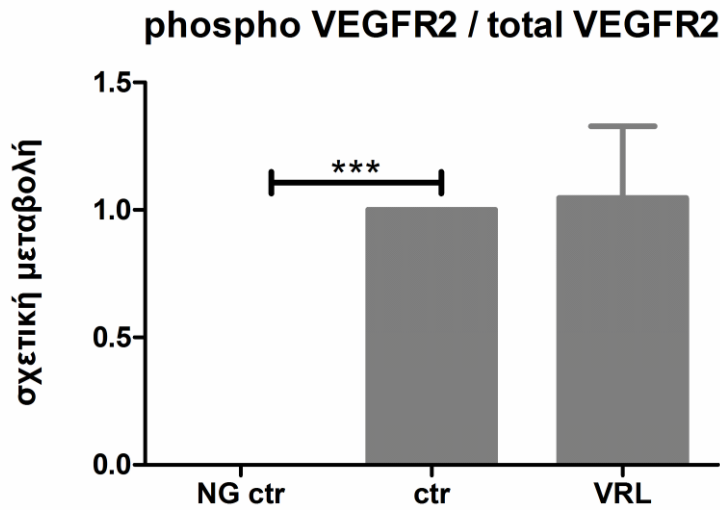
### 3.2.7 Η επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης στην πρωτεϊνική έκφραση και φωσφορυλίωση του VEGFR2

Στη συνέχεια εξετάσαμε εάν η μεταβολή στην έκφραση του mRNA του VEGFR2 αντικατοπτρίζεται και στην πρωτεϊνική έκφραση και τη φωσφορυλίωση του VEGFR2. Δε διαπιστώθηκαν μεταβολές στην έκφραση της ολικής πρωτεΐνης και της φωσφορυλίωσης του VEGFR2 μετά από 24 hrs έκθεση σε 10 nM βινορελμπίνης, όπως φαίνεται στο κάτωθι άνοσο-αποτύπωμα (Εικ 3.13A). Επίσης ο λόγος της ολικής πρωτεΐνης προς τη φωσφορυλιωμένη μορφή του VEGFR2, υποδηλωτικός της σηματοδοτικής ενεργοποίησης του μονοπατιού, παρέμεινε αμετάβλητος κατά την επίδραση των 10 nM βινορελμπίνης στις 24 hrs (Εικ 3.13B).

**A**



**B**



**Εικ 3.13.** Η έκφραση της ολικής (total) και φωσφορυλιωμένης (phospho) μορφής του VEGFR2 υπό την επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης (VRL) και VEGFA. (A) Αντιπροσωπευτικό άνοσο-αποτύπωμα που καταδεικνύει φωσφορυλίωση του VEGFR2 5 min μετά την έκθεση σε VEGFA και απουσία μεταβολής κατά την επίδραση των 10nM VRL ενώ τα επίπεδα του ολικού VEGFR2 παρέμεναν σταθερά. Η β-actin χρησίμευσε ως μάρτυρας ισότιμης φόρτωσης (loading control). (B) Ο λόγος του φωσφορυλιωμένου προς τον ολικό VEGFR2. Σημειώνεται η απουσία φωσφορυλίωσης σε συνθήκες έλλειψης VEGFA (Negative control ή NG ctr). Χωρίς μεταβολές ο λόγος μετά την έκθεση σε VRL σε σχέση με το μάρτυρα (ctr). Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (της σχετικής μεταβολής της έκφρασης) ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, \*\*\* $p < 0.001$ . Τα κύτταρα επώασθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες έλλειψης τροφικών παραγόντων, με ή χωρίς VRL. Με την παρέλευση των 24 ωρών τα κύτταρα εκτέθηκαν για 5 min με ή χωρίς VEGFA (Negative control=NG ctr).

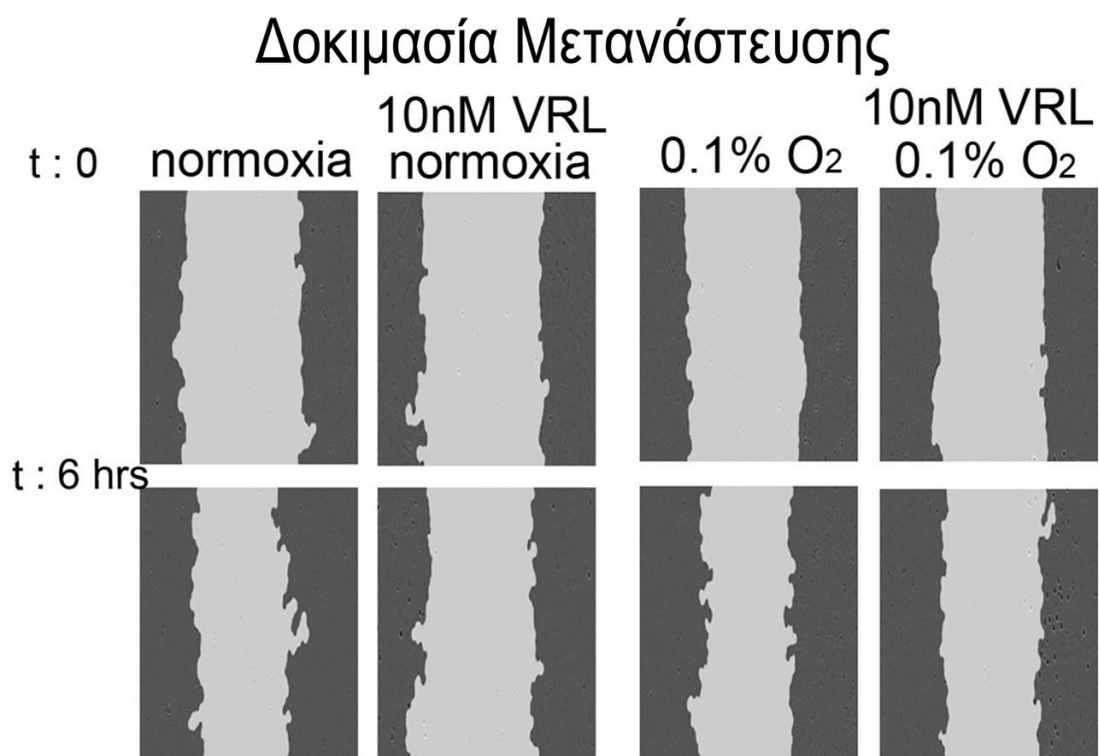
### 3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ

Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αντί-VEGF παράγοντες αναπτύσσεται αντίσταση (162) που μεσολαβείται κυρίως από την επαγόμενη από την αντί-αγγειογένεση υποξία (184), διερευνήσαμε το ρόλο της υποξίας στην αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Ως εκ τούτου εξετάσαμε την επίδραση της σοβαρής υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) στις κρίσιμες λειτουργίες της αγγειογένεσης *in vitro*: μετανάστευση, δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων, εκβλάστηση και πολλαπλασιασμό.

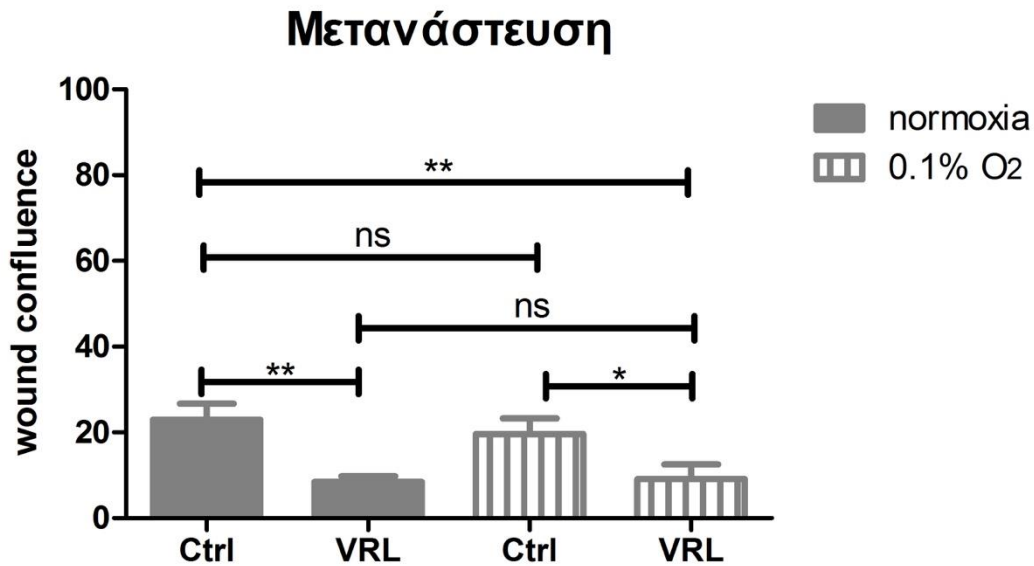
#### 3.3.1 Η επίδραση της υποξίας στην αντί-μεταναστευτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης

Η υποξία δεν επηρέασε τη μεταναστευτική ικανότητα των HUVEC σε συνθήκες control, ούτε μετέβαλε την αντι-μεταναστευτική δράση των 10 nM βινορελμπίνης στις 6 hrs, όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία επούλωσης (Εικ 3.14A, Εικ 3.14B).

A



B

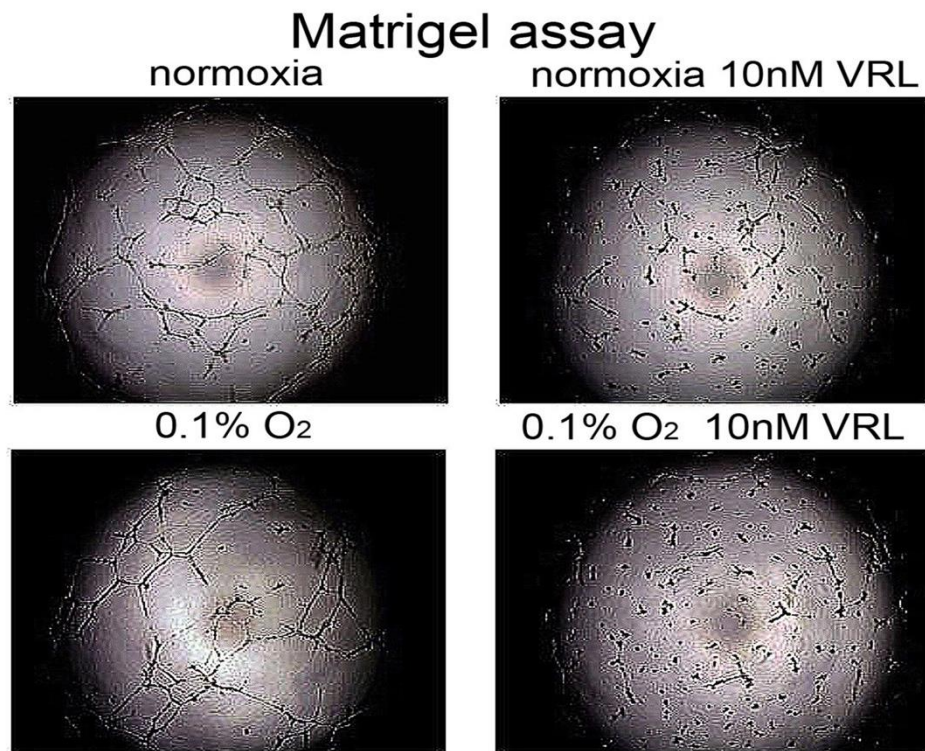


**Εικ 3.14.** Ο ρόλος της υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) στην αντί-μεταναστευτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL). (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το μέτωπο της εκδοράς στο χρόνο (t) στις 0 και 6 hrs. Σημειώνεται περιορισμός στη σύγκλιση των χειλέων της εκδοράς στις 6 hrs σε σύγκριση με το αρχικό πλάτος τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία υπό την επίδραση 10nM VRL. (B) Ισόποση αναστολή της μετανάστευσης υπό VRL στη νορμοξία και υποξία σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (Ctrl) βάσει της παραμέτρου wound confluence. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Στα διαγράμματα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ± SD από τρία πειράματα. One way anova, ns: μη σημαντική διαφορά, \* p<0.05, \*\*p<0.01.

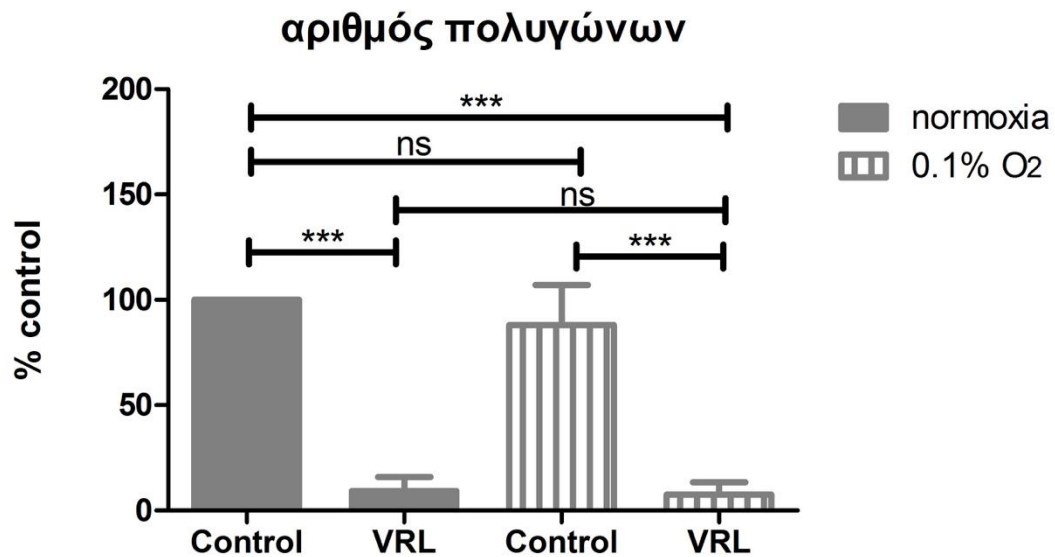
### 3.3.2 Η επίδραση της υποξίας στο σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων

Η σοβαρή υποξία (0.1%O<sub>2</sub>) δεν επηρέασε την ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να σχηματίζουν ενδοθηλιακούς σωλήνες σε συνθήκες control ούτε μετέβαλε την κατασταλτική επίδραση των 10 nM βινορελμπίνης στη δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων, όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία Matrigel (Εικ 3.15A, Εικ 3.15B).

A



B



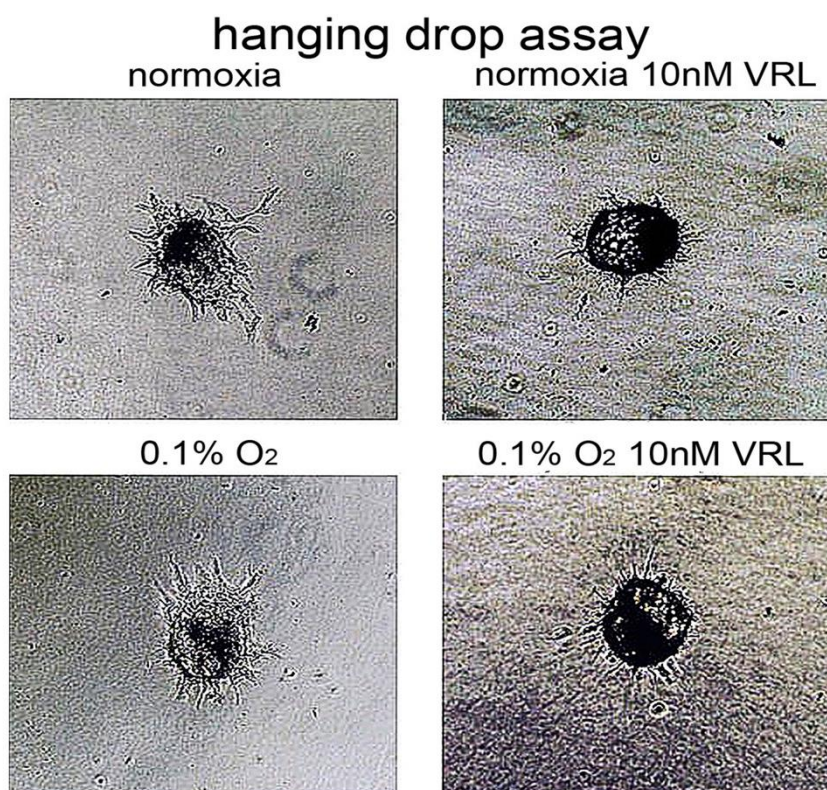
Εικ 3.15. Ο ρόλος της υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) στην ανασταλτική επίδραση της μετρονομιικής βινορελμπίνης (VRL) στο σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν κατάρρευση του πλέγματος ενδοθηλιακών σωλήνων με VRL τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία. (B) Ισότιμη αναστολή με VRL στη νορμοξία και υποξία σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα (control), όπως προσδιορίστηκε από τον αριθμό των

πολυγώνων. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, ns: μη σημαντική μεταβολή, \*\*\* $p < 0.001$ .

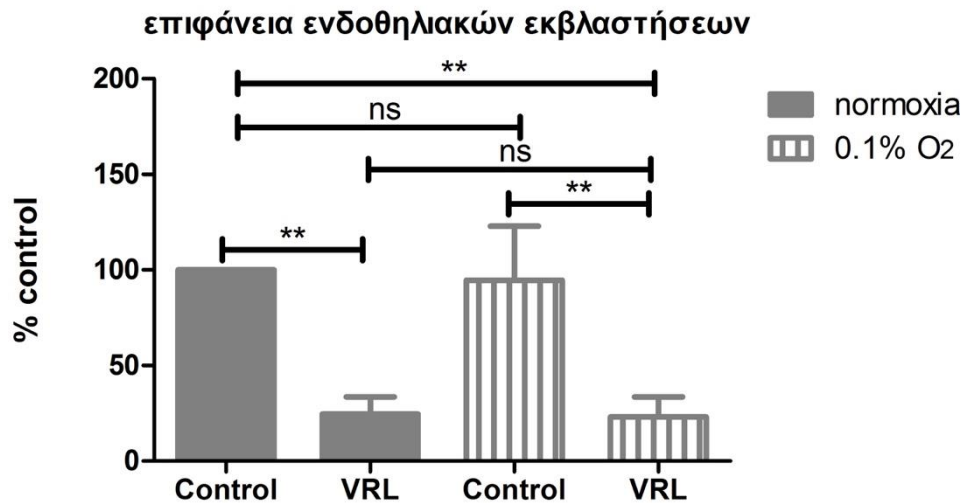
### 3.3.3 Η επίδραση της υποξίας στο σχηματισμό ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων

Η σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) δεν επηρέασε το σχηματισμό ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων από τα HUVEC σε συνθήκες control. Επίσης η σοβαρή υποξία δε μετέβαλε την κατασταλτική επίδραση των 10 nM βινορελμπίνης στη δημιουργία ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων, όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία εκκρεμούς σταγόνας (Hanging drop assay) (Εικ 3.16A, 3.16B).

A



**B**

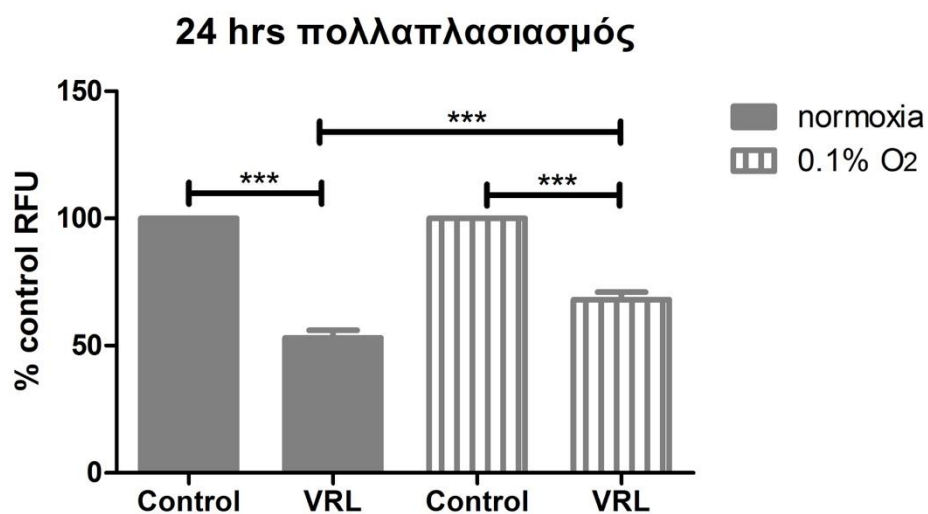
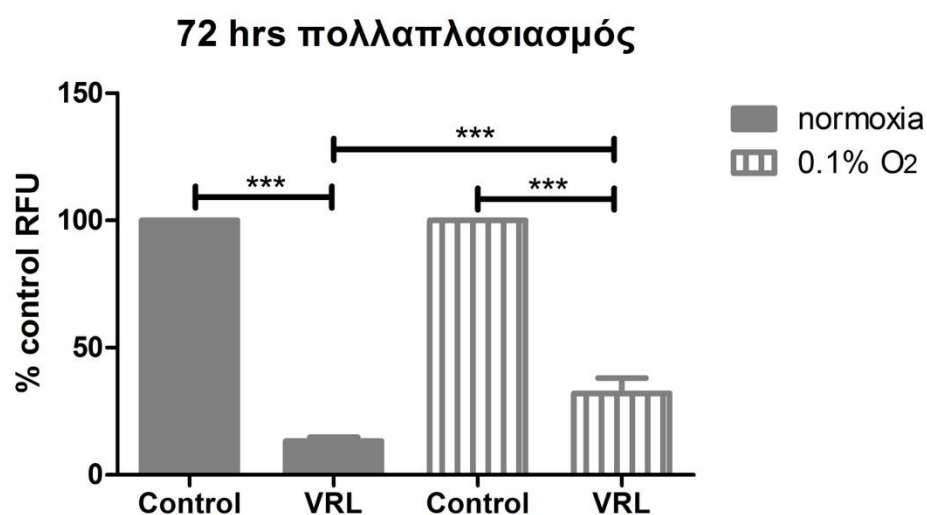


**Εικ 3.16. Ο ρόλος της υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) στην ανασταλτική επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στο σχηματισμό ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων.** (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν καταστολή της ανάπτυξης ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων τόσο στο νορμοξία όσο και στην υποξία. (B) Ισότιμη καταστολή του σχηματισμού ενδοθηλιακών εκβλαστήσεων με VRL στη νορμοξία και υποξία, όπως προσδιορίστηκε από την επιφάνεια που καταλαμβάνουν οι εκβλαστήσεις σε γέλη ινώδους. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way apovna, ns: μη σημαντική μεταβολή, \*\* $p < 0.01$ .

### 3.3.4 Η επίδραση της υποξίας στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης

Προκειμένου να ολοκληρώσουμε τη διερεύνηση μας αναφορικά με το ρόλο της υποξίας στην αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης, εξετάσαμε τον πολλαπλασιασμό. Τα 10nM VRL ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό πιο αποτελεσματικά στη νορμοξία σε σχέση με την υποξία (47% έναντι 32% αναστολή,  $p < 0.001$ ) στις 24 hrs (Εικ 3.17A) και στις 72 hrs αντίστοιχα (87% έναντι 68% αναστολή,  $p < 0.001$ ) (Εικ 3.17B).



**A****B**

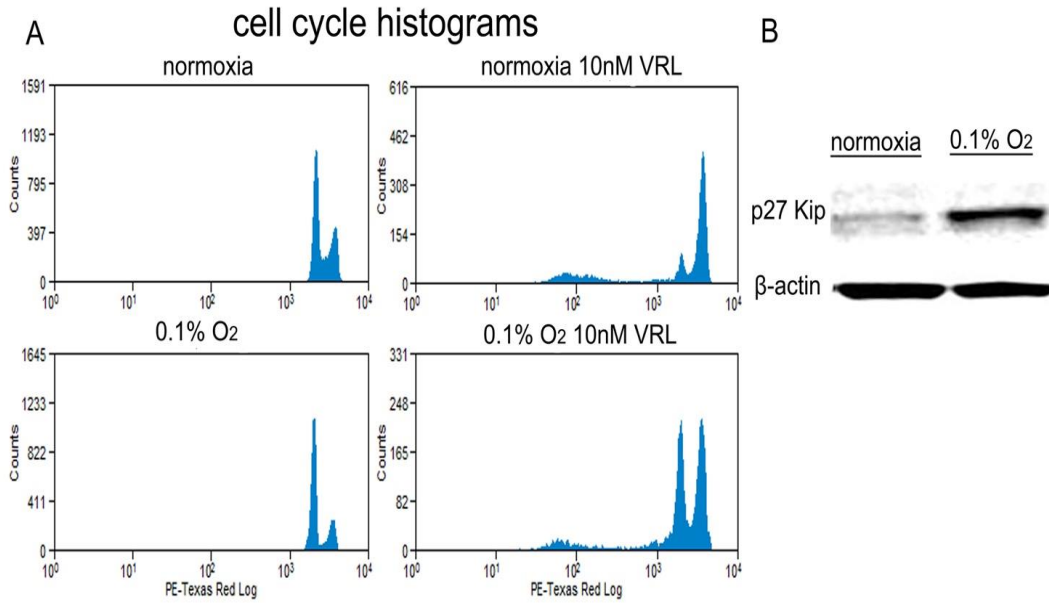
**Εικ 3.17. Ο ρόλος της υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) στην ανασταλτική επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στον πολλαπλασιασμό.** (A) ισχυρότερη αναστολή του πολλαπλασιασμού με VRL στη νορμοξία στις 24 hrs. (B) Ισχυρότερη αναστολή του πολλαπλασιασμού με VRL στη νορμοξία στις 72 hrs. Ο πολλαπλασιασμός (άξονας Y) προσδιορίστηκε με τη Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένη στον αντίστοιχο μάρτυρα (Control) στη νορμοξία ή υποξία και εξετάστηκε με τη μέθοδο CyQUANT. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, ns: μη σημαντική διαφορά, \*\*\* p<0.001.

### **3.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ**

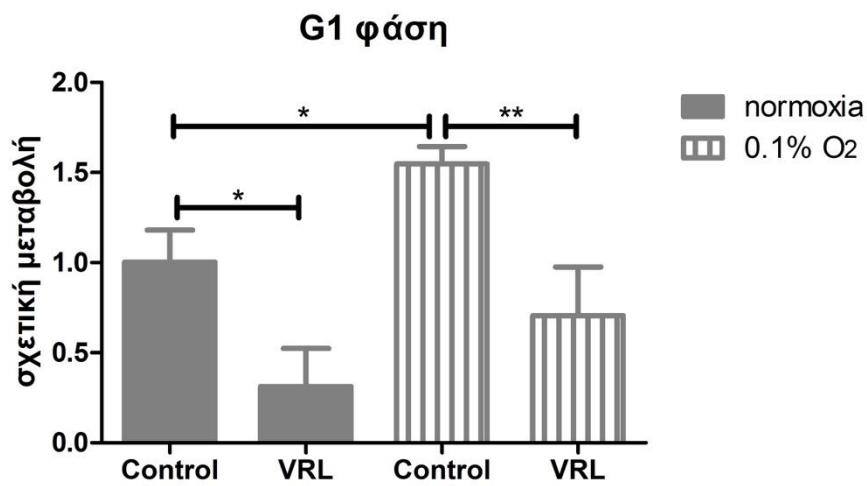
Διαπιστώσαμε ότι η υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) προκάλεσε αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Διερευνήσαμε περαιτέρω το μηχανισμό αντίστασης εξετάζοντας τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

#### **3.4.1 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στον κυτταρικό κύκλο των HUVEC**

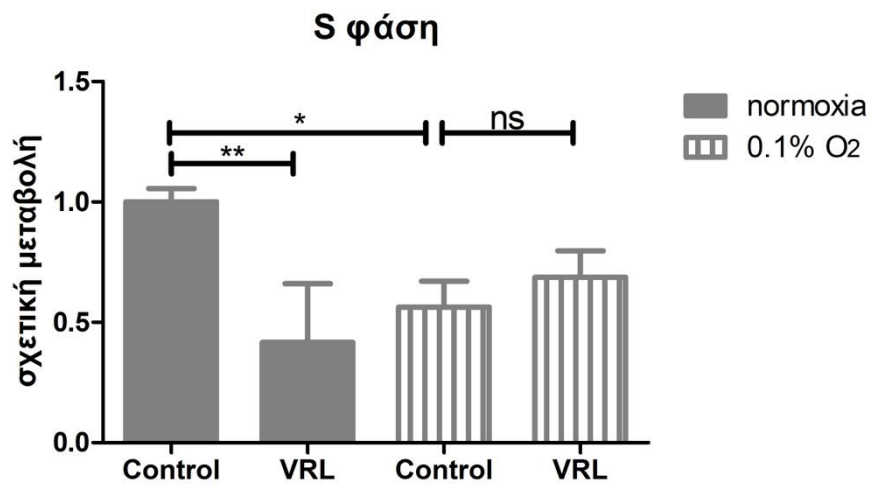
Υποθέσαμε ότι η υποξία επηρεάζει την αντί-μιτωτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης επιβραδύνοντας τον κυτταρικό κύκλο (32). Ως εκ τούτου αναλύσαμε τον κυτταρικό κύκλο μετά από επώαση των HUVEC για 24 hrs στη σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>). Διαπιστώθηκαν αλλαγές στην κατανομή των HUVEC στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου στην υποξία (Εικ 3.18Α). Ειδικότερα η υποξία αύξησε το ποσοστό των HUVEC στη G1 φάση κατά 1.55-φορές (p<0.05) (Εικ 3.18Γ) και ελάττωσε το ποσοστό των κυττάρων στην S φάση κατά 1.78-φορές (p<0.05) (Εικ 3.18Δ). Οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν από αύξηση του αναστολέα της κυκλινό-εξαρτώμενης κινάσης (cdk) p27kip (Εικ 3.18Β) που αναστέλλει τη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (320). Τέλος η μετρονομική συγκέντρωση των 10nM βινορελμπίνης προκάλεσε στάση των HUVEC στη G2/M φάση (G2/M phase arrest), ωστόσο η υποξία κατέστειλε την επίδραση αυτή κατά 1.56-φορές (p<0.05) (Εικ 3.18Ε). Συνεπώς η αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις G1 και S στην υποξία έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αντι-μιτωτικής δράσης της μετρονομικής βινορελμπίνης.



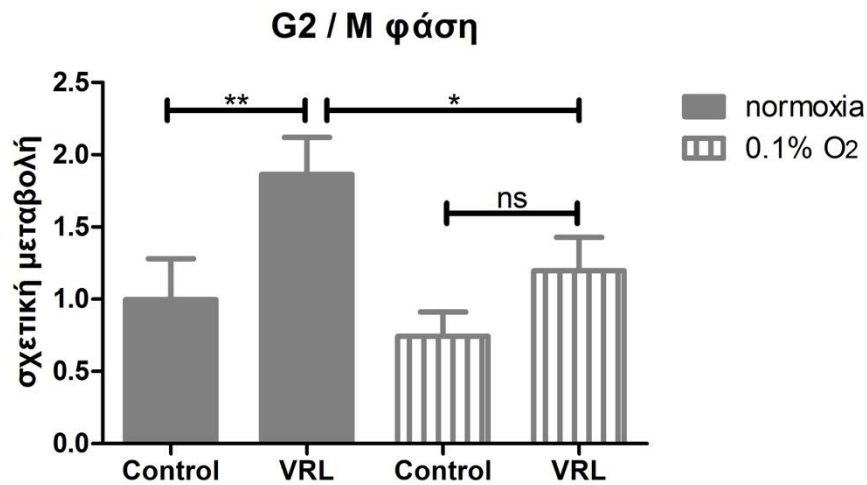
Γ



Δ



Ε



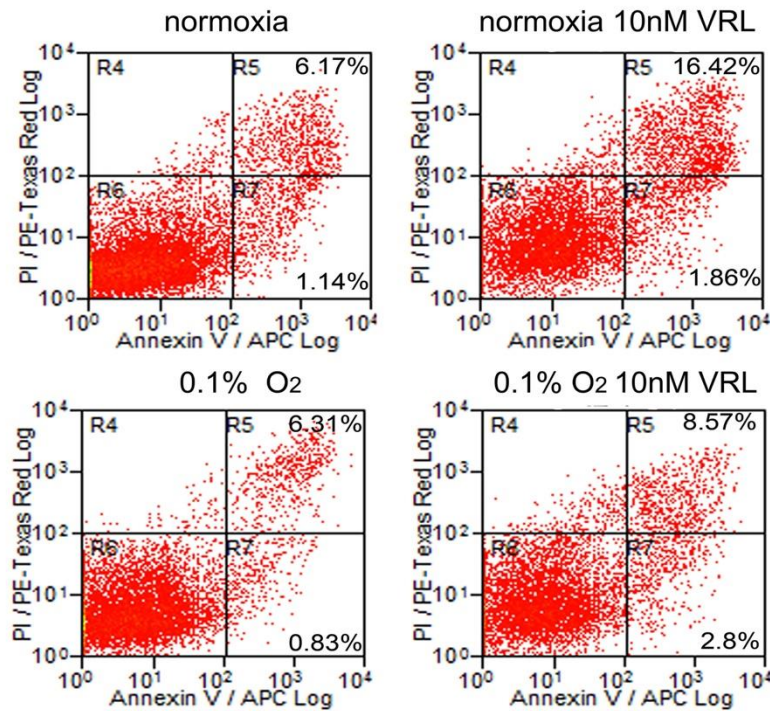
**Εικ 3.18.** Η επίδραση της υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) και της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στον κυτταρικό κύκλο. (Α) Αντιπροσωπευτικό ιστόγραμμα από κυτταρομετρία ροής που δείχνει ανακατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μετά την έκθεση σε υποξία και VRL. (Β) Άνοσο-αποτύπωμα που δείχνει την αύξηση του p27<sup>kip</sup> στην υποξία. (Γ) Στάση των κυττάρων στη G1 φάση (G1 phase arrest) στην υποξία. (Δ) Μείωση του ποσοστού των κυττάρων στην S φάση στην υποξία. (Ε) Καταστολή της VRL-επαγόμενης στάσης στη G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου (G2/M phase arrest) στην υποξία. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, ns:μη σημαντική αλλαγή, \*p<0.05, \*\* p<0.01.

### 3.4.2 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στην απόπτωση των HUVEC

Στη συνέχεια εξετάσαμε εάν οι μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο οδηγούν σε εξασθένιση της προ-αποπτωτικής δράσης της μετρονομικής βινορελμπίνης στην υποξία. Ως εκ τούτου μελετήσαμε την πρόσληψη Annexin V και Propidium Iodine (PI) (Annexin V- PI staining) με κυτταρομετρία ροής σε HUVEC που επωάσθηκαν στη σοβαρή υποξία για 36 hrs (Εικ 3.19Α). Διαπιστώσαμε ότι η υποξία δε μετέβαλε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων σε συνθήκες control (Εικ 3.19Β). Ωστόσο η υποξία κατέστειλε την προ-αποπτωτική δράση των 10 nM βινορελμπίνης κατά 1.53-φορές (p<0.01) (Εικ 3.19Β).

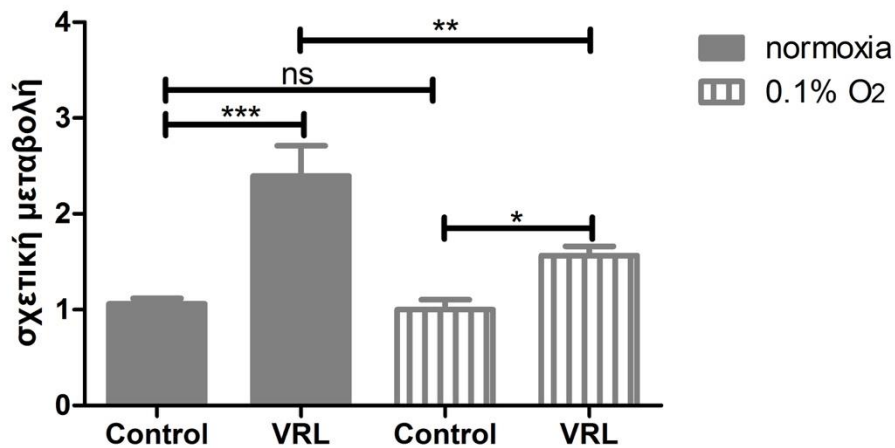
**A**

### Annexin V - PI staining



**B**

### Annexin V θετικά κύτταρα



**Εικ 3.19.** Η επίδραση της σοβαρής υποξίας (0.1% O<sub>2</sub>) και της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στην απόπτωση των HUVEC. (A) Αντιπροσωπευτικό διπαραμετρικό σημειογράφημα (dot plot) που καταδεικνύει την πρόσληψη annexin V και/ή PI από τα HUVEC. Οι τιμές αφορούν σε ποσοστά του ολικού αριθμού κυττάρων. R4: PI θετικά (νεκρωτικά κύτταρα), R5: Annexin V + PI θετικά (προχωρημένη απόπτωση), R6: αρνητικά

(ζωντανά κύτταρα), R7: Annexin V θετικά (αρχικού σταδίου απόπτωση). R5+R7: Συνολικός αριθμός αποπτωτικών κυττάρων. (B) Καταστολή της VRL-επαγόμενης απόπτωσης στην υποξία όπως προσδιορίσθηκε από το ποσοστό των Annexin V θετικών κυττάρων. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, ns: μη σημαντική μεταβολή, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

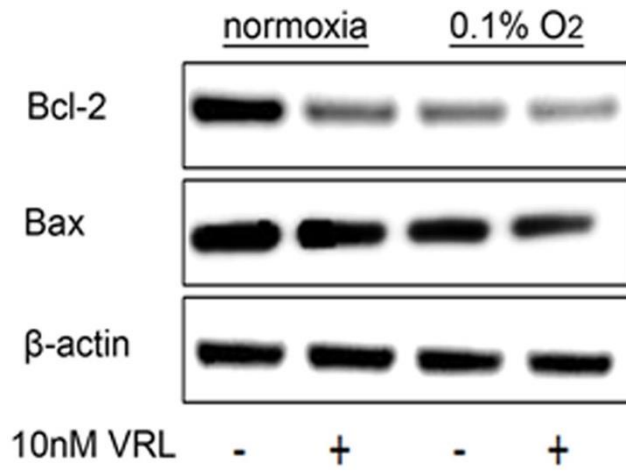
### **3.4.3 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στις πρωτεΐνες Bcl-2, Bax και το λόγο Bcl-2/Bax**

Προκειμένου να διερευνήσουμε το μηχανισμό αντίστασης στην προ-αποπτωτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης, εξετάσαμε το ισοζύγιο της έκφρασης της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της προ-αποπτωτικής Bax μετά από 24 hrs έκθεση στη σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) με ή χωρίς 10nM VRL (Εικ 3.20A). Οι Bcl-2 και Bax είναι μεσολαβητές του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης και ο χαμηλός λόγος Bcl-2/Bax οδηγεί σε διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization: MOMP) και κυτταρικό θάνατο (41). Επιπλέον η βινορελμπίνη φαίνεται να επάγει την απόπτωση μέσω της καταστολής της πρωτεΐνης του Bcl-2 (48).

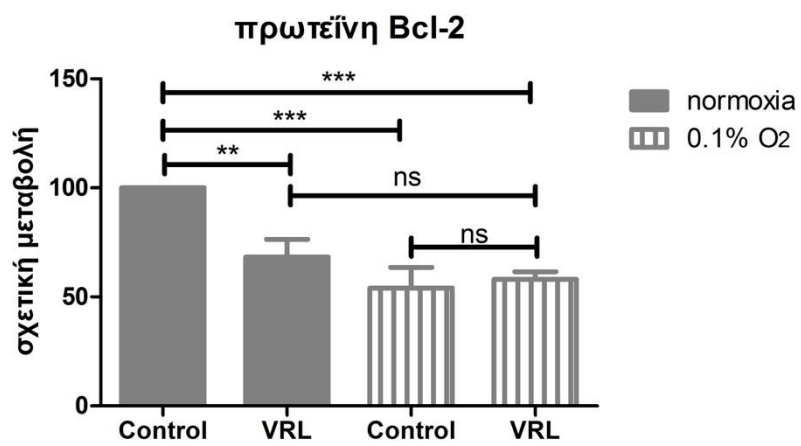
Διαπιστώσαμε ότι τόσο τα 10nM βινορελμπίνης στη νορμοξία όσο και η σοβαρή υποξία ελάττωσαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2 κατά 32% ( $p < 0.01$ ) και 46% ( $p < 0.001$ ) αντίστοιχα, χωρίς ωστόσο τα 10nM βινορελμπίνης να προκαλούν περαιτέρω μείωση της Bcl-2 στη σοβαρή υποξία (Εικ 3.20B). Από την άλλη η υποξία και η μετρονομική βινορελμπίνη δεν είχαν καμία επίδραση στο Bax (Εικ 3.20Γ). Ως εκ τούτου οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο λόγο Bcl-2/bax ήταν παρόμοιες με τις αλλαγές στο Bcl-2. Ειδικότερα τόσο τα 10nM βινορελμπίνης στη νορμοξία όσο και η σοβαρή υποξία μείωσαν το λόγο κατά 30% ( $p < 0.05$ ) και 42% ( $p < 0.01$ ) αντίστοιχα, χωρίς ωστόσο η μετρονομική βινορελμπίνη να προκαλεί περαιτέρω μείωση (Εικ 3.20Δ).

Επιγραμματικά, η μετρονομική βινορελμπίνη κατέστειλε το λόγο Bcl-2/Bax στη νορμοξία γεγονός που δικαιολογεί την προαγωγή της απόπτωσης, ωστόσο επέδειξε αδυναμία στη ρύθμιση του ούτως ή άλλως μειωμένου λόγου στην υποξία.

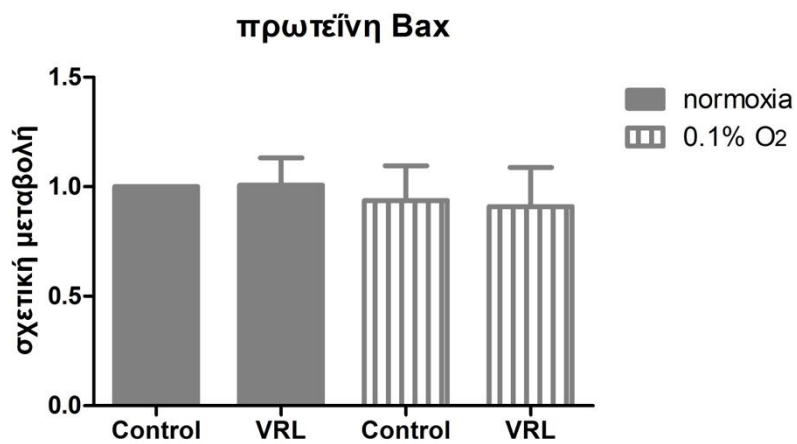
**A**



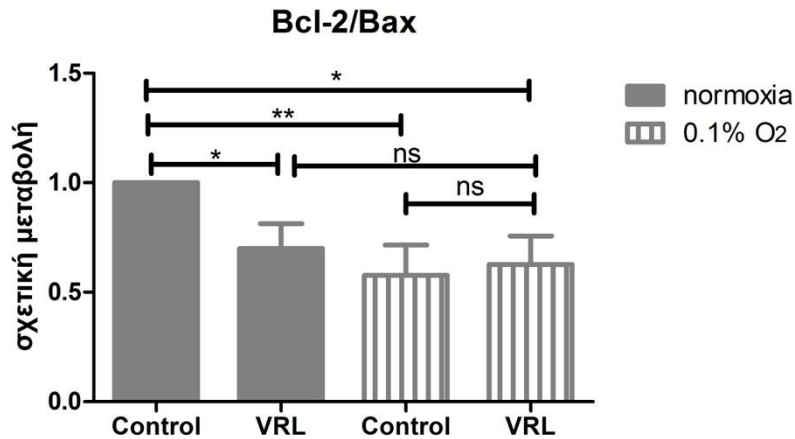
**B**



**Γ**



Δ

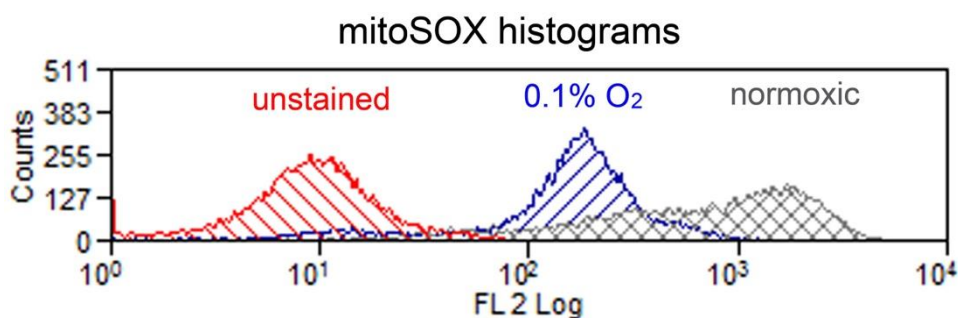
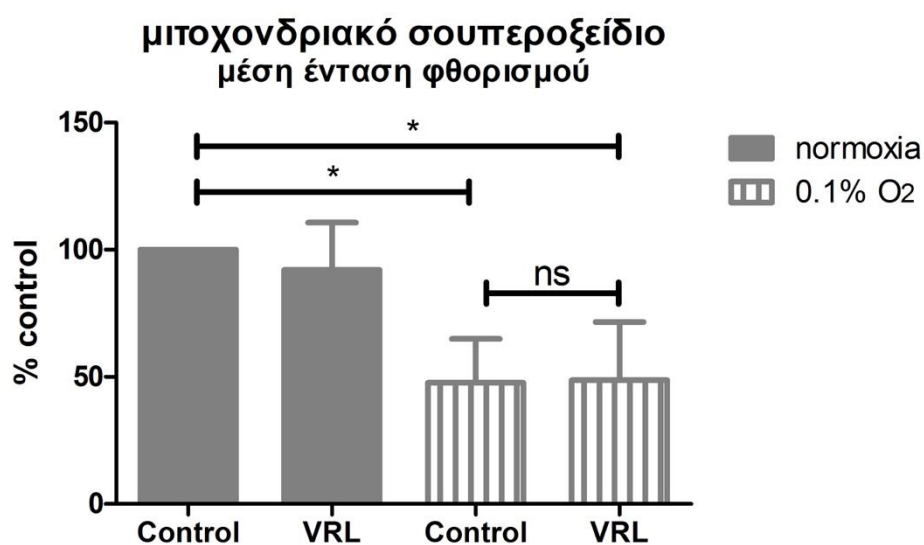


**Εικ 3.20. Η επίδραση της υποξίας (0.1%O<sub>2</sub>) και της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στις πρωτεΐνες Bcl-2, Bax και το λόγο Bcl-2/Bax. (Α) Αντιπροσωπευτικό άνοσο-αποτύπωμα των Bcl-2 και Bax.(Β) Μείωση της Bcl-2 από VRL και υποξία. (Γ) Χωρίς αλλαγές ο Bax. (Δ) Μείωση του λόγου Bcl-2/Bax από VRL και υποξία. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, ns: μη σημαντική μεταβολή, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.**

#### **3.4.4 Η επίδραση της υποξίας και της μετρονομικής βινορελμπίνης στο μιτοχονδριακό σουπεροξειδίο**

Προκειμένου να διερευνήσουμε την απουσία απόπτωσης στην υποξία παρά το χαμηλό λόγο Bcl-2/Bax, εξετάσαμε τα επίπεδα των δραστικών μορφών O<sub>2</sub>. Οι δραστικές μορφές O<sub>2</sub> εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από χημειοθεραπευτικά (37) ενώ είναι επίσης μεσολαβητές της μεταγωγής σήματος στην υποξία (83). Εξετάσαμε τα επίπεδα του μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου μετά από επώαση 24 ωρών στη σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) με ή χωρίς 10 nM VRL με τη μέθοδο mitosox (Εικ 3.21Α). Διαπιστώσαμε ελάττωση των επιπέδων του σουπεροξειδίου στην υποξία (47.6% ± 17.2% του νορμοξικού control, p<0.05) ενώ η μετρονομική βινορελμπίνη δεν είχε καμία επίδραση στη νορμοξία και υποξία (Εικ 3.21Β).



**A****B**

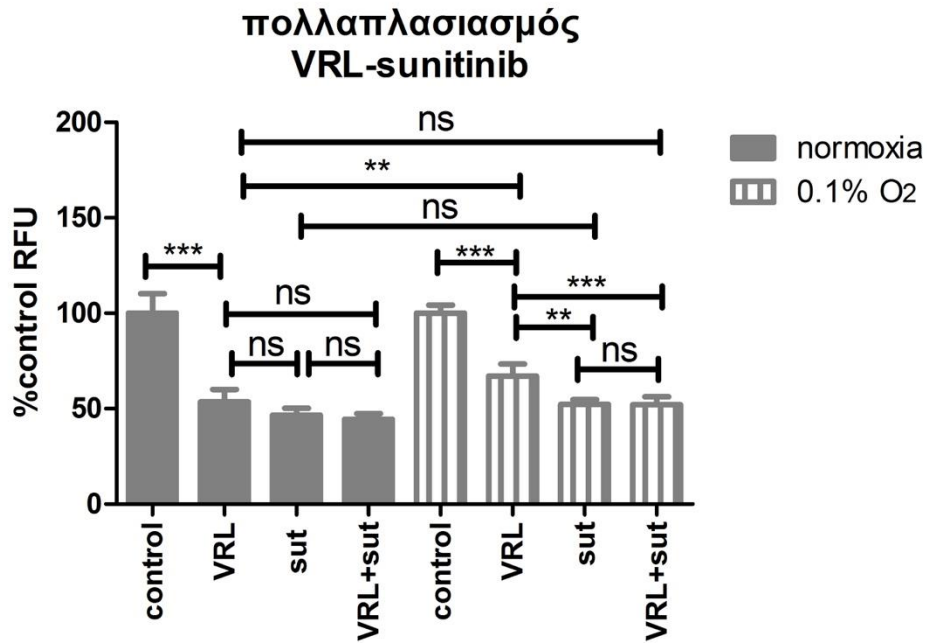
**Εικ 3.21 Ο ρόλος της υποξίας (0.1%O<sub>2</sub>) και της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στα επίπεδα του μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου.** (A) Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν την ένταση φθορισμού του mitoSOX σε πληθυσμούς των HUVEC στη νορμοξία και υποξία παρουσία αρνητικού μάρτυρα (unstained). (B) Τα επίπεδα μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου σε σχέση με το νορμοξικό μάρτυρα (control) όπως προσδιορίσθηκε από τη μέση ένταση φθορισμού. Οι βραχίονες σφάλματος αφορούν σε τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ± SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. One way anova, ns: μη σημαντική μεταβολή, \*p<0.05.

### **3.5 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΟΝΟΜΙΚΗΣ ΒΙΝΟΡΕΛΜΠΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ**

Δείξαμε ότι η υποξία ελάττωσε την ευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης οπότε θα μπορούσε να είναι ένας παράγοντας επίκτητης αντίστασης στη θεραπεία. Προκειμένου να διερευνήσαμε μεθόδους ανασχεσης αυτής της αντίστασης, εξετάσαμε το συνδυασμό της μετρονομικής βινορελμπίνης με παράγοντες μοριακής στόχευσης. Συγκεκριμένα μελετήσαμε τη συγχορήγηση μετρονομικής βινορελμπίνης με το sunitinib, αντιπροσωπευτικό αντιαγγειογενετικό φάρμακο, το οποίο αναστέλλει τόσο το μονοπάτι του VEGF όσο και άλλους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, το DBZ που είναι αναστολέας της  $\gamma$ -σεκρετάσης και καταστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch, κύριου συντονιστή της αγγειογένεσης με εκβλάστηση, siRNAs του HIF1a, κύριου μεσολαβητή της σηματοδότησης στην υποξία και αναστολέων της ERK και AKT που είναι βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια της κυτταρικής επιβίωσης.

#### **3.5.1 Ο ρόλος του sunitinib**

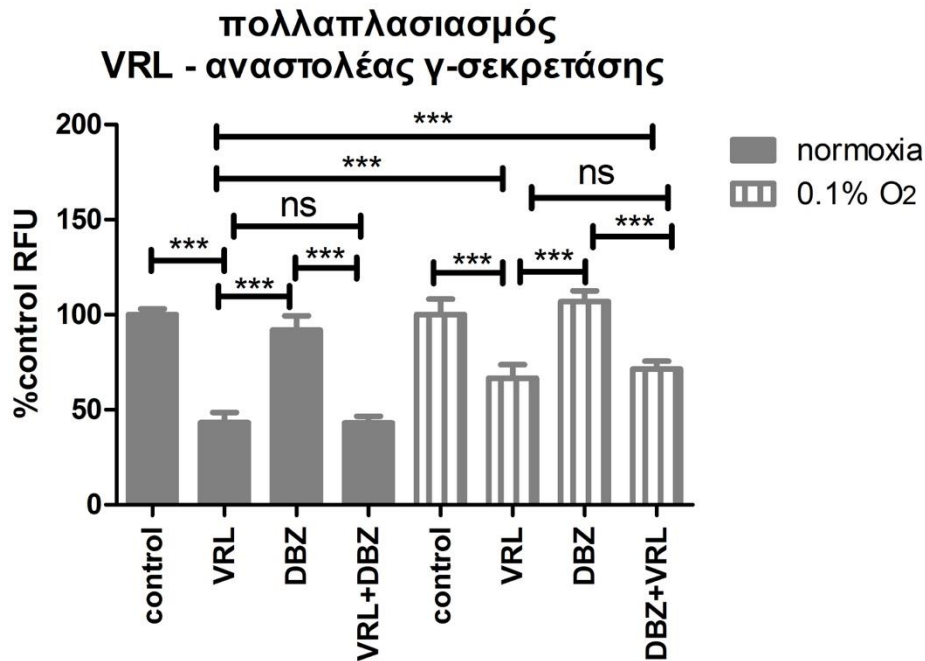
Εξετάσαμε την επίδραση 10 $\mu$ M sunitinib στον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων που επώασθηκαν στη νορμοξία ή σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) με ή χωρίς 10nM βινορελμπίνης για 24 ώρες. Διαπιστώσαμε ότι το αντί-πολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα του sunitinib δε διέφερε μεταξύ νορμοξίας-υποξίας. Στη νορμοξία, η αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκάλεσε το sunitinib ήταν του ίδιου μεγέθους με αυτή που προκάλεσε η μετρονομική βινορελμπίνη ενώ ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων είχε την ίδια δραστηριότητα με αυτή που είχε και η μετρονομική βινορελμπίνη. Στην υποξία όμως το sunitinib ήταν δραστικότερο από ότι η μετρονομική βινορελμπίνη ενώ ο συνδυασμός προκάλεσε μεγαλύτερη αναστολή από ότι η μετρονομική βινορελμπίνη στην υποξία και του ίδιου μεγέθους αναστολή με αυτήν που προκάλεσε η μετρονομική βινορελμπίνη στη νορμοξία. Ωστόσο το αντί-πολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα του συνδυασμού ήταν το ίδιο με αυτό που είχε το sunitinib από μόνο του χωρίς την παρουσία προσθετικής δράσης.



**Εικ 3.22.** Η επίδραση του sunitinib (sut) στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στη νορμοξία και υποξία (0.1% O<sub>2</sub>). Ο πολλαπλασιασμός (άξονας Y) προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο CyQUANT βάσει της Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένη στον αντίστοιχο μάρτυρα (Control) στη νορμοξία ή υποξία. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από πείραμα με έξι δείγματα ανά ομάδα. One way apoua, ns: μη σημαντική διαφορά, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### 3.5.2 Ο ρόλος του αναστολέα της γ-σεκρατάσης DBZ

Δεδομένου ότι η υποξία επάγει τον προσδέτη Delta Like 4 (DLL4) και κατ' επέκταση τη σηματοδότηση μέσω Notch που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικής στάσης (321), εξετάσαμε την αναστολή του μονοπατιού με τον αναστολέα της γ-σεκρετάσης DBZ. Μελετήσαμε την επίδραση των 100nM DBZ στον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων που επωάσθηκαν στη νορμοξία ή σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) με ή χωρίς 10nM βινορελμπίνης για 24 ώρες. Διαπιστώσαμε ότι το DBZ δεν είχε επίδραση στον πολλαπλασιασμό των HUVEC στη νορμοξία και υποξία ενώ δεν επηρέασε την ευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων στη μετρονομική βινορελμπίνη. Συμπερασματικά η αναστολή της γ-σεκρετάσης δεν αναχαίτισε στην αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στην υποξία.

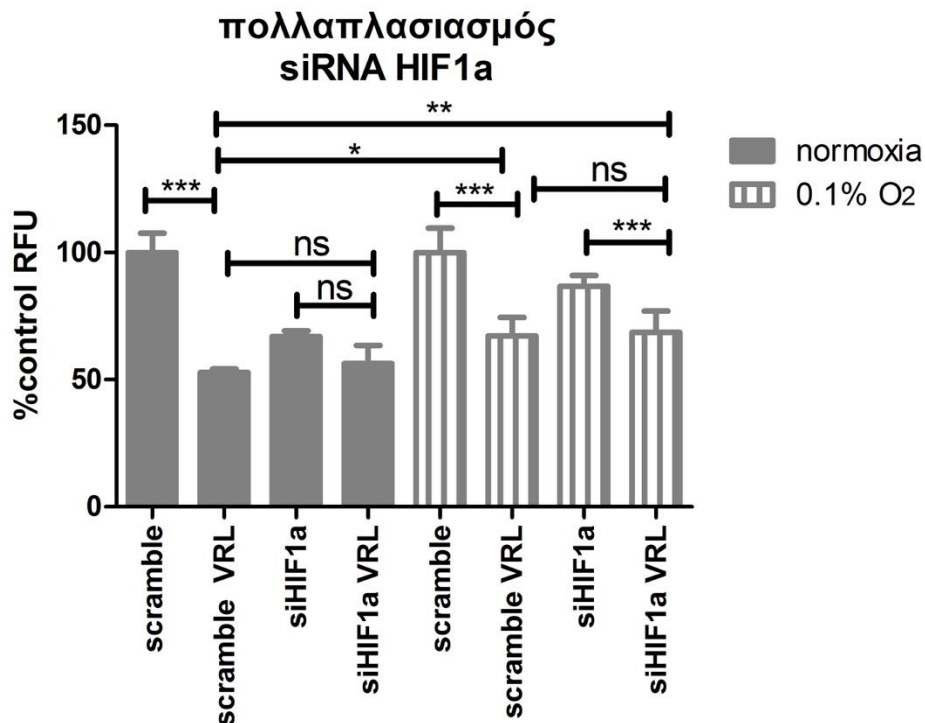


**Εικ 3.23.** Η επίδραση του DBZ στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στη νορμοξία και υποξία (0.1% O<sub>2</sub>). Ο πολλαπλασιασμός (άξονας Y) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο CyQUANT βάσει της Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένης στον αντίστοιχο μάρτυρα (Control) στη νορμοξία ή υποξία. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ± SD από πείραμα με έξι δείγματα ανά ομάδα. One way anova, ns: μη σημαντική διαφορά, \*\*\* p<0.001.

### 3.5.3 Ο ρόλος της καταστολής της έκφρασης του HIF1a

Ο HIF1a είναι ο κύριος μεσολαβητής της σηματοδότησης στην υποξία (73) και συμβάλλει στην προσαρμογή του κυττάρου στις εχθρικές συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης (322) ρυθμίζοντας σημαντικές βιολογικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός (323), η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση (290). Εξετάσαμε το ρόλο της καταστολής της έκφρασης του HIF1a με παρεμβολή από μικρά RNA (small interference RNA: siRNA) σε HUVEC που επωάστηκαν για 24 ώρες στη νορμοξία ή σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) με ή χωρίς 10nM VRL. Η μετρονομική βινορελμπίνη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό στον ίδιο βαθμό στα κύτταρα με κατασταλμένη έκφραση HIF1a όσο στα κύτταρα μάρτυρες που υπέστησαν παρεμβολή με μη ειδικό RNA (scramble) όταν η επώαση έγινε στις ίδιες συνθήκες οξυγόνωσης. Ωστόσο η μετρονομική βινορελμπίνη δεν ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό το ίδιο αποτελεσματικά στα κύτταρα με κατασταλμένη έκφραση HIF1a στην υποξία όσο στα

κύτταρα μάρτυρες (scramble) στη νορμοξία. Συμπερασματικά η καταστολή της έκφρασης του HIF1a δεν αναχαίτισε την αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης (Εικ 3.24).



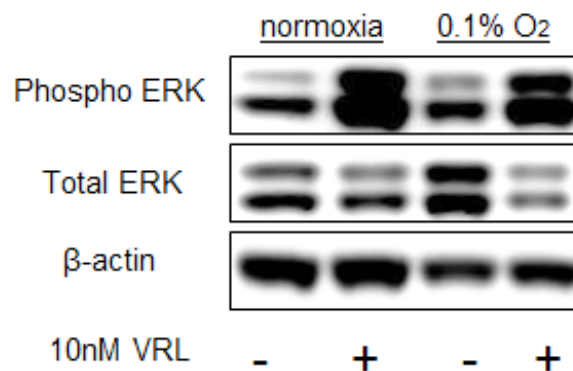
**Εικ 3.24.** Η επίδραση της καταστολής του HIF1a στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στη νορμοξία και υποξία (0.1% O<sub>2</sub>). Τα κύτταρα υπέστησαν παρεμβολή με ειδικό RNA για το HIF1a (siHIF1a) ενώ ως κύτταρα μάρτυρες χρησίμευσαν κύτταρα που υπέστησαν παρεμβολή με μη ειδικό RNA (scramble). Ο πολλαπλασιασμός (άξονας Y) προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο CyQUANT βάσει της Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένης στον αντίστοιχο μάρτυρα (scramble RNA) στη νορμοξία ή υποξία. Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από πείραμα με έξι δείγματα ανά ομάδα. One way anova, ns: μη σημαντική διαφορά, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### 3.5.4 Ο ρόλος της αναστολής της ERK κινάσης

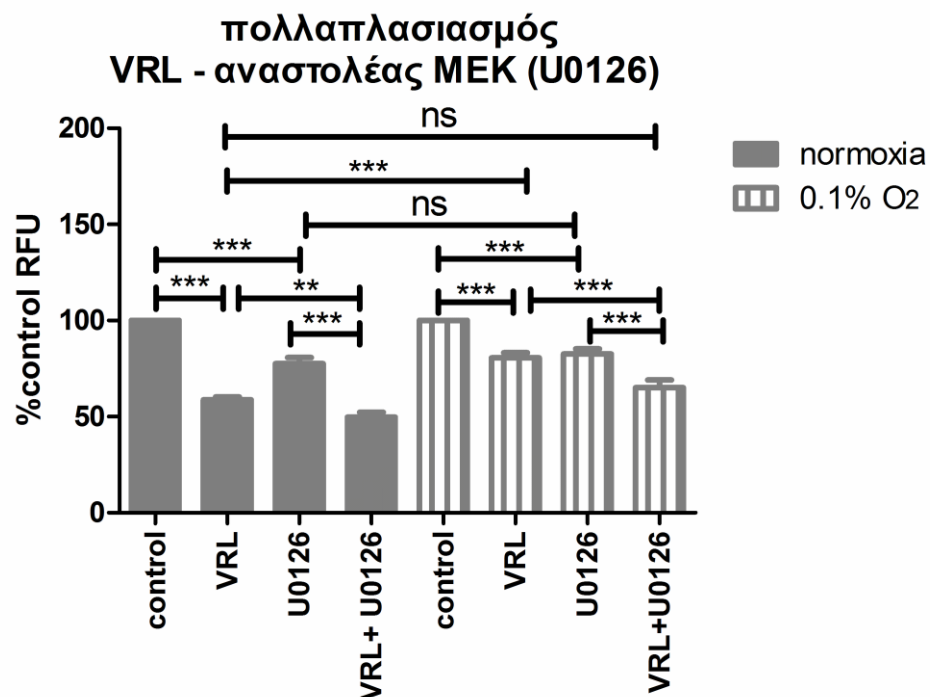
Η ERK κινάση είναι σημαντικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης (324). Επίσης από προσωπικά πειράματα διαπιστώθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης υπό την επίδραση 10 nM βινορελμπίνης για 24 ώρες στη νορμοξία και υποξία. Εξετάσαμε την επίδραση 1 μM του αναστολέα της MEK U0126 στον πολλαπλασιασμό των HUVEC που εκτέθηκαν σε 10nM

βινορελμπίνης στη νορμοξία ή σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) για 24 ώρες. Διαπιστώσαμε ότι ο βαθμός αναστολής του πολλαπλασιασμού από το U0126 ήταν ο ίδιος στη νορμοξία (p<0.001) και στην υποξία (p<0.001), ενώ το U0126 αύξησε την αντι-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης τόσο στη νορμοξία (p<0.01) όσο και στην υποξία (p<0.001). Τέλος το U0126 στην υποξία επανέφερε το αντί-πολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της μετρονομικής βινορελμπίνης σε επίπεδα νορμοξίας (Εικ 3.25).

**A**



**B**

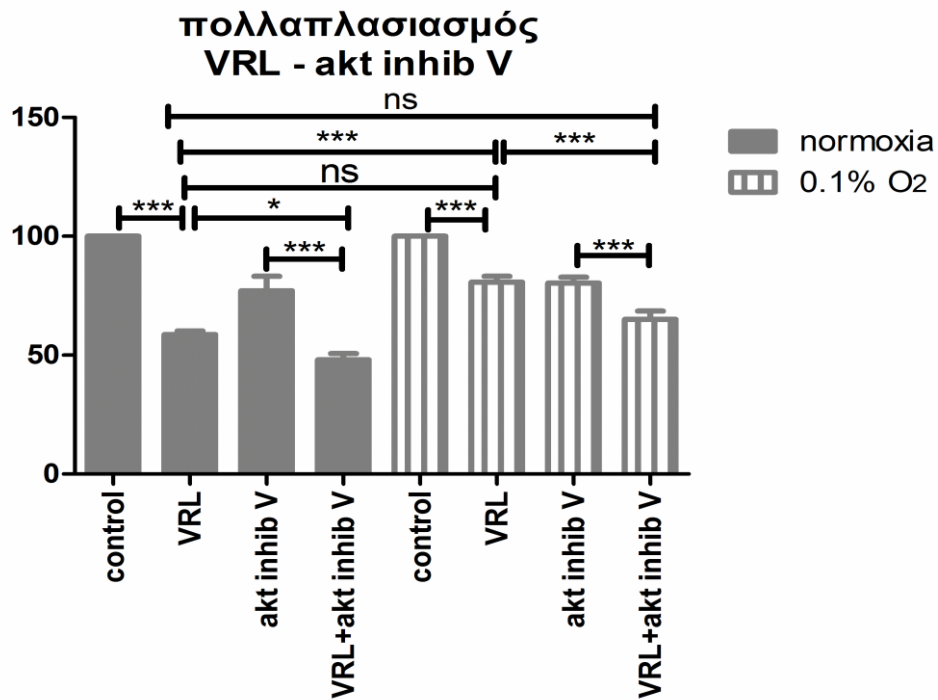


Εικ 3.25. Η επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL) στη φωσφορυλίωση της ERK και ο ρόλος του αναστολέα της MEK (U0126) στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση

**της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL).** (A) Άνοσο-αποτύπωμα που απεικονίζει τη φωσφορυλιωμένη (phospho) και ολική (total) ERK υπό την επίδραση VRL στη νορμοξία ή υποξία. Η β-actin χρησίμευσε ως μάρτυρας ισότιμης φόρτωσης. (B) Ο πολλαπλασιασμός προσδιορίστηκε με τη μέθοδο cyquant βάσει της Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένης στον αντίστοιχο μάρτυρα στη νορμοξία ή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>). Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από πείραμα με έξι δείγματα ανά ομάδα. One way anova, ns: μη σημαντική διαφορά, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### **3.5.5 Ο ρόλος της αναστολής της AKT κινάσης**

Το μονοπάτι της Akt είναι βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (325). Αναρωτηθήκαμε εάν η αναστολή της Akt θα μπορούσε να ευαισθητοποιήσει τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στην υποξία. Εξετάσαμε την επίδραση 10 μM του αναστολέα V της Akt στον πολλαπλασιασμό των HUVEC που εκτέθηκαν σε 10 nM βινορελμπίνης στη νορμοξία ή σοβαρή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>) για 24 ώρες. Διαπιστώσαμε ότι ο βαθμός αναστολής του πολλαπλασιασμού από τον αναστολέα V ήταν ο ίδιος στη νορμοξία (p<0.001) και στην υποξία (p<0.001) και ότι ο αναστολέας V αύξησε την αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης τόσο στη νορμοξία (p<0.05) όσο και στην υποξία (p<0.001). Τέλος ο αναστολέας V στην υποξία επανέφερε το αντί-πολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα της μετρονομικής βινορελμπίνης σε επίπεδα νορμοξίας (Εικ 3.26).



**Εικ 3.26.** Η επίδραση του αναστολέα V της Akt στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης (VRL). Ο πολλαπλασιασμός προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο cyquant βάσει της Relative Fluorescent Unit (RFU) κανονικοποιημένης στον αντίστοιχο μάρτυρα στη νορμοξία ή υποξία (0.1% O<sub>2</sub>). Οι βραχίονες σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD από πείραμα με έξι δείγματα ανά ομάδα. One way anova, ns: μη σημαντική διαφορά, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001.





## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διατριβή αυτή είναι μία *in vitro* μελέτη πάνω στο μηχανισμό δράσης του θεραπευτικού πρωτοκόλλου της μετρονομικής βινορελμπίνης και στους μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία. Αποσκοπεί δε στην αναζήτηση θεραπευτικών συνδυασμών που δημιουργούν συνέργεια σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Υποθέσαμε ότι η μετρονομική χημειοθεραπεία με βινορελμπίνη ασκεί αντί-νεοπλασματική δράση μέσω αντιαγγειογενετικού μηχανισμού. Ως εκ τούτου μελετήσαμε την επίδραση ενός εύρους συγκεντρώσεων βινορελμπίνης στα βήματα της αγγειογένεσης με εκβλάστηση (sprouting angiogenesis) *in vitro*.

Διαπιστώθηκε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή κρίσιμων λειτουργιών της αγγειογένεσης με εκβλάστηση. Ειδικότερα παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και του σχηματισμού ενδοθηλιακών σωλήνων μετά από ουδό συγκέντρωσης της τάξεως 1nM - 5nM βινορελμπίνης. Το εύρημα αυτό έχει σημαντικές μεταφραστικές προεκτάσεις καθώς μία συγκέντρωση χαμηλή όσο το 1nM πιθανώς να μην είναι αρκετά δραστική για τους ασθενείς. Απεναντίας η συγκέντρωση των 10nM που είναι επίσης κλινικά εφικτή (63, 64) χωρίς κλινικά εμφανή τοξικότητα έχει ισχυρή κατασταλτική δράση σε όλες τις λειτουργίες της αγγειογένεσης *in vitro*. Οπότε θα αποτελέσει τη μετρονομική συγκέντρωση αναφοράς.

Επιπλέον επιβεβαιώσαμε την αληθώς αντι-αγγειογενετική επίδραση της μετρονομικής συγκέντρωσης βινορελμπίνης. Πιο συγκεκριμένα τα 10nM μετρονομικής βινορελμπίνης κατέστειλαν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων χωρίς την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Απεναντίας η 100-φορές υψηλότερη συγκέντρωση των 1μM που προσομοιάζει τη μέγιστη ανεκτή δόση (315) προκάλεσε απόπτωση στον ίδιο χρόνο έκθεσης. Αυτό έρχεται να συμπληρώσει τα ευρήματα των Hayot και συνεργατών που υποστήριξαν ότι μόνο η πακλιταξέλη, η βιντεσίνη και η βινκριστίνη από τους παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων που μελέτησαν αναστέλλουν την αγγειογένεση σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (27). Στη μελέτη μας η μετρονομική βινορελμπίνη κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων σε παρατεταμένα χρονικά διαστήματα έκθεσης αλλά η επίδραση στη μετανάστευση και το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων δεν αποδόθηκε σε τοξικότητα.

Αν και ήδη έχουν περιγραφεί vinca alkaloids με αντιαγγειογενετική δράση, η καινοτομία της δικής μας μελέτης έγκειται στο ότι αποδεικνύουμε την αντιαγγειογενετική βάση ενός κλινικώς εφαρμόσιμου πρωτοκόλλου μετρονομικής

χημειοθεραπείας. Για παράδειγμα οι Vacca και συνεργάτες έδειξαν ότι η βινμπλαστίνη ανέστειλε την αγγειογένεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε προ-κλινικά μοντέλα (326) ενώ οι Rougoy και συνεργάτες ότι η βινφλουίνη ανέστειλε την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων σε μη τοξικές συγκεντρώσεις μέσω αύξησης της δυναμικής αστάθειας των μικροσωληνίσκων (50). Εμείς διαπιστώσαμε την καταστολή κρίσιμων λειτουργιών της αγγειογένεσης με ένας πλήρες σετ αγγειογενετικών δοκιμασιών από μία κλινικά ισοδύναμη μετρονομική συγκέντρωση.

Τέλος διαπιστώθηκε χρόνο-εξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού. Η βινορελμπίνη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό πιο αποτελεσματικά μετά από παρατεταμένο χρόνο επώασης ενώ αξιοσημείωτη είναι η υπεροχή της χαμηλής μετρονομικής συγκέντρωσης στο παρατεταμένο χρονικό διάστημα έκθεσης σε σχέση με τη συμβατική συγκέντρωση των 1μM στο σύντομο διάστημα έκθεσης. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την κλινική εφαρμογή του πρωτοκόλλου της χρόνιας χαμηλής δόσης μετρονομικής χημειοθεραπείας έναντι του πρωτοκόλλου της μέγιστης ανεκτής δόσης χημειοθεραπείας.

Τα ανωτέρω ευρήματα συμφωνούν με τα ευρήματα συγγραφέων που υποστηρίζουν την επιλεκτική ευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων στη μετρονομική χημειοθεραπεία. Οι Bertolini και συνεργάτες έδειξαν ότι ο αριθμός των ζωντανών κυκλοφορούντων προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (circulating endothelial progenitors: CEPs) μειώνεται στους μύες κατά τη μετρονομική χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης και αυξάνεται στα διαστήματα ελεύθερα θεραπείας σε πρωτόκολλο μέγιστης ανεκτής δόσης (15). Από την άλλη οι Pasquier και συνεργάτες διαπίστωσαν εξασθενημένη αγγειογενετική ικανότητα και αυξημένη χημειοευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση βινμπλαστίνης αλλά ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία μετά από πρωτόκολλο μέγιστης ανεκτής δόσης (327).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το μηχανισμό της αντιαγγειογενετικής δράσης της μετρονομικής βινορελμπίνης. Εξετάσαμε το ενδεχόμενο η δράση της να αποδίδεται στην απευθείας επίδραση του φαρμάκου στους μικροσωληνίσκους (26, 28). Διαπιστώσαμε μεταβολές στη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων και του δικτύου των μικροσωληνίσκων μετά από χρώση για β-τουμπουλίνη. Τα κύτταρα απώλεσαν την πολυγωνική μορφολογία τους και απέκτησαν στρόγγυλο σχήμα υπό την επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Προφανώς οι μεταβολές αυτές παρακωλύουν την ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να μετακινούνται και να εκκρίνονται προς τα παρακρινικά χημειο-ελκυστικά σήματα (chemoattractants), διαδικασία που απαιτείται για τη δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων (117). Οι Bijman και συνεργάτες υποστήριξαν ότι οι παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων (MTAs)

εμποδίζουν την ανάπτυξη πολικότητας στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη μετανάστευση (54). Η επίδραση των MTAs στους μικροσωληνίσκους οδηγεί σε περιορισμό της δραστηριότητας των Rho κινασών Rac & Cdc42 και επακόλουθη απώλεια της ακεραιότητας του δικτύου των ινών στρες ακτίνης (actin stress fibers) (54) οι οποίες χρειάζονται για τον ελκυσμό του κυττάρου κατά τη μετανάστευση (117). Επίσης έχειδειχθεί ότι οι MTAs επιδρούν ανασταλτικά στα σημεία τοπικής πρόσδεσης στην εξωκυττάρια ουσία (328) (focal adhesions) και τα σημεία προσκόλλησης με γειτονικά κύτταρα (329, 330) (adherence junctions) λόγω διαταραχών που προκαλούν στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω πιστεύουμε ότι η αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης οφείλεται εν μέρει στις διαταραχές που προκαλούνται στη δομή των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης και ακολούθως στα λοιπά μέρη του κυτταροσκελετού (54, 328).

Ωστόσο θα μπορούσε να εμπλέκεται και η επίδραση σε κάποιο αγγειογενετικό μονοπάτι. Η ενεργοποίηση του Notch οδηγεί σε καταστολή της αγγειογένεσης με εκβλάστηση μέσω της μειο-ρύθμισης της σηματοδότησης του VEGFR2 (139, 142). Υποθέσαμε ότι η ενεργοποίηση του Notch μπορεί να συμμετέχει στο μηχανισμό αντιαγγειογενετικής δράσης της βινορελμπίνης. Διαπιστώσαμε αύξηση των γονιδίων στόχων του Notch, Hey1 και Hes1, μετά από σύντομη έκθεση σε μετρονομική βινορελμπίνη. Ωστόσο παρατηρήθηκε μικρή μόνο αύξηση του NICD σε μεμονωμένο χρονικό σημείο που δεν εξηγεί την αύξηση του Hey1 σε ολόκληρη τη χρονική πορεία των αλλαγών του. Επίσης η ταυτόχρονη έκθεση στον αναστολέα της γ-σεκρετάσης DBZ που αναστέλλει την απελευθέρωση του NICD δεν επανέφερε τα επίπεδα του mRNA του Hey1 στο φυσιολογικό.

Οπότε η αύξηση του mRNA των γονιδίων στόχων του Notch πιθανώς να οφείλεται σε παρεμβολή επιπρόσθετων σηματοδοτικών μονοπατιών. Για παράδειγμα οι Curry και συνεργάτες έδειξαν ρύθμιση της έκφρασης του Hes1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα που δεν ήταν εξαρτώμενη από το Notch αλλά τη JNK (319). Επίσης έχει ανασκοπηθεί εκτενώς από την Osipov και τους συνεργάτες η πολύπλοκη αλληλεπίδραση των μονοπατιών του Notch και NFκB (318). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω υποθέσαμε ότι τα μονοπάτια των Notch και JNK μπορεί να εμπλέκονται στην επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στο Hey1. Η μετρονομική βινορελμπίνη οδήγησε σε ενεργοποίηση των NFκB και JNK εύρημα που επιβεβαιώνεται για κάποια vinca alkaloids (37, 331). Ωστόσο η ενεργοποίηση των ανωτέρω μονοπατιών δε φαίνεται να συσχετίζεται με τη δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στο hey1 καθώς οι αναστολείς της IKK και JNK δεν κατέστειλαν την επίδραση αυτή.

Επιπλέον η αύξηση του Hey1 από τη μετρονομική βινορελμπίνη δε συνοδεύτηκε από μείωση του VEGFR2 όπως αναμενόταν (139). Αντιθέτως διαπιστώθηκε μικρή αύξηση του mRNA του VEGFR2 σε ορισμένα χρονικά σημεία που δε συνοδεύονταν από αλλαγές στην ολική πρωτεΐνη ή τη φωσφορυλίωση του. Απεναντίας οι Meissner και συνεργάτες διαπίστωσαν μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης του VEGFR2 έπειτα από έκθεση σε βινμπλαστίνη (332). Ειδικότερα παρατήρησαν τόσο τη μειωμένη μεταγραφή του VEGFR2 λόγω ελαττωμένης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα sp-1 στον εκκινητή του γονιδίου όσο και την ελάττωση του χρόνου ημίσειας ζωής του mRNA του VEGFR2 (332). Βέβαια στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις βινμπλαστίνης (332) εν αντιθέσει με τη μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης που χρησιμοποιήσαμε εμείς.

Το μονοπάτι του Notch έχει επανειλημμένως μελετηθεί ως θεραπευτικός στόχος της αγγειογένεσης του καρκίνου (333). Οι θεραπευτικοί χειρισμοί αφορούν στην αναστολή του μονοπατιού και περιλαμβάνουν αντισώματα κατά του Notch (334) και των προσδετών του (335, 336) (ligands) καθώς και αναστολείς της γ-σεκρετάσης που καταστέλλουν την απελευθέρωση του NICD (337). Η απενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί σε χαοτικό μη λειτουργικό δίκτυο ελαττωματικών αγγείων με αποτέλεσμα την εκσεσημασμένη καταστολή της αιματικής παροχής του όγκου (336, 338). Από την άλλη πλευρά, η διέγερση του μονοπατιού στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν έχει μελετηθεί θεραπευτικά μέχρι στιγμής. Αυτό συμβαίνει λόγω τεχνικών δυσκολιών καθώς απαιτείται η καθήλωση του προσδέτη σε σταθερή επιφάνεια, όπως είναι η μεμβράνη του κυττάρου, προκειμένου να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας (juxtacrine signaling) (339).

Σε αυτή τη μελέτη παρουσιάζουμε ενδείξεις φαρμακολογικής ρύθμισης του μονοπατιού σε επίπεδο χαμηλότερο από αυτό του υποδοχέα του Notch με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχου. Ωστόσο πρέπει να συνυπολογιστεί η συσχέτιση του μονοπατιού με την αντίσταση στις αντιαγγειογενετικές θεραπείες. Για παράδειγμα οι Li και συνεργάτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του DLL4 *in vivo* οδήγησε σε ελαττωμένο μεν αριθμό αγγείων αλλά αυξημένης διαμέτρου με μειωμένη ανταπόκριση στην anti-VEGF θεραπεία λόγω της μείωσης των επιπέδων του VEGFR2 (167). Επίσης θα πρέπει να επισημανθεί ότι στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του VEGFR2 που είναι και το καταληκτικό σημείο της Notch σηματοδότησης. Ως εκ τούτου θα πρέπει να αξιολογηθεί με σύνεση η βιολογική σημασία της αύξησης των επιπέδων των Hes1 και Hey1.

Παρά τα ενθαρρυντικά προκλινικά αποτελέσματα, η κλινική πράξη έχει δείξει ότι ακόμη και οι ασθενείς που αρχικά ανταποκρίνονται στην αντιαγγειογενετική θεραπεία

προοδευτικά αναπτύσσουν ανθεκτικούς όγκους (162, 172). Οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες οδηγούν σε υποξία λόγω της καταστολής της αιμάτωσης του όγκου(184). Ωστόσο η υποξία υποκινεί μηχανισμούς διαφυγής των όγκων από τη θεραπευτική δράση των αναστολέων του μονοπατιού του VEGF (184). Αναρωτηθήκαμε εάν η υποξία προκαλεί αντίσταση και στην αντιαγγειογενετική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης.

Διαπιστώσαμε ότι η υποξία δεν είχε επίδραση *per se* στις λειτουργίες της μετανάστευσης, του σχηματισμού ενδοθηλιακών σωλήνων και της εκβλάστησης. Ωστόσο οι Calvani και συνεργάτες έδειξαν ότι η υποξία προήγαγε το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων (340). Οι ερευνητές καλλιέργησαν τα HUVEC σε θρεπτικό μέσο χωρίς συμπλήρωμα τροφικών παραγόντων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης με αυτοκρινικό μηχανισμό μέσω της επαγόμενης από την υποξία έκκρισης b-FGF (340). Στη μελέτη μας τα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με συμπληρώματα τροφικών παραγόντων και εμβρυϊκού βόειου ορού (fetal bovine serum: FBS), όπως απαιτείται για την ιδανική ανάπτυξη των HUVEC, προκειμένου να προσομοιάσουμε το βιοχημικά σύνθετο μικροπεριβάλλον του όγκου (162). Παρομοίως οι Calvani και συνεργάτες παρατήρησαν συγκρίσιμο βαθμό ανάπτυξης ενδοθηλιακών σωλήνων στην υποξία και νορμοξία όταν στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν τροφικοί παράγοντες (340).

Επιπλέον η υποξία δεν επηρέασε την κατασταλτική επίδραση της μετρονομικής βινορελμπίνης στη μετανάστευση, το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων και την εκβλάστηση. Προφανώς αυτό υποδηλώνει διατήρηση της ικανότητας της μετρονομικής βινορελμπίνης να καταστέλλει αγγειογενετικές λειτουργίες που απαιτούν συμμετοχή του κυτταροσκελετού (117). Οι Peng και συνεργάτες βέβαια έδειξαν ότι η υποξία οδήγησε σε σταθεροποίηση του δικτύου των μικροσωληνίσκων σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα μέσω επαγωγής του Egr-1 (early growth response-1) με αποτέλεσμα την ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στον αποπολυμερισμό από MTAs (341). Εμείς ωστόσο χρησιμοποιήσαμε μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης που ανήκει σε εύρος συγκεντρώσεων που δεν προκαλούν αποπολυμερισμό αλλά καταστολή της δυναμικής των μικροσωληνίσκων (342, 343). Φυσικά τα ευρήματα των Peng και συνεργατών αντιπαραβάλλονται και από τα αποτελέσματα των Hu και συνεργατών που έδειξαν ότι η υποξία προκαλεί αποπολυμερισμό του δικτύου των μικροσωληνίσκων σε καρδιομυοκύτταρα και καρκινικά HeLa μέσω της P38/MAPK μεσολαβούμενης φωσφορυλίωσης της MAP4 (344).

Από την άλλη διαπιστώσαμε ότι η υποξία προκάλεσε αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Το αποτέλεσμα αυτό

είναι σε συμφωνία με ευρήματα ερευνητών που έδειξαν ότι η υποξία μείωσε την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά (309, 345, 346). Ενδεικτικά οι Huang και συνεργάτες έδειξαν ότι η υποξία οδήγησε σε αντίσταση των ωοθηκικών καρκινικών κυττάρων στην πακλιταξέλη μέσω του HIF1a (345), ενώ οι Raz και συνεργάτες διαπίστωσαν αντίσταση σε ανάλογα φυλλικού οξέως λόγω της επαγόμενης από την υποξία κυτταρικής στάσης (346).

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το μηχανισμό αντίστασης στη μετρονομική βινορελμπίνη εξετάζοντας τον κυτταρικό κύκλο. Διαπιστώσαμε ότι η υποξία προκάλεσε στάση των κυττάρων στη G1 φάση (G1 phase arrest) μέσω της αύξησης της έκφρασης του κύκλινο-εξαρτώμενου αναστολέα κινάσης (cyclin dependent kinase: cdk) p27<sup>kip</sup>. Οι Gardner και συνεργάτες έδειξαν ότι η υποξία αύξησε τον p27<sup>kip</sup> ο οποίος εμποδίζει την είσοδο του κυττάρου στην S φάση προκαλώντας στάση του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση μέσω καταστολής της ενεργότητας του ενζύμου της CDK2 (320).

Επιπλέον έχει ήδη περιγραφεί ότι τα vinca alkaloids αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό προκαλώντας στάση του κυτταρικού κύκλου στη G2/M φάση (31). Σύμφωνα με τους Nghan και συνεργάτες η βινορελμπίνη καταστέλλει τη δυναμική των μικροσωληνίσκων αποδιοργανώνοντας τη μιτωτική άτρακτο (32) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μετάβασης από τη μετάφαση στην ανάφαση της μίτωσης (31, 32). Σε συμφωνία με τα παραπάνω διαπιστώσαμε ότι η μετρονομική βινορελμπίνη προκάλεσε στάση του κυτταρικού κύκλου των HUVEC στη G2/M φάση στη νορμοξία. Ωστόσο η υποξία κατέστειλε αυτή την επίδραση. Πιστεύουμε ότι η ανακατανομή του πληθυσμού των HUVEC στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου περιόρισε τη δυνατότητα της μετρονομικής βινορελμπίνης να προσβάλει τους μικροσωληνίσκους στη μίτωση (31, 32, 342). Συμπερασματικά η αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης οφείλεται εν πολλοίς στην αδυναμία πρόκλησης μιτωτικού μπλοκ στην υποξία.

Επιπλέον η υποξία κατέστειλε την προ-αποπτωτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Το ενδογενές μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι φαίνεται πως εμπλέκεται στην πρόκληση απόπτωσης από τα vinca alkaloids (37, 48). Ειδικότερα οι Bourgarel-Rey και συνεργάτες έδειξαν ότι η βινορελμπίνη επάγει την απόπτωση καταστέλλοντας την πρωτεΐνη του Bcl-2 (48). Το ισοζύγιο των προ-αποπτωτικών και αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας του Bcl-2 καθορίζει εάν το κύτταρο θα οδηγηθεί στην απόπτωση ή όχι μέσω διατήρησης της ακεραιότητας ή διάτρησης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (41). Ως εκ τούτου εξετάσαμε τα επίπεδα της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και της αντί-αποπτωτικής Bcl-2.



Διαπιστώσαμε ότι η μετρονομική βινορελμπίνη προκάλεσε πτώση των επιπέδων του Bcl-2 και του λόγου Bcl-2/Bax στη νορμοξία ως αναμενόταν. Ωστόσο και η υποξία ελάττωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης του Bcl-2 και του λόγου Bcl-2/Bax χωρίς την πρόκληση απόπτωσης. Η μετρονομική βινορελμπίνη όμως δεν ελάττωσε περαιτέρω το λόγο σε σχέση με τον υποξικό μάρτυρα. Συνεπώς η μετρονομική βινορελμπίνη επιδεικνύει αδυναμία να ρυθμίσει το λόγο Bcl-2/Bax στην υποξία.

Αν και ο Bcl-2 έχει αντί-αποπτωτικό ρόλο, μελέτες έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα συσχετίζονται με πτωχή ανταπόκριση στους παράγοντες αντιμικροσωληνίσκων (MTAs). Οι Esteve και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η καταστολή των επιπέδων του Bcl-2 συνδέεται με αντίσταση των ωοθηκικών καρκινικών κυττάρων στη βινφλουνίνη (347). Από την άλλη οι Savry και συνεργάτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του Bcl-2 ενίσχυσε τη δραστικότητα της βινορελμπίνης και της πακλιταξέλης σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα και μαστού μέσω της αύξησης της έκφρασης του Bim (348).

Στη συνέχεια αναρωτηθήκαμε γιατί τα ενδοθηλιακά κύτταρα μάρτυρες επιβιώνουν παρά το χαμηλό λόγο Bcl-2/Bax στην υποξία (42). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αποτελούν αναπόσπαστο συστατικό στοιχείο της μεταγωγής σήματος στην υποξία (84). Επίσης εμπλέκονται στην πρόκληση απόπτωσης από τα χημειοθεραπευτικά (241). Εξετάσαμε τα επίπεδα του ανιόντος του σουπεροξειδίου στο μιτοχόνδριο την κύρια πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου.

Διαπιστώσαμε ότι η μετρονομική βινορελμπίνη δε μετέβαλε τα επίπεδα του μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου στη νορμοξία και στην υποξία. Οι Chiu και συνεργάτες έδειξαν ότι τα vinca alkaloids οδήγησαν τα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα στην απόπτωση μέσω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες και της συνακόλουθης ενεργοποίησης της JNK (37). Ωστόσο μέτρησαν τα συνολικά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου του κυττάρου αντί για το ανιόν του σουπεροξειδίου του μιτοχονδρίου που μετρήσαμε εμείς και εφάρμοσαν μικρομοριακές συγκεντρώσεις βινορελμπίνης (37) σε αντιδιαστολή με τη χαμηλή μετρονομική που εφαρμόσθηκε στη μελέτη μας.

Επιπλέον διαπιστώσαμε ελάττωση των επιπέδων του ανιόντος του σουπεροξειδίου στο μιτοχόνδριο στην υποξία. Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου στην υποξία είναι αμφιλεγόμενο θέμα (349). Οι Chandel και συνεργάτες έδειξαν ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου αυξάνονται στην υποξία και σταθεροποιούν τα επίπεδα του HIF1a (83). Ωστόσο χρησιμοποίησαν μοντέλο επώασης στην ήπια υποξία (1.5 %O<sub>2</sub>) για 6 ώρες (83) σε αντιδιαστολή με τη σοβαρή υποξία (0.1%O<sub>2</sub>) που εφαρμόσαμε εμείς για παρατεταμένο διάστημα 24 ωρών.

Πιθανώς η πτώση των επιπέδων του μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου να αποτελεί μηχανισμό προστασίας από την απόπτωση στην υποξία (241, 350, 351). Η απόπτωση απαιτεί την απελευθέρωση κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα (212). Το κυτόχρωμα C βέβαια είναι προσδεμένο σε φωσφολιπίδια καρδιολιπίνης στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και η απελευθέρωση του διέπεται από την υπόθεση των δύο βημάτων (246). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία απαιτείται αφενός η διάτρηση της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και ο σχηματισμός πόρου BaxBak, αφετέρου το κυτόχρωμα C θα πρέπει να είναι διαθέσιμο σε διαλυτή μορφή ή έστω χαλαρά συζευγμένο με την καρδιολιπίνη προκειμένου να είναι σε θέση να διέλθει από τον πόρο (247, 352). Η οξειδωση της καρδιολιπίνης από τις δραστικές μορφές οξυγόνου οδηγούν στην αποδέσμευση του κυτοχρώματος C και η επίδραση αυτή φαίνεται πως είναι αναπόσπαστο κομμάτι της απόπτωσης (249). Ως εκ τούτου η πτώση των επιπέδων του ανιόντος του σουπεροξειδίου στην υποξία φαίνεται πως εμποδίζει την ανωτέρω διαδικασία και ενδεχομένως μεσολαβεί την αντίσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην απόπτωση στην υποξία.

Έχοντας δείξει ότι η σοβαρή υποξία μεσολαβεί αντίσταση στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης, εξετάσαμε τρόπους να αναχαιτίσουμε αυτή την αντίσταση. Οπότε μελετήσαμε το συνδυασμό της μετρονομικής βινορελμπίνης με παράγοντες μοριακής στόχευσης που θα μπορούσαν να δημιουργούν συνέργεια σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο.

Αρχικά μελετήσαμε την επίδραση του αναστολέα τυροσινικής κινάσης sunitinib που είναι ένας αντιπροσωπευτικός αντιαγγειογενετικός παράγοντας που αναστέλλει πολλαπλά μονοπάτια (158). Διαπιστώσαμε ότι ο συνδυασμός sunitinib-βινορελμπίνης στην υποξία είχε την ίδια αποτελεσματικότητα με τη βινορελμπίνη στη νορμοξία ενώ το sunitinib ανέστειλε ομότιμα τον πολλαπλασιασμό στις δύο συνθήκες οξυγόνωσης. Η ισότιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων στη νορμοξία και υποξία είναι ενθαρρυντικό εύρημα για τη χρήση του sunitinib ως παράγοντα στόχευσης υποξικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ιδιότητα αυτή πιθανώς εξηγείται από τη δυνατότητα να προκαλεί στάση και απόπτωση στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (353). Η G1 είναι η φάση που σταματά ο κυτταρικός κύκλος στην υποξία και τα κύτταρα είναι ανθεκτικά στη βινορελμπίνη. Οπότε σε αυτή την περίπτωση τα ανθεκτικά στη βινορελμπίνη κύτταρα θα μπορούσαν να ευαισθητοποιηθούν από το sunitinib.

Ωστόσο στην περίπτωση της συνδυαστικής θεραπείας θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν και ο χρονικός τρόπος χορήγησης (scheduling). Η ταυτόχρονη έκθεση σε sunitinib θα μπορούσε να ανταγωνίζεται την πρόκληση μιτωτικού μπλοκ από τη

βινορελμπίνη (354, 355). Το γεγονός μάλιστα ότι ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων είχε το ίδιο μέγεθος αποτελέσματος με αυτό του sunitinib υποδηλώνει έλλειψη προσθετικής δράσης και επίδραση αποκλειστικά εξαρτώμενη από το sunitinib. Ιδανικά, η μετρονομική χορήγηση βινορελμπίνης με διαλείπουσα έκθεση σε sunitinib ίσως έχει καλύτερη αποτελεσματικότητα (356, 357) και αξίζει περαιτέρω διερεύνησης. Τέλος σε μελλοντικές μελέτες πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν και την ενδεχόμενη τοξικότητα του συνδυασμού, αν μάλιστα συνυπολογίσουμε ότι τα 10μM sunitinib είναι μια υψηλή συγκέντρωση σε σχέση με τα επίπεδα που παρατηρούνται στο αίμα των ασθενών (358).

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση της καταστολής του μονοπατιού του Notch του κύριου συντονιστή της σηματοδότησης στην αγγειογένεση με εκβλάστηση (134). Οι Patel και συνεργάτες έδειξαν ότι η υποξία αύξησε την έκφραση του Dll4 και συντέλεσε στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του Notch (137). Από την άλλη οι Nosedo και συνεργάτες έδειξαν ότι η διέγερση του μονοπατιού προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση (359). Οπότε θεωρητικά η καταστολή του μονοπατιού θα προκαλούσε επανεκκίνηση του κυτταρικού κύκλου και θα καθιστούσε το ενδοθηλιακό κύτταρο ευάλωτο στη βινορελμπίνη. Εξετάσαμε το συνδυασμό της μετρονομικής βινορελμπίνης με τον αναστολέα της γ-σεκρετάσης DBZ. Διαπιστώσαμε ότι η καταστολή του μονοπατιού του Notch δεν αναχαίτισε την αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στην υποξία.

Προφανώς υπεισέρχονται επιπρόσθετοι μηχανισμοί εκτός από το μονοπάτι του Notch στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στην υποξία. Για παράδειγμα ήδη δείξαμε την επαγωγή p27<sup>kip</sup> (320), τη ρύθμιση των πρωτεϊνών της οικογένειας του Bcl-2 και τη ρύθμιση των επιπέδων του μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου στην υποξία. Επιπρόσθετοι μηχανισμοί έχουν άλλωστε περιγραφεί στη βιβλιογραφία (295, 360). Τέλος η ενεργοποίηση του Notch μεσολαβείται από το HIF1α(137) που είναι ο κύριος ρυθμιστής της σηματοδότησης στην υποξία (73) ο οποίος ελέγχει πληθώρα μονοπατιών σχετιζόμενων με την απόπτωση (290) και τον κυτταρικό κύκλο (320, 361) και το μονοπάτι του Notch είναι μόνο ένα από τα μονοπάτια που ρυθμίζονται από το HIF-1α στην υποξία. Συνεπώς η καταστολή του Notch δε φαίνεται να είναι καθοριστική για την αντιστροφή της υποξικής αντίστασης. Ωστόσο δεν πρέπει να αποκλείουμε τη μελέτη του συνδυασμού σε *in vivo* μελέτες στο μέλλον, δεδομένου ότι η καταστολή του Notch έχει συσχετισθεί με καλύτερη ανταπόκριση στην αντιαγγειογενετική θεραπεία (167).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το κεντρικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α στην υποξία (73) εξετάσαμε το ρόλο της καταστολής της έκφρασης του.

Διαπιστώσαμε ότι η παρεμβολή του HIF-1a με siRNA δεν αναχαίτισε την αντίσταση στην υποξία. Έχει δειχθεί ότι η απενεργοποίηση του μονοπατιού του HIF-1a αυξάνει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB-231 στην πακλιταξέλη (362), των γλοιοματικών κυττάρων T98G στη δοξορουβικίνη και ετοποσιδίη (363), των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF7 στη μεθοτρεξάτη(364) και των κυττάρων μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα στη σισπλατίνη και δοξορουβικίνη (365). Ωστόσο στην περίπτωση μας δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην ευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων στη μετρονομική βινορελμπίνη με την καταστολή του HIF1a. Πιθανώς αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο HIF1a έχει τόσο αντί-αποπτωτική όσο και προ-αποπτωτική δράση (300, 366). Ειδικότερα φαίνεται πως σταθεροποιεί τα επίπεδα του προ-αποπτωτικού p53 (298, 367) ο οποίος εμπλέκεται μεταξύ των άλλων στη ρύθμιση των επιπέδων του bcl-2 από τη βινορελμπίνη (48). Επίσης ο HIF1a αυξάνει την έκφραση του προ-αποπτωτικού Bnip3 (368) ο οποίος αναστέλλει τη δράση των αντί-αποπτωτικών μελών της οικογένειας του Bcl-2 (369). Συνεπώς η καταστολή του HIF1a είναι δίκοπο μαχαίρι καθώς δεν εξασθενεί μόνο αντί-αποπτωτικούς αλλά και προ-αποπτωτικούς μηχανισμούς (300).

Επιπλέον ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση ρυθμίζονται από μηχανισμούς μη εξαρτώμενους από τον HIF-1a . Οι Dong και συνεργάτες έδειξαν ότι η σοβαρή υποξία αύξησε την έκφραση του αναστολέα της απόπτωσης IAP-2 μέσω μηχανισμού που δε μεσολαβείται από τον HIF-1a (360). Από την άλλη οι Gardner και συνεργάτες υποστήριξαν ότι η επαγωγή του p27<sup>kip</sup> που προκαλεί G1 arrest στην υποξία δεν εξαρτάται από το HIF-1a (320). Συνεπώς ο HIF-1a δεν είναι ο αποκλειστικός παράγοντας που ρυθμίζει την προσαρμογή του κυττάρου στην υποξία. Η υποξία εκτός από επαγωγή του HIF-1a προκαλεί stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress) το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την UPR (unfolded protein response) που είναι ένας ξεχωριστός μηχανισμός προσαρμογής του κυττάρου στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου όπως έχει ανασκοπηθεί από τους Wouters και συνεργάτες (291).

Δεδομένου ότι το μονοπάτι της ERK είναι κρίσιμο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την αγγειογένεση, εξετάσαμε το ρόλο της αναστολής του στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα στην υποξία. Διαπιστώσαμε ότι η αναστολή της MEK αναχαίτισε την αντίσταση στην υποξία. Ο συνδυασμός χημειοθεραπευτικών με αναστολείς του μονοπατιού της RAF/MEK/ERK έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα καθώς υπερέχει της μονοθεραπείας σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων με διαφορετικές κατηγορίες χημειοθεραπευτικών. Ενδεικτικά να αναφέρουμε το συνδυασμό δοξορουβικίνης με αναστολέα της MEK σε ηπατικά

καρκινικά κύτταρα (370) και τη συγχορήγηση αναστολέα MEK με δοσεταξέλη σε μοντέλο μελανώματος (371). Επιπλέον το μονοπάτι συχνά ενεργοποιείται μετά τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών. Για παράδειγμα η πακλιταξέλη προκάλεσε ενεργοποίηση της ERK σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και η προσθήκη αναστολέα της MEK αύξησε την προ-αποπτωτική δράση της πακλιταξέλης (372). Οπότε η συγχορήγηση αναστολέα MEK με χημειοθεραπευτικά θα μπορούσε να συμβάλει στην αντιμετώπιση της χημειοαντίστασης.

Από την άλλη κρίσιμος είναι ο ρόλος του μονοπατιού της RAF/MEK/ERK στην αγγειογένεση καθώς είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του για τη μετάδοση αγγειογενετικών σημάτων μέσω των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (373). Ο συνδυασμός μάλιστα μετρονομικής χημειοθεραπείας με τον αναστολέα της RAF sorafenib έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αν και χρειάζεται σχεδιασμός μεγαλύτερων μελετών (374).

Το μονοπάτι της MEK/ERK ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση σε αρκετά επίπεδα. Η ERK ασκεί αντί-αποπτωτική δράση μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών BAD και BIM αλλά και της εναρκτήριας κασπάσης-9 (255, 324). Από την άλλη η ERK ενισχύει τη δράση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Mcl-1 (255, 324). Συνεπώς η αναστολή της ERK φαίνεται να ευαισθητοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην προ-αποπτωτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Οπότε η προσθήκη αναστολέα της MEK στη θεραπεία με αντιαγγειογενετική μετρονομική βινορελμπίνη θα μπορούσε να είναι ένας ορθολογικός συνδυασμός για την αύξηση της αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης στην υποξία.

Εκτός από την ERK, το μονοπάτι της Akt παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την αγγειογένεση. Γι αυτό εξετάσαμε την επίδραση της αναστολής της Akt στην αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα στην υποξία. Όπως και με την ERK διαπιστώσαμε αναχαίτιση της υποξικής αντίστασης. Το μονοπάτι της Akt έχει συσχετιστεί με αντίσταση καρκινικών κυττάρων σε διάφορες κατηγορίες χημειοθεραπευτικών (375). Για παράδειγμα η Akt επάγει την αντίσταση στη σισπλατίνη σε καρκινικά κύτταρα των ωθηκών και του τραχήλου της μήτρας μέσω σταθεροποίησης της Protein Phosphatase Magnesium-dependent 1 D (PPM1D) (376). Από την άλλη ανθεκτικά στην πακλιταξέλη καρκινικά κύτταρα ωθηκών παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης Akt τα οποία ανέκτησαν την ευαισθησία τους μετά την προσθήκη αναστολέα της Akt (377). Επίσης το μονοπάτι της Akt/FoxO/Bim συντονίζει την επιβίωση των cancer stem cells δηλαδή των κυττάρων που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν νέους όγκους και

είναι υπεύθυνα για την υποτροπή της νόσου (378). Ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα από την κλινική ανάπτυξη αναστολέων του μονοπατιού της Akt όπως προκύπτει από μελέτες συνδυασμών με άλλα αντί-νεοπλασματικά φάρμακα (379).

Επιπλέον η ενεργοποίηση της Akt είναι απαραίτητη για τη μετάδοση των αγγειογενετικών σημάτων. Οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης μεταδίδουν τα σήματα επιβίωσης, πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των αγγειογενετικών παραγόντων μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt (380). Από την άλλη η Akt φαίνεται να διεγείρει τόσο το μονοπάτι του HIF1α όσο και του VEGF (381). Τέλος έχειδειχθεί η Akt να ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας αυξάνοντας την επιβίωση των κυττάρων (382). Ως εκ τούτου ο συνδυασμός αντιαγγειογενετικής μετρονομικής βινορελμπίνης με αναστολέα της Akt φαίνεται να δημιουργεί συνέργειες σε πολλαπλά επίπεδα.

Το μονοπάτι της Akt ρυθμίζει την επιβίωση των κυττάρων μέσω πολλαπλών οδών (258). Η Akt καταστέλλει τη δραστικότητα του προ-αποπτωτικού Bax με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η διάτρηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (383). Επιπλέον καταστέλλει τη δραστικότητα της προ-αποπτωτικής BH3-only πρωτεΐνης Bad που παρεμποδίζει τη δράση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (282). Από την άλλη καταστέλλει την έκφραση των BH3-only προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα FoxO (283). Επίσης η αναστολή της Akt οδηγεί σε ενεργοποίηση της GSK3-β και στη συνέχεια αποκόλληση της Hexokinase-ii (HK II) από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη (384, 385). Η απομάκρυνση της HK II οδηγεί σε διάτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω δημιουργίας διαπερατού πόρου μετάπτωσης (386). Η δημιουργία διαπερατού πόρου μετάπτωσης οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητα από την παρουσία λειτουργικού πόρου Bax/Bak (46). Τέλος η Akt προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση σε μετά-μιτοχονδριακό επίπεδο απενεργοποιώντας την εναρκτήρια κασπάση-9 και την εκτελεστική κασπάση-3 (285). Η ενεργοποίηση των κασπασών είναι το καταληκτικό βήμα της απόπτωσης με αποδόμηση των συστατικών μερών του κυττάρου (225).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω φαίνεται πως η αναστολή της Akt συνιστά μία ρεαλιστική λύση για την ευαισθητοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην αντί-πολλαπλασιαστική και προ-αποπτωτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης.

Συμπερασματικά αποδεικνύουμε ότι η κλινικά εφικτή μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης των 10nM είναι αντιαγγειογενετική *in vitro*. Συνεπώς η κλινική αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου θα μπορούσε να αποδοθεί εν πολλοίς στην αντί-αγγειογένεση. Η μετρονομική βινορελμπίνη αν και προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του Hey1 δεν οδήγησε σε μεταβολές στη φωσφορυλίωση του VEGFR2.

Συνεπώς η αντιαγγειογενετική δράση της είναι αμφίβολο να οφείλεται στην επίδραση στο Hey1. Η υποξία η οποία επάγεται από τις αντιαγγειογενετικές θεραπείες οδήγησε σε έκπτωση της αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης της μετρονομικής βινορελμπίνης αφήνοντας ανεπηρέαστη την επίδραση στις λοιπές λειτουργίες της αγγειογένεσης. Η αντίσταση αυτή θα μπορούσε να είναι παράγοντας θεραπευτικής αποτυχίας. Ωστόσο η αναστολή των μονοπατιών της ERK και Akt την αναχαίτισαν. Ο συνδυασμός αναστολέων των μονοπατιών της Akt και ERK με μετρονομική βινορελμπίνη είναι ελπιδοφόρος και αξίζει περαιτέρω διερεύνησης.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η μετρονομική συγκέντρωση των 10nM βινορελμπίνης ανέστειλε τα κρίσιμα βήματα της αγγειογένεσης *in vitro*: τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων και την αγγειογενετική εκβλάστηση.
- Η μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης αύξησε την έκφραση του mRNA του γονιδίου στόχου του Notch Hey1.
- Η αύξηση της έκφρασης του mRNA του Hey1 δε μεσολαβήθηκε από αύξηση της έκφρασης του NICD ενώ δεν οφείλεται σε ενεργοποίηση των μονοπατιών NFκB και JNK όπως διαπιστώθηκε από δοκιμασίες αναστολής των ανωτέρω μονοπατιών.
- Η αύξηση της έκφρασης του mRNA του Hey1 δε συνοδεύτηκε από μεταβολές της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα VEGFR2.
- Η σοβαρή υποξία δεν επηρέασε την ιδιότητα της μετρονομικής βινορελμπίνης να αναστέλλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων και τη δημιουργία αγγειογενετικών εκβλαστήσεων.
- Η σοβαρή υποξία εξασθένησε την ιδιότητα της μετρονομικής βινορελμπίνης να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Η αντίσταση στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης συνοδεύτηκε από εξασθένηση της ικανότητας της να προκαλεί στάση στη φάση G2/M και να επάγει την απόπτωση στη σοβαρή υποξία.
- Η μείωση της προ-αποπτωτικής δράσης της μετρονομικής βινορελμπίνης συνοδεύτηκε από αδυναμία ρύθμισης του ούτως ή άλλως μειωμένου λόγου Bcl-2/Bax στη σοβαρή υποξία. Από την άλλη παρά το μειωμένο λόγο Bcl-2/Bax, τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν οδηγήθηκαν στην απόπτωση πιθανώς λόγω του ελαττωμένου σουπεροξειδίου στη σοβαρή υποξία.
- Ο αναστολέας του VEGFR2 sunitinib ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στη νορμοξία και στη σοβαρή υποξία στον ίδιο βαθμό με τη μετρονομική βινορελμπίνη στη νορμοξία, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε προσθετικό όφελος.



- Ο αναστολέας της γ-σεκρετάσης DBZ και η καταστολή της έκφρασης του HIF1α δεν οδήγησαν σε αύξηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της μετρονομικής βινορελμπίνης.
- Ο αναστολέας της MEK, U0126 και ο αναστολέας V της Akt αναχαίτισαν την αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στη σοβαρή υποξία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετρονομική χημειοθεραπεία ορίζεται ως η παρατεταμένη, αδιάλειπτη χορήγηση χαμηλών μη τοξικών δόσεων χημειοθεραπευτικών. Η βινορελμπίνη είναι ένα ημισυνθετικό αλκαλοειδές της *vinca* που έχει το πλεονέκτημα της *p.o.s* χορήγησης, γεγονός που ευνοεί τη χρήση της σε πρωτόκολλα χρόνιας χορήγησης χημειοθεραπευτικών όπως είναι η περίπτωση της μετρονομικής χημειοθεραπείας. Μελέτες τύπου φάσης I και II έδειξαν ότι η μετρονομική χημειοθεραπεία με βινορελμπίνη ασκεί παρατεταμένη αντί-νεοπλασματική δράση. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις χαμηλές ναυτομοριακές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, την αμελητέα τοξικότητα και το προφίλ των αγγειογενετικών παραγόντων που παρατηρήθηκαν στο αίμα ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, η κλινική δράση του πρωτοκόλλου πιθανώς αποδίδεται σε αντιαγγειογενετικό μηχανισμό.

Ως εκ τούτου, εξετάσαμε εάν η κλινικά εφικτή μετρονομική συγκέντρωση ασκεί αντιαγγειογενετική δράση *in vitro*. Διαπιστώσαμε ότι τα 10nM βινορελμπίνης ανέστειλαν κρίσιμες λειτουργίες της αγγειογένεσης. Συγκεκριμένα, η μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης ανέστειλε τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δημιουργία ενδοθηλιακών σωλήνων χωρίς ωστόσο να επάγει τον κυτταρικό θάνατο, εν αντιθέσει με τη συμβατική συγκέντρωση του 1μM που ήταν τοξική. Επιπλέον η μετρονομική βινορελμπίνη ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη δημιουργία αγγειογενετικών εκβλαστήσεων.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το μηχανισμό αυτής της ανασταλτικής επίδρασης. Διαπιστώσαμε ότι η χαμηλή συγκέντρωση των 10nM μετέβαλε τη μορφολογία του δικτύου των μικροσωληνίσκων εύρημα συμβατό με την αντιαγγειογενετική της δράση. Ωστόσο, θεωρήσαμε ότι υπεισέρχονται επιπρόσθετοι μηχανισμοί που εμπλέκουν κρίσιμα μονοπάτια της αγγειογένεσης όπως του Notch και του VEGF.

Το μονοπάτι του Notch προσδιορίζει το φαινότυπο των ενδοθηλιακών κυττάρων σε *tip/stalk cell* και καταστέλλει την αγγειογενετική εκβλάστηση ελαττώνοντας τα επίπεδα του VEGFR2. Διαπιστώσαμε ότι τα 10nM βινορελμπίνης αύξησαν τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου στόχου του Notch, HEY1 χωρίς ωστόσο να αυξήσουν τα επίπεδα του NICD (Notch Intracellular Domain) ενώ ο αναστολέας της γ-σεκρετάσης DBZ δεν κατέστειλε τα επίπεδα του HEY1 σημαντικά. Ο NFκB και η JNK διασταυρώνονται με το μονοπάτι του Notch και αυξάνουν τα επίπεδα των γονιδίων στόχου του Notch. Διαπιστώσαμε ότι η μετρονομική συγκέντρωση βινορελμπίνης οδήγησε σε μετακίνηση του NFκB στον πυρήνα και φωσφορυλίωση της JNK. Ωστόσο ο αναστολέας III της IKK και ο αναστολέας II της JNK δεν εμπόδισαν την επίδραση στο HEY1, εύρημα που υποδηλώνει ότι η δράση αυτή δεν

αποδίδεται σε ενεργοποίηση των NFκB και JNK. Επιπλέον η αύξηση του HEY1 παραδόξως συνοδεύτηκε από μικρή αύξηση των επιπέδων του mRNA του VEGFR2 χωρίς ωστόσο να επηρεαστούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και η φωσφορυλίωση του VEGFR2.

Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες έχουν παροδική επίδραση καθώς οι όγκοι γίνονται τελικά ανθεκτικοί στη θεραπεία. Η επαγόμενη από τη θεραπεία υποξία θεωρείται ο μέγας ενορχηστρωτής αυτής της αντίστασης. Εξετάσαμε εάν η σοβαρή υποξία μεσολαβεί αντίσταση και στη δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Διαπιστώσαμε ότι η σοβαρή υποξία δεν επηρέασε τη δυνατότητα της μετρονομικής βινορελμπίνης να αναστέλλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων και την αγγειογενετική εκβλάστηση. Ωστόσο προκάλεσε αντίσταση στην αντί-πολλαπλασιαστική της δράση.

Διερευνήσαμε το μηχανισμό της υποξικής αντίστασης μελετώντας την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο. Η σοβαρή υποξία εξασθένησε τη δυνατότητα της μετρονομικής βινορελμπίνης να προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στη G2/M φάση καθώς προκάλεσε μετακίνηση του κυτταρικού πληθυσμού στη G1 φάση και ελάττωσε τον αριθμό των κυττάρων στην S φάση μέσω αύξησης της έκφρασης του κυκλινό-εξαρτώμενου αναστολέα κινάσης p27<sup>kip</sup>.

Επιπλέον η σοβαρή υποξία περιόρισε την προ-αποπτωτική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Μελετήσαμε το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι το οποίο εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τα αλκαλοειδή της νίπσα. Διαπιστώσαμε ότι η μετρονομική βινορελμπίνη ελάττωσε το λόγο Bcl-2/Bax στη νορμοξία. Η σοβαρή υποξία ελάττωσε το λόγο Bcl-2/Bax χωρίς ωστόσο να προάγει τον κυτταρικό θάνατο ενώ η μετρονομική βινορελμπίνη δεν κατέστειλε το λόγο περαιτέρω. Ως εκ τούτου η μετρονομική βινορελμπίνη επέδειξε αδυναμία να ρυθμίσει το λόγο Bcl-2/Bax στη σοβαρή υποξία. Το γεγονός αυτό πιθανώς εξηγεί την εξασθετισμένη προ-αποπτωτική της δράση στη σοβαρή υποξία.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το μηχανισμό επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στη σοβαρή υποξία παρά το χαμηλό λόγο Bcl-2/Bax. Οι μιτοχονδριακές δραστικές μορφές οξυγόνου προάγουν την οξειδωση της καρδιολιπίνης συντελώντας στη χαλαρή σύνδεση του κυτοχρώματος C και τη δίοδο του από τον πόρο Bax. Διαπιστώσαμε ότι η σοβαρή υποξία ελάττωσε τα επίπεδα του μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου. Αυτό ενδεχομένως εξηγεί την ελαττωμένη απελευθέρωση κυτοχρώματος C ακόμη και σε περιπτώσεις που ο λόγος Bcl-2/Bax είναι χαμηλός.

Τέλος αναζητήσαμε μεθόδους να ανατρέψουμε την αντίσταση στην υποξία. Αρχικά εξετάσαμε το ρόλο των δύο βασικών μονοπατιών της αγγειογένεσης με εκβλάστηση, VEGF και Notch. Γι αυτό μελετήσαμε το συνδυασμό της μετρονομικής βινορελμπίνης με sunitinib, αναστολέα του VEGFR2, και DBZ, αναστολέα της γ-σεκρετάσης. Το sunitinib ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στον ίδιο βαθμό στη νορμοξία και υποξία και στον ίδιο βαθμό με τη μετρονομική βινορελμπίνη στη νορμοξία. Ωστόσο ο συνδυασμός τους δεν είχε προσθετική δράση. Το DBZ δε μετέβαλε στην ευαισθησία των ενδοθηλιακών κυττάρων στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Στη συνέχεια εξετάσαμε το ρόλο του HIF1α του βασικού ρυθμιστή της σηματοδότησης στην υποξία. Η αποσιώπηση της έκφρασης του HIF1α με παρεμβολή RNA δεν επηρέασε την ευαισθησία των HUVEC στην αντί-πολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης. Τέλος εξετάσαμε την αναστολή των μονοπατιών της ERK και Akt που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, απόπτωση και αγγειογένεση. Ο αναστολέας της MEK U0126 και ο αναστολέας V της Akt αύξησαν την αντιπολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης στη νορμοξία και σοβαρή υποξία και ανέτρεψαν την υποξική αντίσταση.

Συμπερασματικά, παρέχουμε ισχυρές *in vitro* ενδείξεις για την αντιαγγειογενετική βάση του πρωτοκόλλου της μετρονομικής χημειοθεραπείας με βινορελμπίνη και του μηχανισμού δράσης της. Επιπλέον δείξαμε ότι η σοβαρή υποξία προκάλεσε αντίσταση στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της μετρονομικής βινορελμπίνης και ότι η αναστολή των μονοπατιών της Akt και ERK ανέστρεψαν αυτή την αντίσταση. Ο συνδυασμός της μετρονομικής βινορελμπίνης με αναστολείς της ERK και Akt αξίζει περαιτέρω διερεύνησης.

## ABSTRACT

Metronomic chemotherapy is the protracted dose dense administration of low sub-toxic doses of chemotherapy. Vinorelbine is a semisynthetic vinca alkaloid with the additional advantage of the oral formulation which favors its use in the chronic administration protocol of metronomic chemotherapy. Clinical studies have demonstrated that the metronomic administration of vinorelbine creates sustainable anti-tumor efficacy. Considering the low nanomolar concentrations of the drug, the negligible toxicity and the profile of circulating angiogenic biomarkers we speculated that the antitumor activity is most likely attributed to anti-angiogenic activity.

We sought to determine whether the clinically relevant concentration is anti-angiogenic *in vitro*. We found that 10 nM vinorelbine inhibited critical functions of the angiogenic process. In particular, it inhibited human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) migration and tube formation without simultaneous induction of cell death as opposed to the conventional concentration of 1  $\mu$ M which was toxic. Moreover metronomic vinorelbine inhibited HUVEC proliferation and angiogenic sprouting.

We next investigated the mechanism of this inhibitory effect. Apart from the direct anti-tubular activity that was observed we also examined Notch signaling. Notch pathway is a critical coordinator of tip/stalk cell specification and is known to suppress angiogenic sprouting by downregulating VEGFR2. We found that 10nM vinorelbine increased the mRNA of the Notch target gene Hey1 without concomitant increase of the Notch Intracellular Domain (NICD). NF $\kappa$ B and JNK have been shown to cross talk with Notch and upregulate its target genes. We found that the metronomic concentration of vinorelbine induced the translocation of the NF $\kappa$ B subunits in the nucleus and JNK phosphorylation. However the IKK inhibitor iii and JNK inhibitor ii did not block the effect on Hey1 mRNA suggesting that is not attributable to NF $\kappa$ B and JNK pathway activation. Moreover the upregulation of Hey1 mRNA was unexpectedly followed by a small increase of VEGFR2 mRNA without altering VEGFR2 protein expression and phosphorylation.

Clinical studies have shown that anti-angiogenic therapies have an ephemeral effect since tumors become eventually refractory to therapy. Treatment-induced hypoxia emerges as a major mechanism of resistance. We investigated whether severe hypoxia mediates resistance to metronomic vinorelbine treatment. We showed that severe hypoxia did not alter the ability of metronomic vinorelbine to inhibit endothelial cell migration, tube formation and sprouting. However severe hypoxia mediated resistance to its anti-proliferative action.

To investigate this hypoxic resistance we examined cell cycle and apoptosis. Severe hypoxia attenuated the ability of metronomic vinorelbine to induce G2/M arrest as it shifted the cell population to the G1 phase and decreased the fraction of the cells in the DNA synthesis S phase through upregulation of the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p27<sup>kip</sup>. Furthermore severe hypoxia lessened the pro-apoptotic action of metronomic vinorelbine. We examined the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway as it is implicated in the cell death caused by vinca alkaloids. We found that metronomic vinorelbine decreased the Bcl-2/Bax ratio in normoxia. Surprisingly the Bcl-2/Bax ratio was also reduced in severe hypoxia without simultaneous induction of the cell death and metronomic vinorelbine did not further reduce the ratio. Metronomic vinorelbine failed to regulate the Bcl-2/Bax ratio in severe hypoxia and this may account for its decreased pro-apoptotic activity. We also questioned the mechanism of survival of endothelial cells in severe hypoxia despite the low Bcl-2/Bax ratio. Mitochondrial reactive oxygen species are required for cardiolipin oxidation which results in a loose attachment of cytochrome C. The latter renders cytochrome C able to pass through bax pore. We showed that severe hypoxia decreased mitochondrial superoxide production. Low superoxide may explain decreased cytochrome C release even with low Bcl-2/Bax ratio.

Finally we sought to find ways to overcome this hypoxic resistance. At first we examined the impact of two major pathways of sprouting angiogenesis. We investigated the combination of metronomic vinorelbine with sunitinib which is a VEGFR2 inhibitor and DBZ which is  $\gamma$ -secretase inhibitor that suppresses Notch signaling. Sunitinib inhibited proliferation to the same extent in normoxia and severe hypoxia and to the same extent as metronomic vinorelbine in normoxia. However the combination had no additive effect. DBZ did not alter the sensitivity of endothelial cells to the anti-proliferative action of metronomic vinorelbine. We next investigated the role of HIF-1 $\alpha$  the master regulator of hypoxia. Suppression of HIF-1 $\alpha$  protein levels by RNA interference did not alter the sensitivity of HUVECs to the anti-proliferative action of metronomic vinorelbine. Finally, we inhibited Akt and ERK which play critical role in cell survival, apoptosis and angiogenesis. The MEK inhibitor U0126 and the Akt inhibitor V increased the anti-proliferative effect of metronomic vinorelbine in normoxia and severe hypoxia and reversed the hypoxic resistance.

In conclusion, we provide evidence for the anti-angiogenic basis of metronomic vinorelbine and its mechanism of action. We show that severe hypoxia confers resistance to its anti-proliferative activity and that ERK and Akt inhibition restored its effectiveness. Combination strategies with these agents warrant further investigation.

## Βιβλιογραφία

1. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(6):423-36.
2. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
3. Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L. Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *Journal of theoretical biology*. 2003;220(4):545-54.
4. Andre N, Pasquier E. For cancer, seek and destroy or live and let live? *Nature*. 2009;460(7253):324.
5. Gatenby RA. A change of strategy in the war on cancer. *Nature*. 2009;459(7246):508-9.
6. Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, Jr. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(4):1195-206.
7. Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1991;13(1):31-6.
8. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6.
9. Anderson GR, Stoler DL, Brenner BM. Cancer: the evolved consequence of a destabilized genome. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2001;23(11):1037-46.
10. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer research*. 2000;60(7):1878-86.
11. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(8):R15-24.
12. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(8):1045-7.
13. Reynolds AR. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2009;8(3):253-84.
14. Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nature medicine*. 2009;15(4):392-400.
15. Bertolini F, Paul S, Mancuso P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer research*. 2003;63(15):4342-6.
16. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, et al. Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood*. 2005;106(9):3058-61.
17. Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, Orlando L, Maisonneuve P, Pruneri G, et al. Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood*. 2006;108(2):452-9.

18. Strijbos MH, Gratama JW, Schmitz PI, Rao C, Onstenk W, Doyle GV, et al. Circulating endothelial cells, circulating tumour cells, tissue factor, endothelin-1 and overall survival in prostate cancer patients treated with docetaxel. *Eur J Cancer*. 2010;46(11):2027-35.
19. Mancuso P, Bertolini F. Circulating endothelial cells as biomarkers in clinical oncology. *Microvascular research*. 2010;79(3):224-8.
20. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P. On the clinical relevance of circulating endothelial cells and platelets in prostate cancer. *British journal of cancer*. 2013;108(6):1387.
21. Garcia AA, Hirte H, Fleming G, Yang D, Tsao-Wei DD, Roman L, et al. Phase II clinical trial of bevacizumab and low-dose metronomic oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer: a trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital phase II consortia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(1):76-82.
22. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, et al. Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(30):4899-905.
23. Pasquier E, Kavallaris M, Andre N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nature reviews Clinical oncology*. 2010;7(8):455-65.
24. Yang CP, Verdier-Pinard P, Wang F, Lippaine-Horvath E, He L, Li D, et al. A highly epothilone B-resistant A549 cell line with mutations in tubulin that confer drug dependence. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(6):987-95.
25. Sabnis GJ, Macedo LF, Goloubeva O, Schayowitz A, Brodie AM. Stopping treatment can reverse acquired resistance to letrozole. *Cancer research*. 2008;68(12):4518-24.
26. Pasquier E, Honore S, Braguer D. Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand? *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2006;9(1-2):74-86.
27. Hayot C, Farinelle S, De Decker R, Decaestecker C, Darro F, Kiss R, et al. In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton. *International journal of oncology*. 2002;21(2):417-25.
28. Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(8):2594-601.
29. Perez EA. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(8):2086-95.
30. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(4):253-65.
31. Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer research*. 1991;51(8):2212-22.
32. Ngan VK, Bellman K, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Molecular pharmacology*. 2001;60(1):225-32.
33. Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 15):2579-85.
34. Rovini A, Savry A, Braguer D, Carre M. Microtubule-targeted agents: when mitochondria become essential to chemotherapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):679-88.
35. Lee LF, Li G, Templeton DJ, Ting JP. Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(43):28253-60.



36. Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, et al. Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(9):4928-36.
37. Chiu WH, Luo SJ, Chen CL, Cheng JH, Hsieh CY, Wang CY, et al. Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(9):1159-71.
38. Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer research*. 1996;56(6):1253-5.
39. Pourroy B, Carre M, Honore S, Bourgarel-Rey V, Kruczynski A, Briand C, et al. Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest and a mitochondrial pathway. *Molecular pharmacology*. 2004;66(3):580-91.
40. Pathan N, Aime-Sempe C, Kitada S, Haldar S, Reed JC. Microtubule-targeting drugs induce Bcl-2 phosphorylation and association with Pin1. *Neoplasia*. 2001;3(1):70-9.
41. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology*. 2008;18(4):157-64.
42. Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2014;21(2):206-15.
43. Yamada T, Egashira N, Imuta M, Yano T, Yamauchi Y, Watanabe H, et al. Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(1):120-7.
44. Rostovtseva TK, Sheldon KL, Hassanzadeh E, Monge C, Saks V, Bezrukov SM, et al. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(48):18746-51.
45. Carre M, Andre N, Carles G, Borghi H, Brichese L, Briand C, et al. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(37):33664-9.
46. Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*. 2006;25(34):4744-56.
47. Tan G, Heqing L, Jiangbo C, Ming J, Yanhong M, Xianghe L, et al. Apoptosis induced by low-dose paclitaxel is associated with p53 upregulation in nasopharyngeal carcinoma cells. *International journal of cancer*. 2002;97(2):168-72.
48. Bourgarel-Rey V, Savry A, Hua G, Carre M, Bressin C, Chacon C, et al. Transcriptional down-regulation of Bcl-2 by vinorelbine: identification of a novel binding site of p53 on Bcl-2 promoter. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(9):1148-56.
49. Pasquier E, Honore S, Pourroy B, Jordan MA, Lehmann M, Briand C, et al. Antiangiogenic concentrations of paclitaxel induce an increase in microtubule dynamics in endothelial cells but not in cancer cells. *Cancer research*. 2005;65(6):2433-40.
50. Pourroy B, Honore S, Pasquier E, Bourgarel-Rey V, Kruczynski A, Briand C, et al. Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells. *Cancer research*. 2006;66(6):3256-63.
51. Schliwa M, Euteneuer U, Graf R, Ueda M. Centrosomes, microtubules and cell migration. *Biochemical Society symposium*. 1999;65:223-31.
52. Ueda M, Graf R, MacWilliams HK, Schliwa M, Euteneuer U. Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(18):9674-8.
53. Hotchkiss KA, Ashton AW, Mahmood R, Russell RG, Sparano JA, Schwartz EL. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel

(Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Molecular cancer therapeutics*. 2002;1(13):1191-200.

54. Bijman MN, van Nieuw Amerongen GP, Laurens N, van Hinsbergh VW, Boven E. Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(9):2348-57.

55. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology*. 2004;265(1):23-32.

56. Lau DH, Xue L, Young LJ, Burke PA, Cheung AT. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 1999;14(1):31-6.

57. Avramis IA, Kwock R, Avramis VI. Taxotere and vincristine inhibit the secretion of the angiogenesis inducing vascular endothelial growth factor (VEGF) by wild-type and drug-resistant human leukemia T-cell lines. *Anticancer research*. 2001;21(4A):2281-6.

58. Fang D, Sun L, Lin S, Zhou L, Su N, Yuan S, et al. Vinorelbine inhibits angiogenesis and 95D migration via reducing hypoxic fibroblast stromal cell-derived factor 1 secretion. *Experimental biology and medicine*. 2012;237(9):1045-55.

59. Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  accumulation and activity by disrupting microtubule function. *Cancer research*. 2005;65(19):9021-8.

60. Carbonaro M, Escuin D, O'Brate A, Thadani-Mulero M, Giannakakou P. Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(15):11859-69.

61. Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling*. 2009;3(3-4):189-200.

62. Bocci G, Francia G, Man S, Lawler J, Kerbel RS. Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12917-22.

63. Briasoulis E, Pappas P, Puozzo C, Tolis C, Fountzilas G, Dafni U, et al. Dose-ranging study of metronomic oral vinorelbine in patients with advanced refractory cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(20):6454-61.

64. Briasoulis E, Aravantinos G, Kouvatseas G, Pappas P, Biziota E, Sainis I, et al. Dose selection trial of metronomic oral vinorelbine monotherapy in patients with metastatic cancer: a hellenic cooperative oncology group clinical translational study. *BMC cancer*. 2013;13(1):263.

65. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

66. Folkman J, Long DM, Jr., Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer*. 1963;16:453-67.

67. Greene HS. Heterologous Transplantation of Mammalian Tumors : I. The Transfer of Rabbit Tumors to Alien Species. *The Journal of experimental medicine*. 1941;73(4):461-74.

68. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*. 2009;19(5):329-37.

69. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):401-10.

70. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1117-33.

71. Groebe K, Vaupel P. Evaluation of oxygen diffusion distances in human breast cancer xenografts using tumor-specific in vivo data: role of various mechanisms in the development

of tumor hypoxia. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1988;15(3):691-7.

72. Olive PL, Vikse C, Trotter MJ. Measurement of oxygen diffusion distance in tumor cubes using a fluorescent hypoxia probe. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1992;22(3):397-402.

73. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Current opinion in genetics & development*. 1998;8(5):588-94.

74. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2006;59(1):15-26.

75. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5510-4.

76. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):343-54.

77. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72.

78. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. 2001;292(5516):464-8.

79. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, et al. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(22):12436-41.

80. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(36):22642-7.

81. Cash TP, Pan Y, Simon MC. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology & medicine*. 2007;43(9):1219-25.

82. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(20):11715-20.

83. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25130-8.

84. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GR, et al. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *The Journal of cell biology*. 2007;177(6):1029-36.

85. Hagen T. Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1 $\alpha$ : The Balance Tips. *Biochemistry research international*. 2012;2012:436981.

86. Hoffman DL, Salter JD, Brookes PS. Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;292(1):H101-8.

87. Masson N, Singleton RS, Sekirnik R, Trudgian DC, Ambrose LJ, Miranda MX, et al. The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO reports*. 2012;13(3):251-7.

88. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & development*. 2001;15(20):2675-86.

89. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cellular signalling*. 2005;17(1):1-9.
90. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393-402.
91. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(17):11205-14.
92. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(31):19253-60.
93. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005;2005(306):re12.
94. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(4):1474-80.
95. Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology*. 2012;372(2):157-65.
96. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*. 2003;161(6):1163-77.
97. Charpentier MS, Conlon FL. Cellular and molecular mechanisms underlying blood vessel lumen formation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2014;36(3):251-9.
98. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *The International journal of developmental biology*. 2011;55(3):261-8.
99. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10.
100. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(12):871-82.
101. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(5):1099-107.
102. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(7):a006502.
103. Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(12):6729-33.
104. Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Ozes ON, Mayo LD, Kessler KM, et al. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(15):11216-21.
105. Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Current opinion in cell biology*. 2012;24(2):188-93.
106. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*. 2010;465(7297):487-91.
107. Jopling HM, Odell AF, Hooper NM, Zachary IC, Walker JH, Ponnambalam S. Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(7):1119-24.

108. Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE, Berger P. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood*. 2011;118(3):816-26.
109. Lanahan AA, Hermans K, Claes F, Kerley-Hamilton JS, Zhuang ZW, Giordano FJ, et al. VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Developmental cell*. 2010;18(5):713-24.
110. Bruns AF, Herbert SP, Odell AF, Jopling HM, Hooper NM, Zachary IC, et al. Ligand-Stimulated VEGFR2 Signaling is Regulated by Co-Ordinated Trafficking and Proteolysis. *Traffic*. 2010;11(1):161-74.
111. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*. 2006;9(4):225-30.
112. Funahashi Y, Shawber CJ, Vorontchikhina M, Sharma A, Outtz HH, Kitajewski J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *Journal of angiogenesis research*. 2010;2(1):3.
113. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):359-71.
114. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in cancer research*. 2009;102:19-65.
115. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002;12(1):9-18.
116. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2001;2001(112):re21.
117. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research*. 2007;100(6):782-94.
118. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura J-J, Kelkar N, Tanaka Y, et al. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & development*. 2003;17(16):1969-78.
119. Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*. 2004;23(2):434-45.
120. Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*. 1997;15(18):2169-77.
121. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(24):15442-51.
122. Le Boeuf F, Houle F, Huot J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(37):39175-85.
123. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta biochimica Polonica*. 2003;50(1):49-59.
124. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(1):35-45.
125. Aoki Y, Tosato G. Lymphatic Regeneration: New Insights From VEGFR-3 Blockade. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(1):2-3.
126. He Y, Kozaki K-i, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, et al. Suppression of Tumor Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis by Blocking Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Signaling. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(11):819-25.
127. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284(5415):770-6.

128. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*. 2007;134(15):2709-18.
129. Hambleton S, Valeyev NV, Muranyi A, Knott V, Werner JM, McMichael AJ, et al. Structural and functional properties of the human notch-1 ligand binding region. *Structure*. 2004;12(12):2173-83.
130. D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene*. 2008;27(38):5148-67.
131. Stephenson NL, Avis JM. Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(41):E2757-65.
132. Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM, Handford PA. Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012;23(4):421-8.
133. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 6):1095-7.
134. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell*. 2009;16(2):196-208.
135. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(1):a006569.
136. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development*. 2002;16(20):2684-98.
137. Patel NS, Li JL, Generali D, Poulosom R, Cranston DW, Harris AL. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer research*. 2005;65(19):8690-7.
138. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, et al. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(9):3219-24.
139. Holderfield MT, Henderson Anderson AM, Kokubo H, Chin MT, Johnson RL, Hughes CC. HESR1/CHF2 suppresses VEGFR2 transcription independent of binding to E-boxes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;346(3):637-48.
140. Taylor KL, Henderson AM, Hughes CC. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvascular research*. 2002;64(3):372-83.
141. Henderson AM, Wang SJ, Taylor AC, Aitkenhead M, Hughes CC. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6169-76.
142. Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*. 2006;107(3):931-9.
143. Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, Taylor JM, Shi W, Li JL, et al. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvascular research*. 2008;75(2):144-54.
144. Hellstrom M, Phng LK, Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell adhesion & migration*. 2007;1(3):133-6.
145. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology*. 2010;12(10):943-53.
146. Kofler NM, Shawber CJ, Kangsamaksin T, Reed HO, Galatioto J, Kitajewski J. Notch signaling in developmental and tumor angiogenesis. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1106-16.

147. Guarani V, Deflorian G, Franco CA, Kruger M, Phng LK, Bentley K, et al. Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase. *Nature*. 2011;473(7346):234-8.
148. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(5):639-49.
149. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(23):2335-42.
150. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(24):2542-50.
151. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007;370(9605):2103-11.
152. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(28):4733-40.
153. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;365(26):2473-83.
154. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer research*. 2005;65(3):671-80.
155. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005;307(5706):58-62.
156. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(1):28-39.
157. Johnson LN. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Quarterly reviews of biophysics*. 2009;42(1):1-40.
158. Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis*. 2010;13(1):1-14.
159. Aparicio-Gallego G, Blanco M, Figueroa A, Garcia-Campelo R, Valladares-Ayerbes M, Grande-Pulido E, et al. New insights into molecular mechanisms of sunitinib-associated side effects. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(12):2215-23.
160. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(10):3129-40.
161. Baldo P, Cecco S, Giacomini E, Lazzarini R, Ros B, Marastoni S. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. *Current cancer drug targets*. 2008;8(8):647-65.
162. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(8):592-603.
163. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer research*. 1997;57(5):963-9.
164. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters*. 2013;328(1):18-26.

165. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(7):1855-62.
166. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in cell biology*. 2010;20(9):556-67.
167. Li JL, Sainson RC, Oon CE, Turley H, Leek R, Sheldon H, et al. DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer research*. 2011;71(18):6073-83.
168. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003;170(6):3369-76.
169. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nature medicine*. 2005;11(9):992-7.
170. Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer research*. 2010;70(3):1063-71.
171. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and tissue research*. 2003;314(1):107-17.
172. Azam F, Mehta S, Harris AL. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1323-32.
173. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(3-4):489-502.
174. Gianni-Barrera R, Bartolomeo M, Vollmar B, Djonov V, Banfi A. Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(6):1637-42.
175. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology*. 1999;155(3):739-52.
176. van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer research*. 2005;65(24):11520-8.
177. Xu Y, Li Q, Li XY, Yang QY, Xu WW, Liu GL. Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2012;31:16.
178. Leenders WP, Kusters B, de Waal RM. Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. *Endothelium : journal of endothelial cell research*. 2002;9(2):83-7.
179. Donnem T, Hu J, Ferguson M, Adighibe O, Snell C, Harris AL, et al. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer medicine*. 2013;2(4):427-36.
180. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, Zhang M, Westphal M, Deen DF, et al. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia*. 2000;2(4):306-14.
181. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer treatment and research*. 2004;117:3-32.
182. Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvascular research*. 2010;79(3):200-6.
183. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends in immunology*. 2007;28(7):299-307.



184. Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes & cancer*. 2010;1(1):12-25.
185. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell*. 2009;15(3):220-31.
186. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer cell*. 2009;15(3):232-9.
187. Welte JC, Powles T, Foo S, Gourlaouen M, Preece N, Foster J, et al. Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis*. 2012;15(4):623-41.
188. Singh M, Couto SS, Forrest WF, Lima A, Cheng JH, Molina R, et al. Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumour models. *The Journal of pathology*. 2012;227(4):417-30.
189. McCarthy N. Metastasis: Leaky effect. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(3):157-.
190. Jung HY, Fattet L, Yang J. Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(5):962-8.
191. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology*. 2005;7(4):452-64.
192. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience*. 2010;15:166-79.
193. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circulation research*. 2004;95(4):343-53.
194. Shaked Y, Voest EE. Bone marrow derived cells in tumor angiogenesis and growth: are they the good, the bad or the evil? *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1796(1):1-4.
195. Fan GC. Hypoxic exosomes promote angiogenesis. *Blood*. 2014;124(25):3669-70.
196. Zhang Y, Wang XF. A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nature cell biology*. 2015;17(6):709-11.
197. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013;200(4):373-83.
198. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomarkers in medicine*. 2013;7(5):769-78.
199. Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA, Richard DJ, O'Byrne KJ. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;4:127.
200. Ribeiro MF, Zhu H, Millard RW, Fan GC. Exosomes Function in Pro- and Anti-Angiogenesis. *Current angiogenesis*. 2013;2(1):54-9.
201. van Beijnum JR, Nowak-Sliwinska P, Huijbers EJ, Thijssen VL, Griffioen AW. The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacological reviews*. 2015;67(2):441-61.
202. Franco M, Man S, Chen L, Emmenegger U, Shaked Y, Cheung AM, et al. Targeted anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 therapy leads to short-term and long-term impairment of vascular function and increase in tumor hypoxia. *Cancer research*. 2006;66(7):3639-48.
203. De Bock K, Mazzone M, Carmeliet P. Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(7):393-404.
204. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(2):319-31.
205. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.

206. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):3-11.
207. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(11):886-97.
208. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.
209. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 4):807-15.
210. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
211. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*. 2007;87(1):99-163.
212. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:87-106.
213. Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491-501.
214. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481-90.
215. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(9):621-32.
216. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2007;12(5):815-33.
217. Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH, Song YS. Mitochondrial permeability transition pore as a selective target for anti-cancer therapy. *Frontiers in oncology*. 2013;3:41.
218. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Molecular cell*. 2010;37(3):299-310.
219. Hardwick JM, Youle RJ. SnapShot: BCL-2 proteins. *Cell*. 2009;138(2):404, e1.
220. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(4):a008714.
221. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292(5517):727-30.
222. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 1:S2-19.
223. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(4):508-20.
224. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(4):521-31.
225. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(4):a008656.
226. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO journal*. 2001;20(23):6627-36.
227. Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell death and differentiation*. 2008;15(3):453-60.

228. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002;84(2-3):215-22.
229. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95-9.
230. Karch J, Molkentin JD. Identifying the components of the elusive mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(29):10396-7.
231. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;78:100-6.
232. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2004;1644(2-3):107-13.
233. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*. 2009;417(1):1-13.
234. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*. 2013;1(1):304-12.
235. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox report : communications in free radical research*. 2001;6(4):229-34.
236. Rabilloud T, Heller M, Rigobello MP, Bindoli A, Aebersold R, Lunardi J. The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress. *Proteomics*. 2001;1(9):1105-10.
237. Bhattacharya S. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. In: Rani V, Yadav SUC, editors. *Free Radicals in Human Health and Disease*. New Delhi: Springer India; 2015. p. 17-29.
238. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*. 2012;5(1):9-19.
239. Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*. 2012;2012:26.
240. Mailloux RJ, McBride SL, Harper M-E. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. *Trends in Biochemical Sciences*. 38(12):592-602.
241. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(6):749-62.
242. Shen HM, Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free radical biology & medicine*. 2006;40(6):928-39.
243. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*. 2001;495(1-2):12-5.
244. Lagouge M, Larsson NG. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal medicine*. 2013;273(6):529-43.
245. Schlame M, Ren M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788(10):2080-3.
246. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(3):1259-63.
247. Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation*. 2007;14(7):1243-7.
248. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology*. 2005;1(4):223-32.

249. Orrenius S, Zhivotovsky B. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nature chemical biology*. 2005;1(4):188-9.
250. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 0000;26(22):3279-90.
251. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34.
252. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(2):117-23.
253. Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(2):161-7.
254. Gresset A, Sondek J, Harden TK. The phospholipase C isozymes and their regulation. *Sub-cellular biochemistry*. 2012;58:61-94.
255. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773(8):1263-84.
256. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007;1773(8):1213-26.
257. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras//Raf//MEK//ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*. 0000;17(7):1263-93.
258. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
259. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*. 2004;30(2):193-204.
260. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8):606-19.
261. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(3):184-92.
262. Metz HE, McGarry Houghton A. Insulin Receptor Substrate Regulation of Phosphoinositide 3-Kinase. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(2):206-11.
263. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer*. 2011;2(3):261-74.
264. Czech MP. PIP2 and PIP3: Complex Roles at the Cell Surface. *Cell*. 2000;100(6):603-6.
265. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*. 1997;275(5300):665-8.
266. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, et al. Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(50):31515-24.
267. Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, et al. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Current biology : CB*. 1999;9(8):393-404.
268. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(19):11211-6.
269. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101.

270. Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(39):41189-96.
271. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology*. 2009;4:127-50.
272. Backers K, Blero D, Paternotte N, Zhang J, Erneux C. The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-phosphatases. *Advances in enzyme regulation*. 2003;43:15-28.
273. Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, et al. Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Insulin's Metabolic Signaling Pathway by Inhibiting Akt (Protein Kinase B) Activity in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(19):8778-89.
274. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell*. 2005;18(1):13-24.
275. Simons A, Orcutt K, Madsen J, Scarbrough P, Spitz D. The Role of Akt Pathway Signaling in Glucose Metabolism and Metabolic Oxidative Stress. In: Spitz DR, Dornfeld KJ, Krishnan K, Gius D, editors. *Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*: Humana Press; 2012. p. 21-46.
276. Hajdуч E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport? *FEBS Letters*. 2001;492(3):199-203.
277. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
278. Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(16):5644-57.
279. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature medicine*. 2002;8(10):1153-60.
280. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*. 2009;122(20):3589-94.
281. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5.
282. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.
283. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(11):1978-86.
284. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(8):1299-303.
285. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of cell biology*. 2000;151(3):483-94.
286. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, et al. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(7):5405-12.
287. Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in neurobiology*. 2006;79(4):173-89.
288. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP-Y, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes & development*. 2008;22(11):1490-500.

289. Widenmaier SB, Ao Z, Kim S-J, Warnock G, McIntosh CHS. Suppression of p38 MAPK and JNK via Akt-mediated Inhibition of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 Constitutes a Core Component of the  $\beta$ -Cell Pro-survival Effects of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(44):30372-82.
290. Sendoel A, Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(3):168-76.
291. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(11):851-64.
292. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(16):9082-7.
293. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(1):113-24.
294. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-90.
295. Sermeus A, Genin M, Maincent A, Fransolet M, Notte A, Leclere L, et al. Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PloS one*. 2012;7(11):e47519.
296. Kim W, Yoon JH, Jeong JM, Cheon GJ, Lee TS, Yang JI, et al. Apoptosis-inducing antitumor efficacy of hexokinase II inhibitor in hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(9):2554-62.
297. Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, et al. Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependent Transactivation. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(4):1297-310.
298. Sermeus A, Michiels C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell death & disease*. 2011;2:e164.
299. Obacz J, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R. Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Molecular cancer*. 2013;12(1):1-10.
300. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochemical pharmacology*. 2002;64(5-6):889-92.
301. Schmid T, Zhou J, Kohl R, Brune B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *The Biochemical journal*. 2004;380(Pt 1):289-95.
302. Nardinocchi L, Puca R, D'Orazi G. HIF-1 $\alpha$  antagonizes p53-mediated apoptosis by triggering HIPK2 degradation. *Aging*. 2011;3(1):33-43.
303. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(2):89-102.
304. Koumenis C, Bi M, Ye J, Feldman D, Koong AC. Hypoxia and the unfolded protein response. *Methods in enzymology*. 2007;435:275-93.
305. Rouschop KMA, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(1):127-41.
306. Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *Journal of Biochemistry*. 2012;151(3):217-9.
307. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. 2006;7(9):880-5.

308. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer treatment reviews*. 2003;29(4):297-307.
309. Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2008;8(7):790-7.
310. Crampton SP, Davis J, Hughes CC. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2007(3):183.
311. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2003;67(4):657-85.
312. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
313. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
314. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
315. Marty M, Fumoleau P, Adenis A, Rousseau Y, Merrouche Y, Robinet G, et al. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2001;12(11):1643-9.
316. Ngan VK, Bellman K, Panda D, Hill BT, Jordan MA, Wilson L. Novel Actions of the Antitumor Drugs Vinflunine and Vinorelbine on Microtubules. *Cancer research*. 2000;60(18):5045-51.
317. Etienne-Manneville S. Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. 2013;29:471-99.
318. Osipo C, Golde TE, Osborne BA, Miele LA. Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88(1):11-7.
319. Curry CL, Reed LL, Nickoloff BJ, Miele L, Foreman KE. Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006;86(8):842-52.
320. Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(11):7919-26.
321. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, et al. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(1):14-25.
322. Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer & metabolism*. 2014;2(1):3.
323. Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(18):3569-82.
324. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*. 2006;58(11):621-31.
325. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(1):59-71.
326. Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, Minischetti M, Nico B, Ria R, et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood*. 1999;94(12):4143-55.

327. Pasquier E, Tuset MP, Street J, Sinnappan S, MacKenzie KL, Braguer D, et al. Concentration- and schedule-dependent effects of chemotherapy on the angiogenic potential and drug sensitivity of vascular endothelial cells. *Angiogenesis*. 2013;16(2):373-86.
328. Honore S, Pagano A, Gauthier G, Bourgarel-Rey V, Verdier-Pinard P, Civiletti K, et al. Antiangiogenic vinflunine affects EB1 localization and microtubule targeting to adhesion sites. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(7):2080-9.
329. Kanthou C, Tozer GM. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood*. 2002;99(6):2060-9.
330. Vincent L, Kermani P, Young LM, Cheng J, Zhang F, Shido K, et al. Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(11):2992-3006.
331. Huang Y, Fang Y, Wu J, Dziadyk JM, Zhu X, Sui M, et al. Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-kappaB/IkappaB pathway in human tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2004;3(3):271-7.
332. Meissner M, Pinter A, Michailidou D, Hrgovic I, Kaprolat N, Stein M, et al. Microtubule-targeted drugs inhibit VEGF receptor-2 expression by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(8):2084-91.
333. Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(24):7243-6.
334. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*. 2010;464(7291):1052-7.
335. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chantry Y, et al. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*. 2006;444(7122):1083-7.
336. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, et al. Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*. 2006;444(7122):1032-7.
337. Kalen M, Heikura T, Karvinen H, Nitzsche A, Weber H, Esser N, et al. Gamma-secretase inhibitor treatment promotes VEGF-A-driven blood vessel growth and vascular leakage but disrupts neovascular perfusion. *PloS one*. 2011;6(4):e18709.
338. Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(5):327-31.
339. Narui Y, Salaita K. Membrane tethered delta activates notch and reveals a role for spatio-mechanical regulation of the signaling pathway. *Biophysical journal*. 2013;105(12):2655-65.
340. Calvani M, Rapisarda A, Uranchimeg B, Shoemaker RH, Melillo G. Hypoxic induction of an HIF-1alpha-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood*. 2006;107(7):2705-12.
341. Peng WX, Pan FY, Liu XJ, Ning S, Xu N, Meng FL, et al. Hypoxia stabilizes microtubule networks and decreases tumor cell chemosensitivity to anticancer drugs through Egr-1. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010;293(3):414-20.
342. Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Molecular cancer therapeutics*. 2003;2(5):427-36.
343. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(10):790-803.



344. Hu JY, Chu ZG, Han J, Dang YM, Yan H, Zhang Q, et al. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(2):321-33.
345. Huang L, Ao Q, Zhang Q, Yang X, Xing H, Li F, et al. Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1alpha. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(3):447-56.
346. Raz S, Sheban D, Gonen N, Stark M, Berman B, Assaraf YG. Severe hypoxia induces complete antifolate resistance in carcinoma cells due to cell cycle arrest. *Cell death & disease*. 2014;5:e1067.
347. Esteve MA, Carre M, Bourgarel-Rey V, Kruczynski A, Raspaglio G, Ferlini C, et al. Bcl-2 down-regulation and tubulin subtype composition are involved in resistance of ovarian cancer cells to vinflunine. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(11):2824-33.
348. Savry A, Carre M, Berges R, Rovini A, Pobel I, Chacon C, et al. Bcl-2-enhanced efficacy of microtubule-targeting chemotherapy through Bim overexpression: implications for cancer treatment. *Neoplasia*. 2013;15(1):49-60.
349. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental physiology*. 2006;91(5):807-19.
350. Kahl R, Kampkotter A, Watjen W, Chovolou Y. Antioxidant enzymes and apoptosis. *Drug metabolism reviews*. 2004;36(3-4):747-62.
351. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2007;12(5):913-22.
352. Tam ZY, Cai YH, Gunawan R. Elucidating cytochrome C release from mitochondria: insights from an in silico three-dimensional model. *Biophysical journal*. 2010;99(10):3155-63.
353. Teng CL, Yu CT, Hwang WL, Tsai JR, Liu HC, Hwang GY, et al. Effector mechanisms of sunitinib-induced G1 cell cycle arrest, differentiation, and apoptosis in human acute myeloid leukaemia HL60 and KG-1 cells. *Annals of hematology*. 2013;92(3):301-13.
354. Ehrhardt H, Pannert L, Pfeiffer S, Wachter F, Amtmann E, Jeremias I. Enhanced anti-tumour effects of Vinca alkaloids given separately from cytostatic therapies. *British journal of pharmacology*. 2013;168(7):1558-69.
355. Kawakami Y, Hama S, Hiura M, Nogawa T, Chiba T, Yokoyama T, et al. Adenovirus-mediated p16 gene transfer changes the sensitivity to taxanes and Vinca alkaloids of human ovarian cancer cells. *Anticancer research*. 2001;21(4A):2537-45.
356. Bible KC, Kaufmann SH. Cytotoxic synergy between flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration. *Cancer research*. 1997;57(16):3375-80.
357. Pan F, Tian J, Zhang X, Zhang Y, Pan Y. Synergistic interaction between sunitinib and docetaxel is sequence dependent in human non-small lung cancer with EGFR TKIs-resistant mutation. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(9):1397-408.
358. Minkin P, Zhao M, Chen Z, Ouwkerk J, Gelderblom H, Baker SD. Quantification of sunitinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2008;874(1-2):84-8.
359. Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(20):8813-22.
360. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL, et al. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(22):18702-9.

361. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO journal*. 2004;23(9):1949-56.
362. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Molecular cancer*. 2010;9:191.
363. Chen L, Feng P, Li S, Long D, Cheng J, Lu Y, et al. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochemical research*. 2009;34(5):984-90.
364. Li J, Shi M, Cao Y, Yuan W, Pang T, Li B, et al. Knockdown of hypoxia-inducible factor-1alpha in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;342(4):1341-51.
365. Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2006;58(6):776-84.
366. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(10):1009-14.
367. Hammond EM, Giaccia AJ. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;331(3):718-25.
368. Guo K, Searfoss G, Krolikowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell death and differentiation*. 2001;8(4):367-76.
369. Burton TR, Gibson SB. The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. *Cell death and differentiation*. 2009;16(4):515-23.
370. Huynh H, Chow PK, Soo KC. AZD6244 and doxorubicin induce growth suppression and apoptosis in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(9):2468-76.
371. Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, Contractor R, Medina CA, Nathanson KL, et al. The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(1):230-9.
372. XU R, SATO N, YANAI K, AKIYOSHI T, NAGAI S, WADA J, et al. Enhancement of Paclitaxel-induced Apoptosis by Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Colon Cancer Cells. *Anticancer research*. 2009;29(1):261-70.
373. Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, Feldman MD, Carter C, Lee WM. Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *The American journal of pathology*. 2006;169(5):1875-85.
374. Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Ueno T, Kerbel RS, et al. Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma. *Translational oncology*. 2013;6(5):511-9.
375. Kim D, Dan HC, Park S, Yang L, Liu Q, Kaneko S, et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2005;10:975-87.
376. Ali AY, Kim JY, Pelletier JF, Vanderhyden BC, Bachvarov DR, Tsang BK. Akt confers cisplatin chemoresistance in human gynecological carcinoma cells by modulating PPM1D stability. *Molecular carcinogenesis*. 2015;54(11):1301-14.
377. Kim SH, Juhnn YS, Song YS. Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1095:82-9.
378. Gargini R, Cerliani JP, Escoll M, Anton IM, Wandosell F. Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway. *Stem cells*. 2015;33(3):646-60.

379. Pal SK, Reckamp K, Yu H, Figlin RA. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs*. 2010;19(11):1355-66.
380. Dellinger MT, Brekken RA. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 is required for VEGF-A/VEGFR2-induced proliferation and migration of lymphatic endothelium. *PloS one*. 2011;6(12):e28947.
381. Jiang BH, Liu LZ. AKT signaling in regulating angiogenesis. *Current cancer drug targets*. 2008;8(1):19-26.
382. Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suárez S, Jiménez C, Carrera AC, Landázuri MO, del Peso L. Hypoxia Induces the Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway in PC12 Cells: PROTECTIVE ROLE IN APOPTOSIS. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(25):22368-74.
383. Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*. 2001;20(53):7779-86.
384. Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, et al. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell*. 2004;16(5):819-30.
385. Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer research*. 2005;65(22):10545-54.
386. Chiara F, Castellaro D, Marin O, Petronilli V, Brusilow WS, Juhaszova M, et al. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PloS one*. 2008;3(3):e1852.